



HAL
open science

Comparaison d'un test automatisé de dosage de Willebrand par rapport au test par agrégométrie chez les patients thrombocytaires porteurs de syndrome myéloprolifératif

Pierre Laporte

► **To cite this version:**

Pierre Laporte. Comparaison d'un test automatisé de dosage de Willebrand par rapport au test par agrégométrie chez les patients thrombocytaires porteurs de syndrome myéloprolifératif. Sciences du Vivant [q-bio]. 2020. dumas-02945674

HAL Id: dumas-02945674

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-02945674>

Submitted on 22 Sep 2020

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.

UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

U.F.R. DE MÉDECINE

ANNÉE 2020

Thèse N°3064

DOCTORAT D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES DE BIOLOGIE MÉDICALE

Présenté et soutenu publiquement par

Pierre LAPORTE

Né le 13 avril 1989 à Libourne

Le 01 juillet 2020 à Bordeaux

Conformément aux dispositions de l'arrêté du 4 octobre 1988 tient lieu de
**THÈSE POUR L'OBTENTION DU DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN
MÉDECINE**

**Comparaison d'un test automatisé de dosage de
Willebrand par rapport au test par agrégométrie chez les
patients thrombocytaires porteurs de syndrome
myéloprolifératif**

Sous la direction de :
Mme le Professeur Chloé JAMES

Rapporteur : Mme le Docteur Françoise DURRIEU

JURY

M. le Professeur Pierre DUFFAU	Président
M. le Professeur Jean-François VIALARD	Juge
Mme le Professeur Chloé JAMES	Juge
Mme le Docteur Anne RYMAN	Juge
Mme le Docteur Sylvie COLOMER	Juge

REMERCIEMENTS

Merci au Professeur Pierre DUFFAU d'avoir accepté d'être le président du jury de cette thèse.

Merci au Professeur Chloé JAMES de m'avoir proposé ce sujet de thèse. Je vous remercie également d'avoir généreusement pris le temps de me guider et de m'encadrer dans la rédaction de cette thèse et je vous remercie également pour les nombreux mois passés dans votre service d'Hématologie où vous nous laissez apprendre notre métier de Biologiste.

Merci au Professeur Jean-François VIALARD et au Docteur Sylvie COLOMER d'avoir accepté d'être membre du jury.

Au Docteur Anne RYMAN, je vous remercie pour votre gentillesse, votre écoute et vos conseils pour la rédaction de la thèse.

Merci à Mme le Docteur Françoise DURRIEU d'avoir accepté de faire le rapport de thèse.

Mes oncles et cousins adorés, Michel et Chantal, Martin et Brigitte, Michael et Nathalie, François et Marie-Charlotte, Paul, Gustave et Clémentine, toujours présents malgré la distance.

A ma grand-mère, mes parents et mon frère, merci d'être là tous les jours à mes côtés, de me supporter, m'encourager et de me soutenir à longueur de journées. Merci à tout le reste de la famille, pour les bons moments passés en famille.

Je remercie également tous les biologistes et internes avec qui j'ai pu travailler tout au long de mon internat et en particulier toute l'équipe du service d'Hématologie. Merci à Pierre-Elian, mon assistant préféré.

Merci à Luc et Clément, à tous mes amis, amis d'enfance et du lycée, à tous les internes que j'ai pu côtoyer à Bordeaux. Mes amis de la fac, je ne peux pas tous vous citer, mais grâce à vous ces années d'externat resteront mémorables !

SERMENT D'HIPPOCRATE

Au moment d'être admis 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 leurs 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.

Admis dans l'intimité des personnes, je tairai les secrets qui me sont confiés. Reçu 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 déshonoré et méprisé si j'y manque.

RÉSUMÉ

Contexte:

Le facteur Willebrand est composé de multimères et les multimères de haut poids moléculaire (HMWM) portent l'effet hémostatique le plus important. Les patients atteints de syndromes myéloprolifératifs (MPN) et d'une numération plaquettaire élevée (> 1500 G/L) sont à risque de saignement en raison d'une diminution des HMWM, c'est-à-dire de la maladie de Willebrand acquise. Cela est suspecté lorsque l'activité du cofacteur de la ristocétine (VWF:RCo) est diminuée.

Pour l'évaluation fonctionnelle du VWF, l'agrégométrie (RCo(Agg)) est considérée comme le gold standard. Cependant, ce test souffre d'une mauvaise reproductibilité et sensibilité à de faibles niveaux de VWF et nécessite une expertise technique. Divers dosages pour la détermination de la fonction adhésive du VWF utilisant différentes méthodologies ont été développés ces dernières années.

Objectif:

Comparer les performances de l'HemosIL RCo, Werfen® par rapport à l'agrégométrie chez les patients atteints de thrombocytose (plaquettes > 450G/L) dans le contexte du MPN (T-MPN) et chez les patients atteints de thrombocytose secondaire (ST).

Méthodes:

33 patients avec MPN et 18 patients avec ST ont été évalués en comparant le VWF:RCo mesuré avec les deux techniques. Le niveau d'antigène VWF (VWF:Ag), la distribution des multimères de Willebrand par électrophorèse et la capacité de liaison du VWF au collagène (CB) ont également été analysés pour chaque patient.

Résultats:

Chez les patients T-MPN et ST, il y avait une différence significative entre les deux techniques pour le rapport RCo et le rapport RCo/Ag ($p < 0,0001$ et $p < 0,0001$). Une majorité de patients T-MPN (23/33) avait un rapport RCo/Ag < 0,6 avec le test HemosIL mais pas avec l'agrégométrie. Chez les patients ST, 6/18 avaient des résultats discordants. Parmi les patients T-MPN avec des résultats discordants, 7 avaient une diminution des HMWM et / ou CB < 0,6 contre aucun parmi les 6 patients ST avec des résultats discordants. Il y avait

une légère corrélation entre le rapport RCo(IL)/Ag et le nombre de plaquettes chez les patients T-MPN mais pas chez les patients ST.

Conclusion:

Le réactif HemosIL RCo semble être plus sensible que l'agrégométrie pour détecter un changement dans le profil des multimères de haut poids moléculaire chez les patients T-MPN.

ABSTRACT

Title:

Comparison of an automated von Willebrand factor (VWF) activity assay by HemosIL Werfen®, *RCo(IL)* with ristocetin cofactor assay by aggregometry, *RCo(Agg)* in thrombocytic patients with myeloproliferative neoplasms (MPN) and in patients with secondary thrombocytosis (ST).

Background:

VWF is composed of multimers and the high-molecular-weight multimers (HMWM) carry the most important hemostatic effect. Patients with myeloproliferative neoplasms (MPN) and high platelet count (> 1500 G/L) are at risk of bleeding because of a decrease in HMWM, i.e. acquired von Willebrand disease. This is suspected when VWF ristocetin cofactor activity (VWF:RCo) is decreased.

For functional assessment of VWF, aggregometry (*RCo(Agg)*) is considered to be the gold standard. However, this assay suffers from poor reproducibility and sensitivity at low levels of VWF and is labour intensive. Various assays for determination of VWF adhesive function using different methodologies have been developed in recent years.

Aims:

To compare the performance of HemosIL RCo, Werfen® versus aggregometry in patients with thrombocytosis (platelets > 450G/L) in the context of MPN (T-MPN) and in patients with secondary thrombocytosis (ST).

Methods:

Samples from 33 patients with MPN and 18 patients with ST were evaluated by using *RCo(Agg)* and *RCo(IL)* assays. VWF antigen level (VWF:Ag), distribution of VWF multimers by electrophoresis and VWF binding capacity to collagen (CB) were also analysed for each patient.

Results:

In T-MPN and ST patients, there was a significant difference between the two techniques for RCo and RCo/Ag ratio ($p < 0.0001$ and $p < 0.0001$). A majority of T-MPN patients (23/33) had RCo/Ag ratio < 0.6 with HemosIL assay but not with aggregometry. In ST patients, 6/18

had discordant results. Among T-MPN patients with discordant results, 7 had actually a decrease in HMWM and/or $CB < 0.6$ versus none among the 6 ST patients with discordant results. There was a slight correlation between $RCo(IL)/Ag$ ratio and platelet count in T-MPN patients but not in ST patients.

Conclusion:

HemosIL RCo reagent seems to be more sensitive than aggregometry to detect a change in the profile of HMWM in T-MPN patients.

MOTS CLEFS

- Maladie de Willebrand acquise
- Syndromes myéloprolifératifs
- Thrombocytose
- Willebrand RCo
- RCo agrégométrie
- HemosIL RCo Werfen®

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS	2
SERMENT D'HIPPOCRATE	3
RÉSUMÉ.....	4
ABSTRACT	6
MOTS CLEFS.....	8
TABLE DES MATIERES	9
TABLE DES TABLEAUX	11
TABLE DES ILLUSTRATIONS.....	11
LISTE DES ABBREVIATIONS.....	12
INTRODUCTION	13
1. La maladie de Willebrand.....	13
A. Physiologie	13
B. Les différents types de maladie de Willebrand	16
2. Syndromes myéloprolifératifs et maladie de Willebrand acquise.....	22
A. Généralités.....	22
B. Complications thrombotiques et hémorragiques des syndromes myéloprolifératifs	22
C. Maladie de Willebrand acquise et syndromes myéloprolifératifs	23
3. Techniques de dosage et maladie de Willebrand	24
A. Les différentes techniques de dosage du VWF:RCo.....	24
Mesure de l'activité cofacteur de la ristocétine en agrégométrie	24
Mesure de l'activité cofacteur de la ristocétine avec HemosIL VWF:RCo® IL	26
B. Dosage quantitatif du facteur Willebrand	27
Méthode immunoturbidimétrique (LIA).....	28
Méthode immunoenzymatique ELISA.....	29
Méthode immunoenzymatique ELFA.....	29
Méthode immunochimiluminescence (HemosIL AcuStar)	29
C. Quantification des multimères de haut poids moléculaire	30
D. Collagen-binding.....	32
4. Objectif du travail.....	34
ARTICLE	35
1. Introduction.....	36

2. Patients and methods	37
3. Results	39
4. Discussion	42
5. Tables and figures	46
6. Legends	54
BIBLIOGRAPHIE	56

TABLE DES TABLEAUX

Tableau 1. Différents types de maladie de Willebrand et ses tests associés	17
Tableau 2. Performances analytiques des différents tests de mesure de l'activité VWF (liaison à la GP1b)	27
Tableau 3. Différents dosages antigéniques du facteur Willebrand	30

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1. Biosynthèse du facteur Willebrand	13
Figure 2. Structure du facteur Willebrand et de ses sites de liaison	14
Figure 3. Modifications conformationnelles du VWF en fonction des forces de cisaillement. 15	
Figure 4. Pathologies associées au syndrome de Willebrand acquis	19
Figure 5. Lecture VWF:RCo en agrégométrie.....	25
Figure 6. Représentation de la liaison entre une bille de latex et le facteur Willebrand avec le test HemosIL VWF:RCo Werfen®.....	26
Figure 7. Méthode LIA.....	28
Figure 8. Méthode LIA (suite).....	28
Figure 9. Expression des résultats d'une électrophorèse de multimères de Willebrand.....	31
Figure 10. Exemple de profils multimériques. PN = patient normal	32
Figure 11. Principe du test Collagen-binding	33

LISTE DES ABBREVIATIONS

- **VWD** : maladie de Willebrand
- **VWF** : facteur Willebrand
- **ADAMTS13** : métalloprotéinase ADAMTS13
- **HMWM** : multimères de haut poids moléculaire
- **GP1b** : glycoprotéine 1b
- **GPIIb/IIIa** : glycoprotéine IIb/IIIa
- **VWF:CB** : capacité de liaison au collagène du facteur Willebrand
- **VWF:RCo** : activité du cofacteur de la ristocétine
- **AVWS** : syndrome acquis de maladie de Willebrand
- **ISTH** : International Society of Thrombosis and Haemostasis
- **NMP** : syndrome myéloprolifératif
- **VWF:Ag** : facteur Willebrand antigène
- **LMC** : leucémie myéloïde chronique
- **TE** : thrombocytémie essentielle
- **PV** : polyglobulie de Vaquez
- **MFP** : myélofibrose primitive
- **JAK2V617F** : Janus Kinase 2 V617F
- **RIPA** : agrégométrie des plaquettes induite par la ristocétine
- **ELISA**: méthode immuno-enzymatique
- **rGP1ba** : glycoprotéine du récepteur plaquettaire du facteur Willebrand
- **Ac** : anticorps
- **FVIII** : facteur VIII
- **MPN** : myeloproliferative neoplasms

INTRODUCTION

1. La maladie de Willebrand

A. Physiologie

La maladie de von Willebrand (VWD) est le trouble de coagulation héréditaire le plus fréquent (prévalence = 1%) [1] et découle d'une anomalie de la protéine plasmatique du facteur von Willebrand (VWF).

Dans des conditions physiologiques, l'équilibre hémostatique est maintenu grâce à une interaction complexe de facteurs procoagulants, anticoagulants et fibrinolytiques. Un facteur clé du système hémostatique est le facteur von Willebrand, qui joue un rôle majeur dans l'hémostase primaire et indirectement aussi dans la coagulation (via le facteur VIII) [2].

Le facteur Willebrand est une glycoprotéine adhésive multimérique, circulant dans le plasma et produite par les cellules endothéliales et les mégacaryocytes. Il est essentiel pour l'hémostase et la formation du thrombus, en agissant comme une molécule de pontage pour l'adhésion et l'agrégation plaquettaires aux sites de lésions vasculaires. De plus, le VWF transporte le facteur VIII procoagulant (FVIII), le protégeant ainsi de la dégradation et de la clairance, augmentant sa demi-vie plasmatique [3].

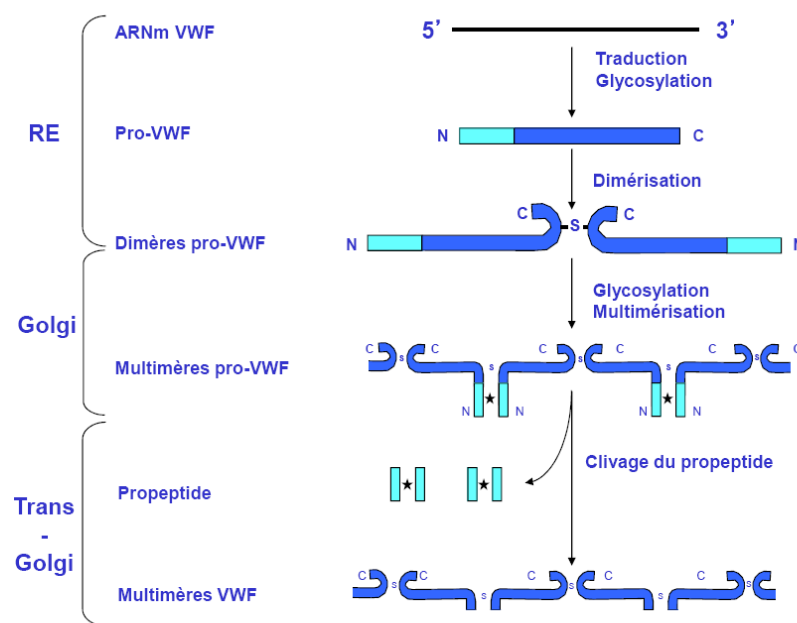


Figure 1. Biosynthèse du facteur Willebrand

Au niveau des cellules endothéliales, le facteur Willebrand est synthétisé comme une seule chaîne pré-pro-polypeptidique. Après élimination du peptide signal dans le réticulum endoplasmique, il est dimérisé [2]. Il subit ensuite une maturation plus poussée dans l'appareil de Golgi et les compartiments post-Golgi où il est multimérisé. Le facteur Willebrand nouvellement synthétisé est soit libéré directement dans le plasma ou le sous endothélium, soit stocké dans les corps de Weibel-Palade.

Seul le VWF, et non son pro-peptide, a un rôle dans l'adhésion plaquettaire. En revanche, le VWF synthétisé dans les mégacaryocytes est stocké dans les granules alpha jusqu'à l'activation plaquettaire et sa libération ultérieure.

Avec une demie-vie de 12h à 20h, sa clairance est assurée par les macrophages au niveau de la rate et du foie. Les sujets de groupe sanguin O ont une clairance plus accélérée. La protéolyse physiologique est l'action spécifique d'une métalloprotéinase, ADAMTS13, qui a une action de clivage au niveau du domaine A2.

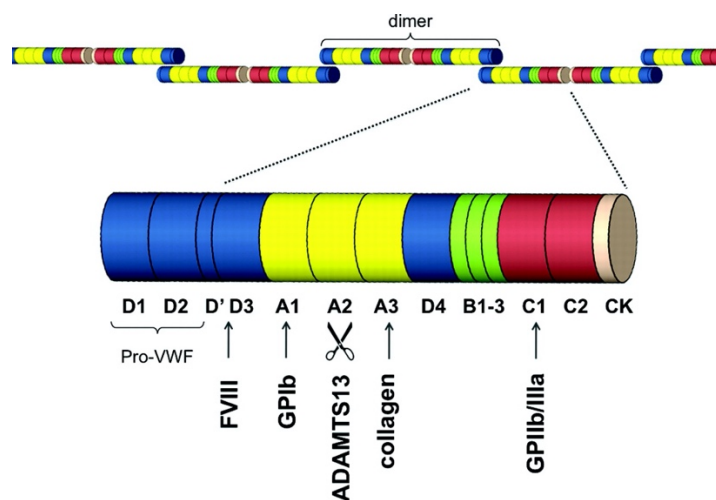


Figure 2. Structure du facteur Willebrand et de ses sites de liaison

Le facteur Willebrand existe en différentes tailles, appelées multimères de facteur Willebrand, et comprend des formes de poids moléculaire faible (L), intermédiaire (I), haut (H) et ultra-haut (UL).

Parmi eux, ce sont les multimères de haut poids moléculaire (HMWM) qui ont la plus grande activité hémostatique (capacité de liaison pour le collagène et la glycoprotéine GP1b et IIb/IIIa des plaquettes).

En conditions physiologiques normales, le facteur Willebrand circule dans le sang sous la forme d'une protéine enroulée de manière lâche et qui n'interagit pas avec les plaquettes, ni avec les cellules endothéliales, car le domaine de liaison du VWF au GP1b plaquettaire est caché.

Suite à une lésion de l'endothélium vasculaire, les fibres de collagène du sous-endothélium sont exposées au facteur Willebrand qui vient s'y lier au niveau de son domaine A3. Fixé au sous-endothélium et contraint par les conditions hémorhéologiques, le VWF voit sa conformation changer. Il passe ainsi d'une forme globulaire à une forme longiligne en rapport avec l'intensité de la force de cisaillement. La liaison entre le récepteur GPIb des plaquettes circulantes et le domaine A1 du VWF devient alors possible, ce qui permet l'adhésion plaquettaire. Cette liaison entre VWF et GPIb plaquettaire initie également le processus d'activation plaquettaire, permettant la sécrétion des granules α et granules denses ainsi que l'activation des récepteurs GPIIb-IIIa présents en surface de la plaquette. Le récepteur GPIIb-IIIa des plaquettes activées est capable de lier le fibrinogène et le VWF avec une grande affinité. Il existe une compétition entre le VWF et le fibrinogène pour la liaison à ce récepteur, l'ensemble participant à la formation du clou plaquettaire via le processus d'agrégation plaquettaire.

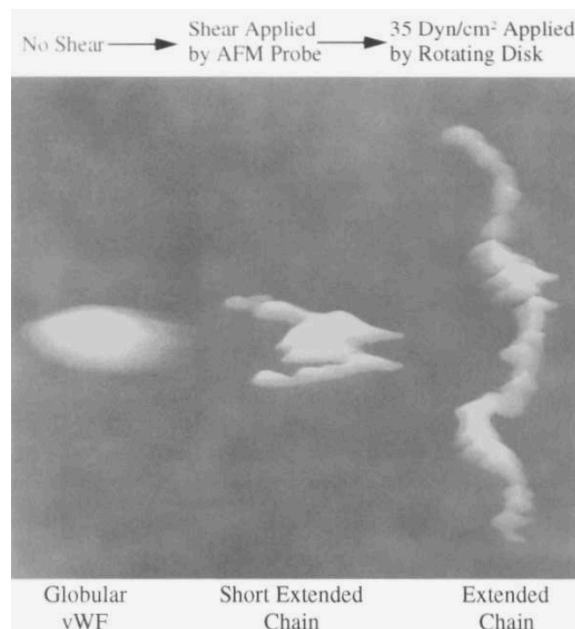


Figure 3. Modifications conformationnelles du VWF en fonction des forces de cisaillement

(Siedlecki, Shear-dependent changes in the three-dimensional structure of human von Willebrand factor. Blood 1996)

Toute anomalie quantitative ou qualitative des multimères de facteur Willebrand, en particulier des multimères de haut poids moléculaire, engendrera un trouble de l'hémostase [4].

Le potentiel hémostatique des multimères est régi par leur taille. Des études ont montré qu'à mesure que la taille des multimères de facteur Willebrand diminue, il y a progressivement une perte concomitante de la fonction du facteur Willebrand [5]. Plus précisément, c'est la capacité de liaison au collagène du VWF (VWF:CB) et la capacité fonctionnelle du VWF à se lier aux plaquettes (l'activité du cofacteur de la ristocétine: VWF:RCo) qui diminuent à mesure que la taille du multimère diminue.

B. Les différents types de maladie de Willebrand

Dans la majorité des cas, la maladie de Willebrand est une maladie congénitale à transmission autosomique dominante, touchant hommes et femmes avec la même fréquence.

Elle résulte d'un déficit qualitatif ou quantitatif du facteur Willebrand (la concentration, la structure ou la fonction des HMWM peuvent être altérées) et se caractérise par un risque accru de saignement [6].

De plus, l'absence de facteur Willebrand conduit à un déficit secondaire en FVIII, retentissant sur l'hémostase secondaire.

Cliniquement, cela se traduit par des saignements excessifs et prolongés à la suite d'une intervention chirurgicale ou d'une blessure traumatique, des saignements cutanéomuqueux (épistaxis ou ménorragie) et, dans les formes les plus graves de la maladie, des symptômes semblables à l'hémophilie tels que saignements articulaire et musculaire.

La maladie de Willebrand a été classée en trois grandes catégories:

- le type 1, qui se caractérise par un déficit quantitatif partiel (50 à 75% des cas)
- les sous-type 2 dans lesquels il existe des défauts qualitatifs affectant la fonction du VWF (20 à 45% des cas)
- le type 3 correspondant à un déficit total (5% des cas)

Test	Type 1	Type 2A	Type 2B	Type 2M	Type 2N	Type 3
VWF:Ag	↓	N ou ↓	N ou ↓	N ou ↓	N	0
VWF:RCo	↓	↓↓↓	↓ ou ↓↓	↓↓	N	0
Agglut. forte dose	N ou ↓	↓↓↓	N	diminué	N	0
faible dose	0	0	++	0	0	0
F VIII	N ou ↓	N ou ↓	N ou ↓	N ou ↓	↓↓	↓↓↓
Multimères	N	IPM et HPM absents	HPM absents	N ou ↓	N	00
VWF:CB	↓	↓↓	↓↓	N ou ↓	N	0

Tableau 1. Différents types de maladie de Willebrand et ses tests associés

Parmi les sous-type 2, il faut distinguer:

- le type 2A: où il existe un déficit relatif en HMWM, et une diminution de l'affinité pour la GPIb et le collagène
- le type 2B: déficit en HMWM et une hyperaffinité du VWF pour la GPIb
- le type 2M: diminution de l'affinité pour la GPIb ou le collagène, sans déficit en HMWM
- le type 2N: correspondant à une anomalie de liaison au facteur VIII

L'expression clinique de la maladie de type 2A est un saignement cutanéomuqueux léger à modéré, qui peut se manifester par des ecchymoses faciles, une épistaxis, un saignement prolongé après une blessure, pendant une chirurgie dentaire, des règles prolongées et une ménorragie chez la femme et, dans certains cas, un saignement gastro-intestinal ou dans le système nerveux central, qui peut être mortel. Contrairement à l'hémophilie, il y a peu d'hématomes et d'hémarthroses.

Le type 2B est caractérisé par un déficit en multimères de haut poids moléculaire en raison de l'affinité accrue du facteur Willebrand pour le complexe récepteur GPIb plaquettaire [7]. Cette affinité accrue est causée par la présence de mutations dans le domaine A1, entraînant des augmentations pathologiques de la liaison plaquettaire-VWF qui conduisent à une dégradation

protéolytique accélérée par ADAMTS13 des grands multimères fonctionnels.

Le type 3 est la forme la plus grave et la plus rare de la maladie de Willebrand, tous les multimères de VWF sont déficitaires et les niveaux de facteur VIII sont généralement très bas.

Les tests de laboratoire (décrits plus loin) pour la maladie de Willebrand permettent de distinguer les différents sous-types, ceux avec des distributions de multimères normales ou seulement subtilement anormales (types 1, 2M et 2N), ceux caractérisés par une diminution significative de la proportion des multimères de haut poids moléculaire (types 2A et 2B), et ceux caractérisés par une perte de tous les multimères (type 3).

C. Maladie de Willebrand acquise

La maladie de Willebrand est principalement une maladie héréditaire, mais, plus rarement, des syndromes acquis de maladie de Willebrand (AVWS) ont été décrits [2],[8]. Seulement 266 cas ont été signalés dans la littérature depuis sa première description en 1968 jusqu'à 1999.

Ils sont caractérisés par l'absence d'antécédent personnel ou familial de saignement ainsi qu'une révélation tardive. Il se peut que la prévalence de Willebrand acquis soit sous estimée, et qu'elle représente en fait jusqu'à 4,5% des maladies de Willebrand diagnostiquées [9]. Les tests de laboratoire pour le diagnostic de syndrome acquis de maladie de Willebrand sont les mêmes que ceux pour la maladie de Willebrand héréditaire.

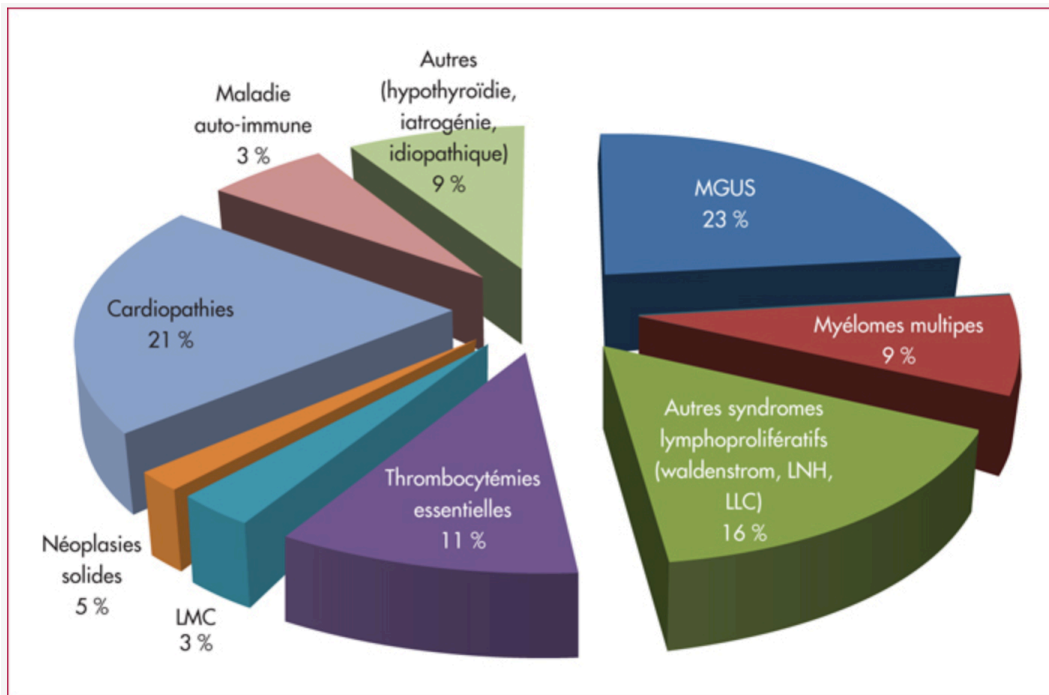


Figure 4. Pathologies associées au syndrome de Willebrand acquis

Pauline Sauguet, Alexandre Theron. Syndrome de Willebrand acquis et hémophilie acquise. *Hématologie*. 2015;21(5):295-302.

Selon l'International Society of Thrombosis and Haemostasis (ISTH), les Willebrand acquis sont plus susceptibles de survenir chez les patients atteints de syndrome lymphoprolifératif (48%) ou de syndrome myéloprolifératif (NMP) (15%) [10],[11],[12], de malformations cardiaques (21%), de tumeurs solides (5%) ou de maladies auto-immunes (2%).

Chez la plupart des patients ayant un Willebrand acquis, la synthèse du facteur Willebrand est conservée, à l'exception des patients atteints d'hypothyroïdie, qui présentent de manière caractéristique une diminution de sa synthèse ou de sa libération.

Chez les patients présentant une synthèse normale de facteur Willebrand, le taux diminué de VWF circulant résulte de son élimination accélérée du plasma par quatre principaux mécanismes pathogéniques : [13]

1. des auto-anticorps qui forment des complexes immuns circulants avec le VWF et l'inactivent, augmentant sa clairance (cas des Willebrand acquis associés aux gammopathies monoclonales ou aux syndromes lymphoprolifératifs)

2. l'absorption sélective du facteur Willebrand par des cellules anormales ou des plaquettes (cas des Willebrand acquis associés aux syndromes myéloprolifératifs notamment)
3. la perte de multimères de haut poids moléculaire dans des conditions de fortes contraintes de cisaillement (cas des Willebrand acquis associés aux rétrécissements aortiques)
4. l'augmentation de la protéolyse du facteur Willebrand induite par des enzymes pas clairement identifiées (des protéases plaquettaires pourraient être impliquées)

Chez les patients avec des auto-anticorps, la totalité du VWF natif, normalement sécrétée par les cellules endothéliales, est généralement éliminée de la circulation. Cela se traduit par de très faibles concentrations à la fois d'activité du facteur Willebrand et d'antigène (VWF:Ag), mais des niveaux normaux de propeptide VWF sont maintenus [14].

Les Willebrand acquis associés à un syndrome myéloprolifératif résultent principalement de l'absorption in vivo des multimères de haut poids moléculaire sur les plaquettes malignes [9] (notamment chez les patients avec une numération plaquettaire élevée, supérieure à 1500 G/L). Cela a été rapporté dans la thrombocytémie essentielle et la polyglobulie de Vaquez, mais aussi dans la leucémie myéloïde chronique, la myélofibrose primitive et parfois dans la leucémie aiguë.

Chez ces patients, l'activité du cofacteur de la ristocétine du VWF (VWF:RCo) diminue. Certains auteurs ont pour cela suggéré de rechercher un syndrome de Willebrand acquis pour chaque patient avec un syndrome myéloprolifératif présentant un nombre de plaquettes supérieur à 1000 G/L [15],[16].

Dans les cas de maladie de Willebrand acquise due à des conditions de forces de cisaillement élevées (patients présentant une sténose valvulaire aortique ou un dispositif d'assistance ventriculaire gauche à flux continu), il y a une élimination préférentielle des multimères de haut poids moléculaire. Une contrainte de cisaillement élevée induit le déploiement du facteur Willebrand et par conséquent son clivage protéolytique. Il en résulte une activité réduite du VWF, avec des concentrations de VWF relativement normales.

Plus rarement, un mécanisme supplémentaire à considérer est l'augmentation de la dégradation protéolytique du facteur Willebrand, qui se produit dans certaines conditions cliniques caractérisées par la présence de protéases circulantes. Il en résulte une activité réduite du VWF avec des concentrations relativement normales.

Par rapport à l'hémophilie acquise, qui est toujours due à des auto-anticorps contre le FVIII, les mécanismes pathogénétiques sous-jacents aux Willebrand acquis sont plus hétérogènes. Aucun de ces mécanismes ne semble être spécifique d'une seule étiologie particulière, le même mécanisme peut être retrouvé dans différents troubles sous-jacents connus pour être associés au syndrome [14].

Par conséquent, le Willebrand acquis a une présentation clinique hétérogène et le syndrome n'est souvent pas reconnu jusqu'à ce que les patients soient exposés à un traumatisme majeur ou à une chirurgie.

La gravité du saignement varie considérablement d'un patient à l'autre.

Les objectifs du traitement d'un syndrome de Willebrand acquis sont: de contrôler les saignements aigus, de prévenir les saignements dans les situations à haut risque, et d'obtenir une rémission à long terme. Les stratégies utilisées pour atteindre ces objectifs dépendent des mécanismes pathologiques sous-jacents. Les options thérapeutiques comprennent la desmopressine et certains concentrés de facteur VIII qui contiennent également du facteur Willebrand. Un traitement adapté de la maladie sous-jacente peut inverser les manifestations cliniques et biologiques de Willebrand acquis [9].

Malheureusement, il n'est pas toujours possible et l'obtention d'une rémission partielle du trouble sous-jacent n'entraîne pas toujours une amélioration des symptômes hémorragiques liés au Willebrand acquis [17].

De nombreux cas de Willebrand acquis mettent en évidence une diminution des multimères de haut poids moléculaire [11]. Dans ces cas là, la présentation biologique est semblable au type 2A, avec un proportion diminuée de multimères de haut poids moléculaire [18].

2. Syndromes myéloprolifératifs et maladie de Willebrand acquise

A. Généralités

Les syndromes ou néoplasies myéloprolifératives (NMP) non LMC – thrombocytémie essentielle (TE), polyglobulie de Vaquez (PV) et myélofibrose primitive (MFP) – sont des maladies acquises des cellules souches hématopoïétiques, avec augmentation d'une ou plusieurs lignées myéloïdes. Janus Kinase 2 V617F (JAK2V617F) est la mutation la plus courante, présente chez 95% des patients atteints de PV et de 50% à 60% des patients atteints de TE ou de MFP.[19]

B. Complications thrombotiques et hémorragiques des syndromes myéloprolifératifs

Les événements thrombotiques sont décrits dans tous les sous-types de syndromes myéloprolifératifs. Une méta-analyse récente, a déterminé la prévalence de thrombose globale à 28,6%, 20,7% et 9,5% des patients nouvellement diagnostiqués PV, TE, et MFP, respectivement [20].

Concordant avec d'autres observations, la thrombose artérielle (prévalence globale, 16,2%; cérébrovasculaire, 7,4%; accident ischémique transitoire, 3,5%; maladie coronarienne, 6,1%) est plus courante que la thrombose veineuse (prévalence globale, 6,2%; thrombose veineuse profonde, 3,4%; thrombose veineuse splanchnique, 1,4%; embolie pulmonaire, 0,9%; thrombose veineuse cérébrale, 0,7%). Le risque de thrombose est augmenté chez les personnes de plus de 60 ans et chez celles ayant un antécédent de thrombose, et il est plus élevé chez les patients présentant ces deux facteurs de risqué [21].

Bien que moins répandue que la thrombose, la prévention ou la gestion des manifestations hémorragiques est tout aussi importante chez les patients atteints de syndrome myéloprolifératif. Dans la méta-analyse susmentionnée, la prévalence globale des complications hémorragiques était de 6,2% [20]. Le risque de saignement dépend du sous-type de syndrome myéloprolifératif [22],[23]. La prévalence la plus élevée a été observée dans

la MFP (8,9%), suivie de la TE (7,3%) et de la PV (6,9%). Les sites de saignement fréquents sont cutanéomuqueux, gastro-intestinaux, épistaxis et post-opératoires.

Le saignement dans les syndromes myéloprolifératifs est souvent multifactoriel, certains facteurs de risque étant évidents et d'autres moins, non retrouvés d'une étude à l'autre.

Concernant les facteurs de risque NMP-dépendant, la thrombocytose affecte le risque de saignement. Dans une étude longitudinale de cohorte de patients atteints de TE (N=776), une numération plaquettaire supérieure à la normale dans le suivi a conféré un risque accru de saignement (HR, 3,7; IC à 95%, 1,7-8,2) [11].

La leucocytose augmente également de façon indépendante le risque de saignement dans une étude sur la myélofibrose primitive et la thrombocytémie essentielle (HR, 1,74; P=0,04), de même que dans une méta-analyse incluant des patients avec TE et PV (RR, 1,87; IC à 95%, 1,59-2,23) [22],[24].

C. Maladie de Willebrand acquise et syndromes myéloprolifératifs

La numération plaquettaire est un fort prédicteur de la survenue d'un syndrome de Willebrand acquis. Une numération plaquettaire significativement plus élevée a été observée chez les patients atteints de Willebrand acquis. Néanmoins, la plupart des patients avec une maladie de Willebrand acquise ont un nombre de plaquettes inférieur à 1000 G/L [12].

Par conséquent, le dépistage d'un Willebrand acquis pourrait faire partie intégrante de l'évaluation de routine des patients TE et PV, indépendamment de leur numération plaquettaire. La présence de la mutation JAK2 V617F à elle seule semblant être un élément principal pour le développement d'AVWS chez les patients TE [12].

Chez les patients atteints de syndrome myéloprolifératif, l'âge médian de survenue d'un Willebrand acquis est de 48 ans, avec un sex ratio 1:1. Chez les patients-NMP avec un Willebrand acquis, il a été constaté que la prévalence de Willebrand de type 2 est plus élevée (66%) que celle de Willebrand de type 1 (33%) [11].

3. Techniques de dosage et maladie de Willebrand

Le diagnostic de maladie de Willebrand repose sur des tests incluant la mesure de l'activité du cofacteur de la ristocétine (VWF:RCo), le dosage antigénique du facteur Willebrand (VWF:Ag) et l'activité procoagulante du facteur VIII plasmatique.

Pour les différents sous-types de Willebrand, des tests supplémentaires analysent les multimères de Willebrand, la fixation du collagène par le facteur Willebrand (VWF:CB), l'activité de liaison du facteur Willebrand au GPIb plaquettaire ou encore l'agrégométrie des plaquettes induite par la ristocétine (RIPA). Le recours à l'étude génétique du facteur Willebrand est rare.

A. Les différentes techniques de dosage du VWF:RCo

La mesure de l'activité cofacteur de la ristocétine est la technique fonctionnelle pour évaluer la **fonction** adhésive du facteur Willebrand. Elle est utilisée pour le diagnostic ainsi que pour la surveillance du traitement.

Mesure de l'activité cofacteur de la ristocétine en agrégométrie

Ce test utilise l'antibiotique ristocétine qui induit une modification conformationnelle du facteur Willebrand, lui permettant de se lier aux plaquettes via le récepteur plaquettaire de la glycoprotéine 1b (GP1b), entraînant une agglutination plaquettaire.

Sur automate ATRACT® 4004 (agrégomètre à 4 canaux de mesure photométrique), le test utilise:

- des plaquettes normales fixées et lyophilisées (plaquettes fixées par du formol afin d'empêcher l'activation in vitro et donc de ne doser que le VWF du plasma)
- une concentration de ristocétine de 1 à 1,5 mg/mL
- plusieurs dilutions de plasma du patient à tester

A l'aide de plusieurs dilutions du plasma pauvre en plaquettes du patient, l'agrégomètre explore le seuil de concentration en ristocétine qui induit au moins 30% d'agglutination en

mesurant la pente d'agrégation. Le dosage est évalué en pourcentage par rapport à une droite d'étalonnage.

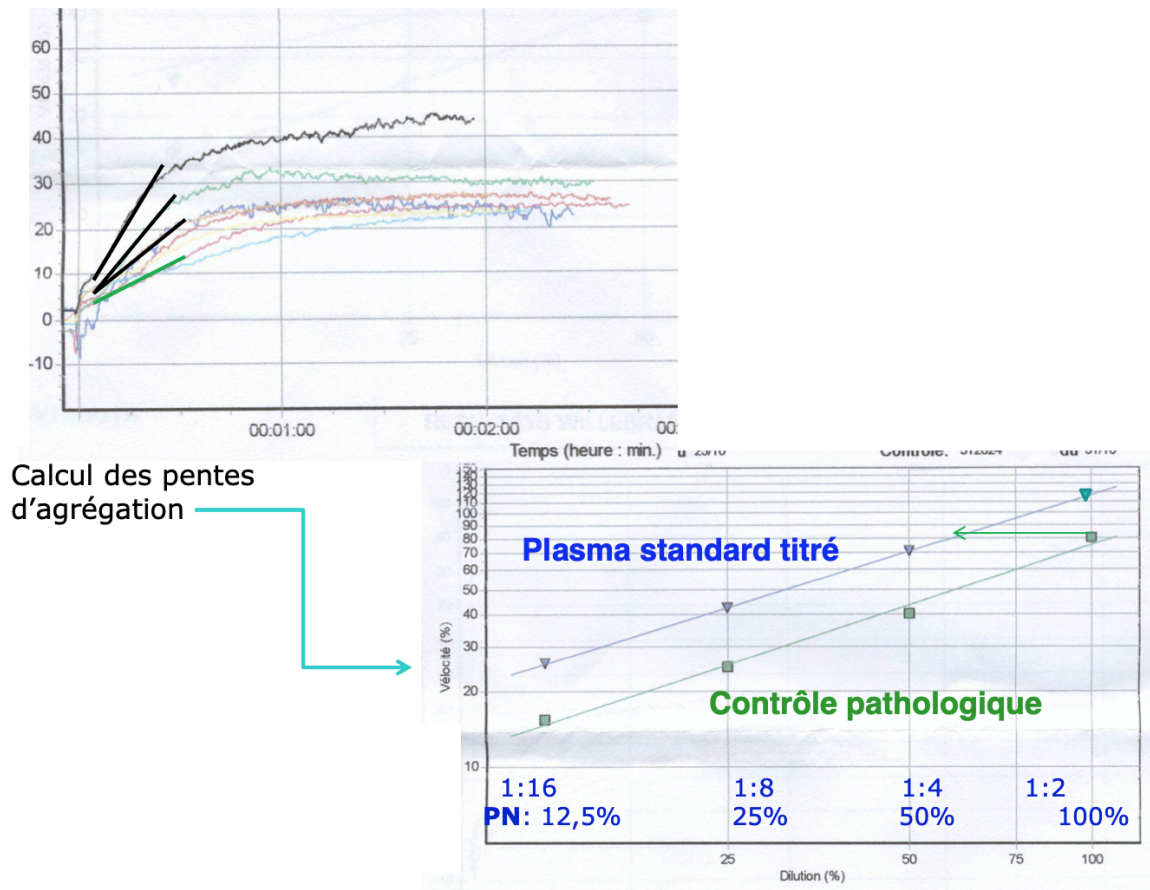


Figure 5. Lecture VWF:RCo en agrégométrie

La mesure du VWF:RCo par agrégométrie est la méthode de référence pour l'évaluation de l'activité du facteur Willebrand. Cependant cette méthode présente des limites: elle nécessite une expertise technique et possède une mauvaise sensibilité et reproductibilité, avec d'importantes variations intra- et inter- laboratoires, notamment pour la détection de faibles niveaux de VWF.

Du fait de ces limites, d'une plus grande disponibilité de l'automatisation et du besoin d'une meilleure efficacité, d'autres méthodes pour évaluer la fonction adhésive du facteur Willebrand ont été développées.

Mesure de l'activité cofacteur de la ristocétine avec HemosIL VWF:RCo® IL

Des analyses automatisées ont été développées, tel que le test HemosIL RCo Werfen®, une immuno-analyse sur les systèmes ACL TOP®. D'autres méthodes ont également été développées, utilisant des techniques de cytométrie en flux, chimioluminescence ou encore ELISA.

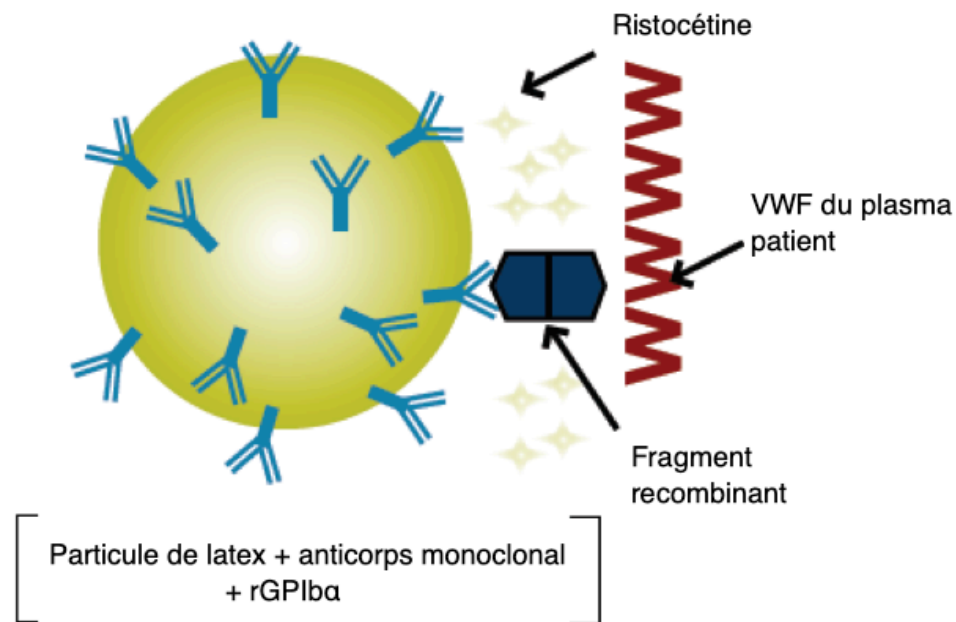


Figure 6. Représentation de la liaison entre une bille de latex et le facteur Willebrand avec le test HemosIL VWF:RCo Werfen®

Le réactif HemosIL VWF:RCo est un test immunoturbidimétrique au latex destiné à quantifier l'activité VWF:RCo dans le plasma citraté. L'activité VWF est déterminée en mesurant l'augmentation de turbidité produite par l'agglutination de particules de latex contenues dans le réactif correspondant. Ce test n'utilise pas de plaquettes. Celles-ci ont été remplacées par des particules de latex sur lesquelles ont été adsorbées, par l'intermédiaire d'un anticorps monoclonal spécifique, des fragments recombinants de la glycoprotéine du récepteur plaquettaire du VWF (rGP1ba). En présence de ristocétine, le facteur Willebrand du patient va interagir avec le fragment GP1ba. L'importance de l'agglutination est directement proportionnelle à l'activité en facteur Willebrand de l'échantillon et est déterminée en mesurant la diminution de la lumière transmise due à la formation d'aggrégats.

Avec ristocétine (VWF:RCo)					
	Agglutination sur lame	Agrégométrie	Automates	LIA (HemosIL VWFRCo, IL)	Chimi-Luminescence (HemosIL AcuStar VWFRCo, IL)
Réactifs					
-Plaquettes fixées	X	X	X		
-rGPIb α				X	
- Acs monoclonaux					X
Performances analytiques					
seuil de quantification (<i>sensibilité</i>)	2 UI/dl	10 UI/dl	3 à 10 UI/dl <i>Selon adaptation</i>	3,5 UI/dl	< 1 UI/dl
CV (<i>reproductibilité</i> Interlaboratoires)		21% et 32%*			
Interséries		15% à 20%	<15% ^{\$}	<5% [§]	<10%
dosage unitaire (<i>adaptation à l'urgence</i>)	Oui	Non	Non	Oui	Oui
Performances diagnostiques					
-VWD3 vs sévère VWD1	Oui	Non	Non	Oui	Oui
-VWD2 vs VWD1	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui

Tableau 2. Performances analytiques des différents tests de mesure de l'activité VWF (liaison à la GP1b)

* Résultats des EEQ de l'ECAT (Meijer, 2006) : CV moyens obtenus respectivement sur 3 plasmas normaux et 4 plasmas anormaux

\$ CV interséries de 1,5% (90UI/dl) à 15% (5 UI/dl) pour Hillarp sur BCS; <4% (91 UI/dl) à <6% (25 UI/dl) pour Lawrie sur CS ; 12% (160 UI/dl) à 7% (54 UI/dl) pour Redealli sur ACL

§ CV interséries de 4% (111 UI/dl) à 2,8% (29 UI/dl) pour Piñol sur ACL TOP

B. Dosage quantitatif du facteur Willebrand

Il ne permet que le dosage quantitatif de la protéine sans présager d'une anomalie qualitative. Le calcul du rapport VWF:RCo/VWF:Ag est utilisé pour diagnostiquer une maladie de Willebrand de type 2A, 2B ou 2M. Un rapport < 0,6 indique que le VWF est dysfonctionnel.

Il existe différentes méthodes immunologiques pour le dosage quantitatif du VWF:

- Test immunoturbidimétriques (LIA)
- Tests immunoenzymatiques (ELISA, ELFA)
- Tests en immunochimiluminescence (AcuStar, IL)

Ces tests se distinguent par leur sensibilité aux taux bas de VWF.

Méthode immunoturbidimétrique (LIA)

Elle est basée sur l'immunoagglutination de particules de latex recouvertes d'anticorps complet anti-VWF.

En l'absence d'antigène, les micro particules inférieures à la longueur d'onde ne s'agglutinent pas, le milieu est quasi transparent, la lumière est faiblement absorbée:

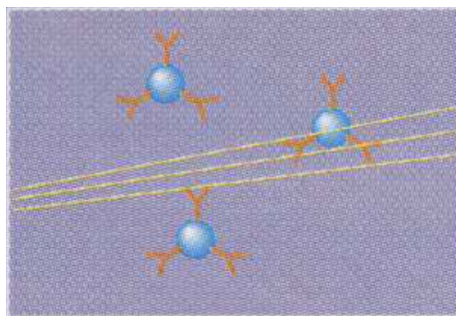


Figure 7. Méthode LIA

En présence de l'antigène à doser, la réaction antigène-anticorps entraîne l'agglutination des micro particules. L'augmentation de turbidité du milieu réactionnel est fonction du taux d'antigène présent:

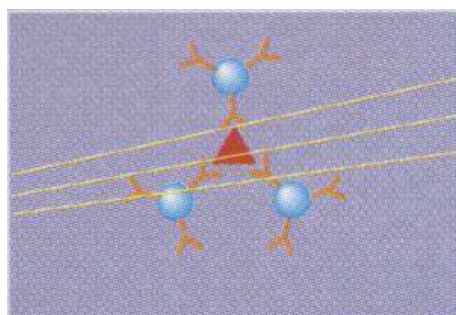


Figure 8. Méthode LIA (suite)

La méthode immunoturbidimétrique est la plus largement utilisée. C'est une méthode automatisée, avec une calibration unique par lot de réactif. Ses limites sont:

- un seuil de quantification = 6 UI/dL (ne permettant pas le diagnostic de type 3)

- une interférence liée au facteur rhumatoïde avec le Fc des Ig de l'anticorps anti-VWF (surestimation du taux)
- effet « crochet » en excès d'antigène (sous-estimation du taux)

Méthode immunoenzymatique ELISA

C'est la méthode de référence pour le diagnostic de maladie de Willebrand de type 3.

Son seuil de quantification est inférieur à 1 UI/dL et il n'y a pas d'interférence avec le facteur rhumatoïde. Ses limites sont:

- non automatisée, non adaptée au dosage unitaire
- la calibration doit être répétée à chaque série de tests

Méthode immunoenzymatique ELFA (sur analyseur VIDAS, Biomérieux)

Elle combine une méthode ELISA sandwich utilisant des anticorps monoclonaux anti-VWF avec une lecture finale en fluorescence. C'est une méthode automatisée, à l'abri d'interférence avec le facteur rhumatoïde, qui peut être unitaire, avec précalibration mémorisée. Ses limites sont:

- un seuil de quantification < à 5 UI/dL (ne permettant pas le diagnostic de type 3)

Méthode immunochimiluminescence (HemosIL AcuStar)

Méthode récente, elle utilise des billes magnétiques recouvertes d'un anticorps polyclonal anti-VWF. Après ajout d'un anticorps traceur couplé à l'isoluminol, la lumière émise en présence d'un réactif oxydant et catalyseur est mesurée. Ses avantages sont:

- l'absence d'interférence du facteur rhumatoïde
- automatisée et unitaire
- un seuil de quantification inférieur à 1 UI/dL
- sensibilité équivalente à l'ELISA permettant le diagnostic de type 3

	ELISA	ELFA	LIA	Chimiluminescence
Réactifs				
Acs polyclonaux				
- Ig totales	X			
- F(ab') ₂			X	
Acs monoclonaux		X		X
Performances analytiques				
- seuil de quantification (<i>sensibilité</i>)	<1UI/dl	1 à 5 UI/dl	6UI/dl	<1UI/dl
- CV inter-laboratoires* (<i>reproductibilité</i>)	13,5% et 19,2%	<i>Non évalués</i>	8,8% et 14,7%	<i>Non encore évaluée</i>
- interférence FR (<i>spécificité</i>)	Non	Non	Oui	Non (jusque 800 UI/ml)
- dosage unitaire (<i>adaptation à l'urgence</i>)	Non	Oui	Oui	Oui
Performances diagnostiques				
-VWD3 vs VWD sévère	Oui	Non	Non	Oui

Tableau 3. Différents dosages antigéniques du facteur Willebrand

C. Quantification des multimères de haut poids moléculaire

L'étude de la répartition des multimères du facteur Willebrand permet de quantifier les formes de différents poids moléculaires et d'identifier les anomalies structurales de l'unité multimérique.

Le principe est la migration des protéines au sein d'un gel sous l'action d'un courant électrique. Les protéines ayant le poids moléculaire le plus faible peuvent se déplacer plus facilement au sein du gel et vont donc migrer plus loin pour une même durée de migration. Au contraire, les multimères de très haut poids moléculaire vont avoir une capacité de migration réduite.

L'analyse est qualitative et quantitative, et s'intéresse à la présence et la répartition des multimères présents dans l'échantillon. Une distribution normale doit retrouver toutes les tailles de multimères: bas poids moléculaire, poids moléculaire intermédiaire et haut poids moléculaire.

Basée sur la réalisation d'une électrophorèse en gel d'agarose-SDS, cette technique complexe et manuelle est uniquement réalisée dans des laboratoires très spécialisés.

Principe du test:

- l'échantillon est dilué selon le taux de VWF
- migration électrophorétique en gel d'agarose (18 heures)
 - o de faible résolution (0,7 à 1%): formes ULMW
 - o de résolution moyenne (1,4 à 2%)
 - o de forte résolution (2,3 à 3%): étude de structure de triplet de l'unité multimérique
- révélation immunoenzymatique (18 heures) par anticorps anti-VWF marqué à la phosphatase alcaline
- coloration (6 heures) par substrat NBT/BCIT
- évaluation quantitative par densitométrie des formes de
 - o LMW (< 5 mers)
 - o IMW (6 à 10 mers)
 - o HMW (> 10 mers)
 - o ULMW (> 15 mers)

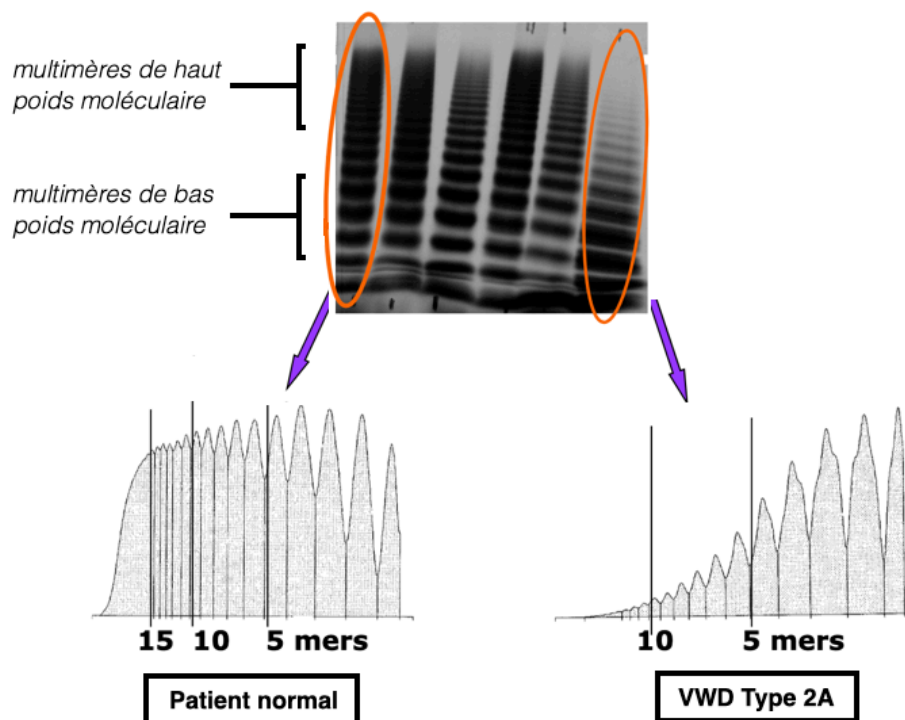


Figure 9. Expression des résultats d'une électrophorèse de multimères de Willebrand

La Figure 10 montre différents profils obtenus selon le type de maladie de Willebrand. Les types 2A et 2B montrent une perte des multimères de haut poids moléculaire, par rapport au patient normal, qui n'est pas retrouvée dans le type 2M.

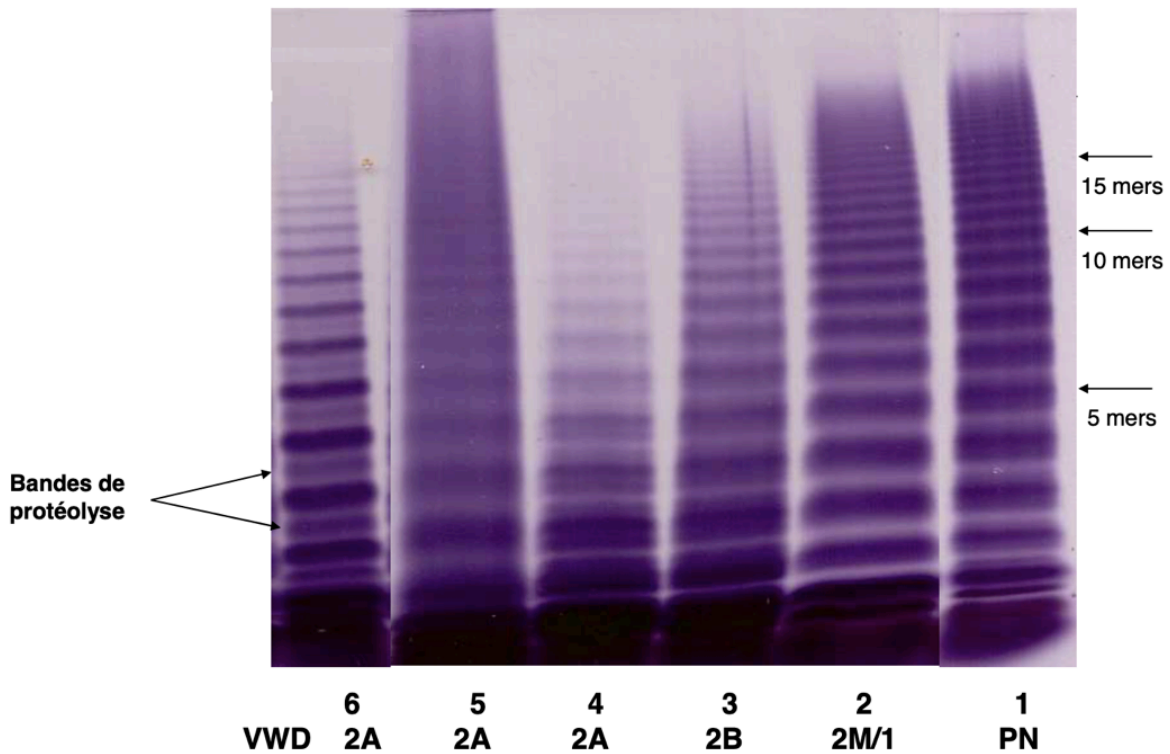
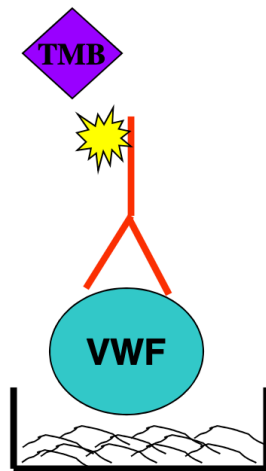


Figure 10. Exemple de profils multimériques. PN = patient normal

D. Collagen-binding

La mesure de la liaison du facteur Willebrand au collagène (VWF:CB) est un test qualitatif indépendant de la liaison du facteur Willebrand à la Gp1b, mais dépendant du degré de multimérisation. En effet, en évaluant la capacité du facteur Willebrand à adhérer au collagène, il identifie les anomalies qualitatives de l'interaction VWF-plaquettes en rapport avec la perte des multimères de haut poids moléculaire du Willebrand.

Il existe plusieurs tests ELISA commercialisés dont les performances dans la différenciation des sous-types de Willebrand varient beaucoup selon la source de collagène.



E- Lecture à 490 nm

D- Substrat TMB/H₂O₂
développement de coloration en 10 mn

C- Anti VWF-HRP polyclonal (Dako)
incubation 2 heures à θ ambiante

B- Plasma à tester
dilué en PBS/Tween/SAB pH 7,4
incubé 2 heures à θ ambiante

A- Collagène HORM à 50 μ g/ml en sol.glucose pH 2,8
immobilisé pendant 72h à θ ambiante
sur support plastique amorphe

Figure 11. Principe du test Collagen-binding

Intérêts et limites du test:

- seuil de quantification = 1 UI/dL
- bonne discrimination entre type 1 (quantitative) et type 2 (qualitatif) dans 90% des cas
- distingue mieux que le RCo les sous-types de Willebrand déficients en multimères de haut poids moléculaire (2A et 2B) des types 1
- mais le plus souvent normal dans les types 2M
- ne peut remplacer le VWF:RCo

4. Objectif du travail

Le but de cette étude est de comparer les performances de deux dosages, l'HemosIL WVF:RCo Werfen® sur ACL 500 avec le VWF:RCo mesuré par agrégométrie, chez des patients atteints de thrombocytose (plaquettes > 450 G/L) dans le contexte de syndrome myéloprolifératif et chez les patients atteints de thrombocytose secondaire.

ARTICLE

HemosIL VWF:RCo reagent: a more sensitive reagent than the reference technique for the detection of acquired von Willebrand disease in thrombocytosis related to myeloproliferative neoplasms

Running title: acquired von Willebrand disease in MPN related thrombocytosis

Pierre Laporte^{1*} ; Marie Tuffigo^{2*} ; Anne Ryman¹ ; Mathieu Fiore¹ ; Etienne Rivière^{3,4} ; Jean-François Viillard^{3,4} ; Chloé James^{1,4}

* : contributed equally to this work

¹ CHU de Bordeaux, Laboratory of Hematology , F-33600 Pessac, France

² CHU d'Angers, Laboratory of Hematology, F-49100 Angers, France

³ CHU de Bordeaux, Internal Medicine, F-33600 Pessac, France

⁴ University of Bordeaux, UMR1034, Inserm, Biology of Cardiovascular Diseases, F-33600 Pessac, France

Address correspondence to: Chloe James, INSERM UMR 1034, CHU Haut-Lévêque, 1 avenue Magellan, 33600 Pessac. Phone: +33-5-57-89-19-79; E-mail: chloe.james@inserm.fr.

Key words: Acquired von Willebrand disease/ Myeloproliferative neoplasms/ Thrombocytosis

Number of words (excluding figure legends): 2995

1. Introduction

Von Willebrand factor (VWF) is a multimeric plasma glycoprotein synthesized by endothelial cells and megakaryocytes. VWF promotes platelet adhesion and aggregation via binding to platelet glycoprotein (Gp)Iba and GpIIb-IIIa receptors under high shear conditions at the site of vascular injury. The high-molecular-weight multimers (HMWM) carry the most important hemostatic effect.

Accurate diagnosis of Von Willebrand disease (VWD) requires correlation of patient's bleeding history, various laboratory tests and family studies. The initial panel of laboratory tests usually consists of factor VIII coagulant activity level (FVIII:C), VWF antigen (VWF:Ag) and VWF adhesive activity such as ristocetin cofactor activity (VWF:RCo). Once the diagnosis of VWD is established, more specialized tests including FVIII binding assay, ristocetin-induced platelet agglutination (RIPA), multimer analysis or collagen binding assay (VWF:CB) may be carried out for subtyping.

Acquired von Willebrand syndrome (AVWS) is a rare bleeding disorder, similar to inherited von Willebrand disease in terms of laboratory findings and clinical severity. It is characterized by variably low levels of VWF activity and factor VIII. The syndrome usually occurs in individuals with no personal or family history of bleeding [25].

Myeloproliferative neoplasms (MPNs) are acquired clonal hematopoietic stem cell disorders, characterized by an increase in one or more myeloid lineages. The Philadelphia chromosome-negative (Ph-) MPNs include polycythemia vera (PV) with an excess of red blood cells, essential thrombocythemia (ET) with an increase of platelets and primary myelofibrosis (PMF). Arterial and venous thromboses are the main causes of morbidity in Ph-negative MPNs but bleeding complications are also reported in 6.2% patients [26]. It is well admitted that thrombocytosis increases bleeding risk, especially when platelet count exceeds 1500 G/L. In a longitudinal cohort study of 5776 ET patients, a platelet count above normal range conferred an increased risk of bleeding during the follow up (HR, 3.7; 95% CI, 1.7-8) [27].

Bleeding risk is particularly present when Acquired von Willebrand syndrome develops. AVWS is said to result from in vivo absorption of HMWM on malignant platelets, leading to reduced von Willebrand factor activity [28]. MPN associated AVWS is frequent when platelets exceed 1500 G/L but may occur with lower platelet count [1]. Some authors have therefore suggested

to look for an AVWS for all MPN patients with MPN with a platelet number greater than 450 G/L [29].

For functional assessment of VWF, aggregometry (RCo(Agg)) is considered to be the gold standard [30]. This assay uses the antibiotic ristocetin that induces a conformational change in VWF allowing it to bind to platelets via the platelet GP1b-receptor resulting in platelet agglutination. The main limitations of this assay are labour intensiveness, requirement of technical expertise, poor sensitivity at low levels of VWF and high intra- and inter- assay variabilities. Because of these limitations, greater availability of automation and need for greater efficiency, various assays for determination of VWF adhesive function using different methodologies have been developed in recent years. One example is the HemosIL VWF:RCo kit, a latex particle enhanced immunoturbidimetric assay which has been successfully automated for use on modern instruments.

The aim of this study was to evaluate the performance of HemosIL VWF:RCo, Werfen® versus aggregometry in patients with thrombocytosis (platelets > 450G/L) in the context of MPN (T-MPN) and in patients with secondary thrombocytosis (ST).

2. Patients and methods

Study population

From 2014 to 2017, 33 patients MPN with increased platelet count (≥ 450 G/L) were enrolled at the University Hospital of Bordeaux, France, after giving informed consent. MPN diagnoses were made according to WHO 2008 criteria. These patients were included in the group of Thrombocytosis with MPN (T-MPN).

At the same time, patients with thrombocytosis (platelets ≥ 450 G/L) in the context of iron deficiency or inflammation were included in the group of Secondary thrombocytosis (ST). Iron deficiency was diagnosed when ferritin was ≤ 4 $\mu\text{g/L}$ and inflammatory thrombocytosis when CRP was $\geq 12,6$ mg/L.

All investigations were approved by the local ethics committee (Comité de Protection des Personnes Sud Ouest et Outre Mer III DC 2015/94). The procedures are in accordance with the Declaration of Helsinki of 1975, revised in 2000.

Blood collection and plasma preparation

Blood was collected into sterile EDTA, then assayed on DXH Beckman Coulter analyzer. Platelet-poor plasma was isolated from citrated blood by double centrifugation at 2400g for 15 minutes at room temperature, aliquoted, and stored at -80°C prior to testing.

VWF:RCo Aggregometry

VWF:RCo(Aggregometry) was assayed by evaluating the rate of agglutination of lyophilised platelets-HELENA® (kept at +4°C, reconstituted with 5 mL of Tris-Buffered-Saline (TBS)) and using ristocetin-HELENA® (reconstituted with 1.5 mL of distilled H₂O, concentration 10mg/mL), in a APACKT 4004 aggregometer. The calibration used a control plasma (reconstituted with 1 mL of distilled H₂O) with a known level of VWF. The calibration curve and each patient used 200 µL of lyophilized platelets and 25 µL of ristocetin. Patients platelet-poor plasma were thawed 3 min at 37°C just before analysis. The samples were analyzed with half and quarter dilutions.

VWF:RCo HemosIL werfen® and other automatized assays

The HemosIL VWF:RCo and other automatized complementary tests were run on an ACL TOP®550 or 750 Family Systems analyser. The HemosIL VWF:RCo assay was performed according to the manufacturer's instructions. Briefly, this technique is a latex particle enhanced immunoturbidimetric assay to quantify VWF:RCo activity in citrated plasma. A recombinant fragment of glycoprotein platelet receptor of VWF (rGP1ba) is coated to the latex particles and in the presence of ristocetin, VWF interacts with the GP1ba, leading to latex particles agglutination. VWF antigen level was measured with the VWF Antigen Werfen® assay, a method based on latex immunoassay. Coagulant factor VIII level was determined using the HemosIL FVIII Werfen® reagent, a chromogenic technique. The VWF:RCo/VWF:Ag ratio was calculated for each patient, the cutoff used for the diagnosis of Von Willebrand disease in the two techniques was VWF:RCo/VWF:Ag < 0.6.

Multimeric distribution of VWF and VWF Collagen Binding Assay

For patients with VWF:RCo/VWF:Ag < 0.6 with either technique, the distribution of VWF multimers was studied using gel electrophoresis as well as the binding capacity of VWF to collagen (VWF:CB) using an ELISA method. Multimeric analysis of VWF was carried out by electrophoresis of plasma samples using a gel with 1.5% of agarose in SDS. The multimers

where then visualised using an antihuman VWF labelled antibody. For CBA assay, we used microtiter plates coated with purified type III human collagen (SouthernBiotech®).

Statistical analysis

Continuous variables were expressed as mean with standard deviation value, and categorical variables were expressed as counts and percentages. Comparison between techniques (Aggregometry vs HemosIL) was made by using paired t tests. Comparison between groups (T-MPN patients vs ST patients) was made by using unpaired t tests. The correlation between the VWF:RCo(HemosIL)/VWF:Ag ratio and the platelet count was evaluated by Pearson correlation test, as well as the correlation between the VWF:RCo(HemosIL)/VWF:Ag ratio and collagen-binding activity.

All analyses were performed with the statistical software GraphPad Prism. $P \leq 0.05$ was the threshold for statistical significance.

3. Results

Patient characteristics

33 patients with MPN and 18 with ST were analysed, with a mean platelet number of 775 ± 291 and 914 ± 274 G/L ($p = 0.1005$) respectively. The characteristics of these samples are summarized in **Table 1**. There was no significant difference in mean age or platelet count. Among 33 MPN patients, 28 (85%) had essential thrombocythemia with either JAK2 mutation (19 patients), CALR mutation (3 patients), MPL mutation (2 patients), or triple-negative (4 patients). 2 patients (6%) had polycythemia vera with JAK2 mutation and 3 patients (9%) had primitive myelofibrosis (2 CALR and 1 JAK2). Mutation status was diagnosed by molecular biology at the University Hospital of Bordeaux. 4 (12%) MPN patients had no JAK2, MPL or CALR mutation. In patients with reactive thrombocytosis, 2 (11%) had iron deficiency and 16 (89%) an inflammatory syndrome (burned, surgery, trauma).

Comparison of VWF:RCo(aggregometry) with VWF:RCo(HemosIL) in T-MPN patients

Given that acquired Von Willebrand syndrome can be observed in MPN patients with high platelet counts, we decided to compare VWF:RCo in these patients using the reference technique of aggregometry and an automatized immunoturbidimetry technique called HemosIL

VWF:RCo Werfen®. Mean VWF:RCo was $92\% \pm 39\%$ with the reference technique and $48\% \pm 30\%$ with HemosIL assay (**Fig. 1A**). Mean VWF:RCo/VWF:Ag ratio was 0.82 ± 0.21 with the reference technique and 0.44 ± 0.24 with HemosIL assay (**Fig. 1B**). Mean Willebrand antigen level was $115\% \pm 41\%$ and FVIII level was normal ($114\% \pm 45\%$) for all patients (not shown). There was a significant difference between the two techniques for VWF:RCo and for VWF:RCo/VWF:Ag ratio ($p < 0.0001$ and $p < 0.0001$ respectively). A majority of T-MPN patients 23/33 (70%), had VWF:RCo/Ag ratio < 0.6 with the RCo Werfen assay but not with the aggregometry assay.

Comparison of VWF:RCo(aggrometry) with VWF:RCo(HemosIL) in ST patients

We then wondered whether the significant difference we observed in VWF:RCo between both techniques was related to the context of MPN. We thus aimed to measure VWF:RCo in control patients with secondary thrombocytosis. As with MPN patients, we observed a significant difference between aggregometry and HemosIL. VWF:RCo was $164\% \pm 68\%$ with the reference technique and $124\% \pm 56\%$ with HemosIL assay (**Fig. 2A**) and mean VWF:RCo/VWF:Ag ratio was 0.92 ± 0.23 with the reference technique and 0.69 ± 0.16 with HemosIL assay (**Fig. 2B**). Contrary to MPN patients, the majority of patients (12 i.e. 66%) with secondary thrombocytosis had VWF:RCo/Ag ratio > 0.6 with both techniques.

Measurement of VWF:RCo with HemosIL only identifies a biological AVWS in T-MPN patients.

Comparison of the ratio VWF:RCo(aggrometry)/VWF:Ag between both groups of patients with thrombocytosis did not show any significant difference (**Fig. 3A**), suggesting that acquired Von Willebrand Syndrom was not frequent in these patients. On the contrary, in the same patients, the difference of ratio VWF:RCo(HemosIL)/VWF:Ag was highly significant between T-MPN and ST patients (**Fig. 3B**). **Fig 3C** shows a graphical representation of all subjects with thrombocytosis and the VWF:RCo/VWF:Ag ratio with both RCo quantification techniques. 30/51 (59%) subjects had discordant results between the two techniques. 24 were from samples of T-MPN patients (73% (24/33) of T-MPN patients) but only 6 were from ST patients (6/18 i.e. 33% of ST patients). All but one discordant results were a ratio VWF:RCo/VWF:Ag < 0.6 with HemosIL but > 0.6 with aggregometry. We thus hypothesized that VWF:RCo(HemosIL) was more sensitive than aggregometry to detect AVWS.

Analysis of VWF multimers electrophoresis and collagen-binding assay in concordant patients

To find out whether thrombocytic patients with low VWF:RCo/VWF:Ag ratio with HemosIL but normal with aggregometry had AVWS that was only detected with the HemosIL assay, we aimed to perform VWF multimers electrophoresis and collagen-binding (CB) assays. We first analysed patients with concordant results. We observed that all patients who had a VWF:RCo/VWF:Ag ratio > 0.6 with HemosIL and aggregometry had normal HMWM distribution (**Fig. 4A**) and normal CB assay (**Table 2**), and that one patient with a VWF:RCo/VWF:Ag ratio < 0.6 with HemosIL and aggregometry had a slight decrease in HMWM distribution (**Fig. 4A**) and a CB assay just at the threshold of normality (**Table 2**). One patient with a VWF:RCo/VWF:Ag ratio < 0.6 with HemosIL and aggregometry had a normal HMWM distribution (**Fig. 4**) and a normal CB assay (**Table 2**). Altogether, among 14 patients with concordant VWF:RCo/VWF:Ag ratio with HemosIL and aggregometry, only one had a discordant HMWM distribution or CB assay. This suggests that HMWM distribution and CB assay are appropriate tests to assess the presence or absence of high molecular weight VWF.

Analysis of VWF multimers electrophoresis and collagen-binding assay in discordant patients

VWF multimers electrophoresis and collagen-binding (CB) assays were then carried out on 29 patients (23 T-MPN and 6 ST patients) with low VWF:RCo/VWF:Ag ratio with HemosIL but normal with aggregometry (discordant patients). Among 23 T-MPN patients with discordant results, 4 (17%) actually had a decrease in HMWM with CB < 0.6 , 2 (8%) only had a decrease in HMWM and 1 only had CB < 0.6 (**Table 3**). Among 6 ST patients with discordant results, no decrease in HMWM or CB reduction was found (**Table 3**). These results show that HemosIL VWF:RCo assay allowed to diagnose 7 patients with acquired Von Willebrand disease that were not detected with the gold standard technique.

Correlation between VWF:RCo(HemosIL)/VWF:Ag ratio and platelet count

It is well described that MPN-associated acquired Von Willebrand syndromes are observed in patients with high platelet count (> 1000 G/L) and even more when platelets are > 1500 G/L [4]. We thus wondered whether the biological AVWS we identified in T-MPN patients with the HemosIL assay correlated with high platelet count. We found a slight correlation between VWF:RCo(IL)/VWF:Ag ratio and platelet count in T-MPN patients ($r_s = 0.27$, $p = 0.0013$) but not in ST patients ($r_s = 0.06$, $p > 0.33$) (**Fig. 5**).

Among MPN patients, we studied 3 patients before and after cytoreductive treatment (**Fig. 6**). 2/3 patients normalized their platelet count and VWF:RCo(IL)/Ag ratio after treatment, suggesting that the detected anomaly was related to the platelets count, as conventionally described in AVWS associated with MPN.

4. Discussion

Bleeding is an important cause of morbidity and mortality in patients with MPN and the association between high platelet count and increased risk of bleeding due to AVWS among ET and PV patients is well known [31], [32]. Rottenstreich et al [29] studied the factors related to the development of AVWS in ET and PV patients. This study found high prevalences of AVWS among both ET and PV patients and significantly higher platelet counts were found among patients with AVWS. Nevertheless, most patients with AVWS, 67% and 75% of ET and PV patients respectively, had platelet counts below 1000 G/L. Moreover, the rate of AVWS was not different between patients with platelet counts of 500 - 1000 G/L and those with platelet counts above 1000 G/L. Most patients who experienced major bleeding had platelet counts lower than 1000 G/L. In the aforementioned study, VWF activity was assayed with the HemosIL®VWF:RCo, not with the aggregometry method. The aim of our study was to compare these two techniques to evaluate which one is the most accurate. We found discordant results in MPN patients between the two techniques. In our study, using VWF multimer analysis and VWF collagen binding assay, which are more sensitive in the diagnosis of AVWS, HemosIL®VWF:RCo assay allowed us to diagnose 7 patients with AVWS that were not detected with the aggregometry method.

Until a few years ago, the ristocetin cofactor assay, by aggregometry or manual techniques [33], was the only available method to determine VWF adhesive function. With the requirement for greater efficiency and improved reproducibility, automated assays for determination of VWF adhesive capacity have been developed over the years, with different methodologies including automated VWF:RCo using platelets or latex particles, latex immunoassay (LIA), enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), chemiluminescence and flow cytometry. Several studies [32],[33],[34] have evaluated the performance of these assays versus the reference method. Sagheer et al evaluated the HemosIL® AcuStar chemiluminescence assay (Acu) and the HemosIL® latex immunoassay (Act) as diagnostic tests for VWD and identification of type 2 VWD in comparison with the ristocetin cofactor assay performed by aggregometry (Agg).

Sensitivity for detection of type 2 VWD was found to be higher with VWF:RCo(Acu) than with (VWF:RCo(Agg) or VWF:RCo(Act) (100% vs 94% and 82% respectively) and specificity was determined 100% with VWF:RCo(Act), 88% with VWF:RCo(Agg) and 82% with VWF:RCo(Acu). Similar to us, a discordance was observed between the different techniques in a number of patients with type 2 VWD, with the VWF:RCo(Acu) giving lower activity results than the VWF:RCo(Agg) and thus allowing improved differentiation of type 2 VWD. In addition, the VWF: RCo(Acu) method has the ability to report a lower measured result than the VWF:RCo(Agg) in samples with <10 IU /dL, giving the potential of greater accuracy in testing type 3 and severe type 1 VWD.

The HemosIL VWF:RCo kit is a latex particle enhanced immunoturbidimetric assay that was developed to quantify VWF:RCo activity in citrated plasma. VWF activity is determined by measuring the increase in turbidity produced by the agglutination of latex particles. A recombinant fragment of glycoprotein platelet receptor of VWF (rGP1ba) is coated to the latex particles by means of a specific monoclonal antibody. In the presence of ristocetin, VWF of patient sample interacts with the GP1ba. The degree of agglutination is directly proportional to the activity of VWF in the sample and is determined by measuring the decrease of transmitted light caused by the aggregates. The main difference between the two techniques we studied is the use of lyophilised platelets with the aggregometry method. This could be an explanation for the discordant results we observed, although platelet aggregometry method is notoriously subject to high inter and intra-laboratory variation, offering poor sensitivity to low levels of VWF activity [32]. The mechanisms involved in this finding remain to be elucidated.

Among MPN patients, we studied 3 patients with ET before and after cytoreductive treatment (**Fig. 6**). 2/3 patients normalized their platelet count and VWF:RCo(IL)/Ag ratio after treatment, suggesting that the detected anomaly was related to the platelets count, as conventionally described in AVWS associated with MPN. This observation is in accordance with Rottenstreich et al who showed that the administration of cytoreductive treatment was associated with lower rates of AVWS among ET patients. The lower platelet count (which is a significant predictor for AVWS) associated with cytoreductive treatment seems to account for this finding.

In this study, we found that HemosIL RCo reagent seems to be more sensitive than the gold standard technique of aggregometry to detect a change in the profile of HMWM in thrombocytic

MPN patients. This study raises two questions. First, when VWF:RCo(IL)/VWF:Ag is inferior to 0,6 but HMWM are normal on electrophoresis and VWF:CB is normal, should these patients be considered as “pre-acquired Von Willebrand disease”? Second, what is the clinical relevance of these biological findings ? Is a VWF:RCo(IL)/VWF:Ag ratio inferior to 0,6 associated with increased bleeding risk or a contraindication to bone marrow biopsy ? Prospective studies are needed to assess the ability of this technique compared to aggregometry to predict the occurrence of bleeding.

Acknowledgments

The authors wish to thank Etienne Rivière and Jean-François Viillard for their help in patient recruitment. We are grateful to Anne Ryman and Mathieu Fiore for helpful discussions. We are also grateful to the French Intergroup Myeloproliferative (FIM).

Sources of funding

This study was supported by research grants from INSERM, The Fondation Bettencourt Schueller.

Disclosure of conflicts of interest

The authors declare no competing financial interest.

Author contributions

P.L, M.T and A.R and contributed to designing and performing experiments, analysis and interpretation of data, and preparing the manuscript. A.R and M.F contributed to performing experiments, analysis and interpretation of data, and preparing the manuscript. E.R and J.F.V contributed to provide patients blood sample and prepare the manuscript. C.J. contributed to supervising the study, designing experiments, analysis and interpretation of data, and preparing the manuscript. All authors discussed the results and commented on the manuscript.

5. Tables and figures

Table 1

	Patients		p value
	T-MPN (n = 33)	ST (n = 18)	
Age, years	59 ± 19 (17 - 88)	55 ± 17 (23 - 83)	0,3574
Gender M/F	16/17	10/8	
Platelet count (G/L)	775 ± 291 (450 - 1437)	914 ± 274 (515 - 1354)	0,1005
Essential thrombocythemia	28	NA	
Polycythemia vera	2	NA	
Primitive myelofibrosis	3	NA	
JAK2 V617F positivity	22/33	NA	
CALR positivity	5	NA	
MPL positivity	2	NA	
JAK2, CALR, MPL negativity	4	NA	
CRP (mg/L)	NA	95 (12,6 - 309)	
Ferritin (µg/L)	NA	4	
Sepsis	NA	2	
Inflammatory sd	NA	2	
Iron deficiency	NA	2	
Post-operative	NA	4	
Burned	NA	4	
Post-traumatic	NA	4	

Table 2

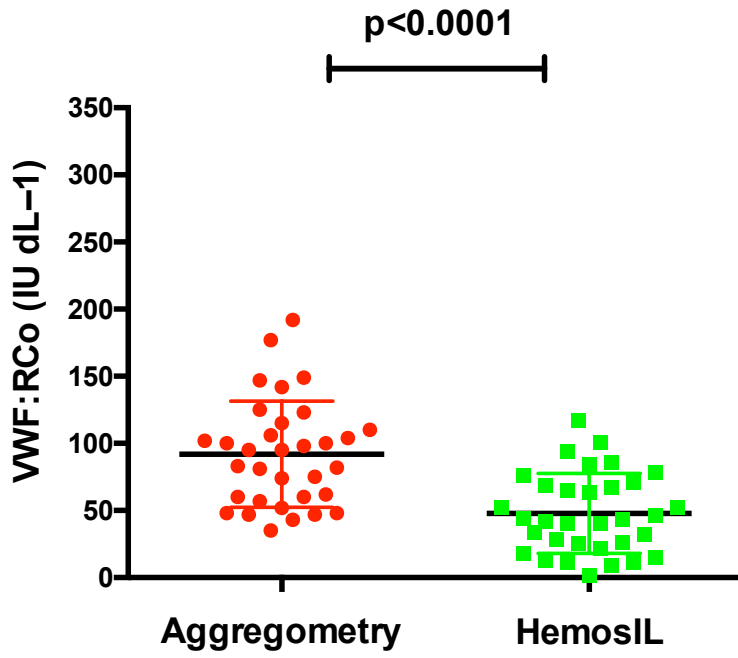
Patients	Plt	RCo(IL)	RCo(Agg)	VWF:Ag	RCo(IL)/Ag	RCo(agg)/Ag	Multimers	CBA
MPN	705	22	35	64	0,34	0,55	Normal	0,81
	711	86	115	110	0,78	1,05	Normal	0,91
	652	15	60	102	0,15	0,59	Slight decrease in HMWM	0,6
	622	52	75	77	0,68	0,97	Normal	0,99
	534	76	125	93	0,82	1,34	X	X
	518	78	147	99	0,79	1,48	X	X
	948	63	74	103	0,61	0,72	Normal	0,89
	662	84	98	121	0,69	0,81	Normal	0,87
ST	548	261	275	374	0,70	0,74	X	
	1011	98	94	123	0,80	0,76	Normal	
	1354	183	192	221	0,83	0,87	Normal	
	1174	149	217	214	0,70	1,01	Normal	
	922	116	136	175	0,66	0,78	Normal	
	784	80	107	115	0,70	0,93	X	
	567	34	51	46	0,74	1,11	Normal	
	1190	178	210	204	0,87	1,03	X	
	515	51	60	52	0,98	1,15	X	
	650	108	147	171	0,63	0,86	Normal	
	761	111	188	111	1,00	1,69	Normal	
	637	169	193	225	0,75	0,86	Normal	

Table 3

Patients	Plt	RCo(IL)	RCo(Agg)	VWF:Ag	RCo(IL)/Ag	RCo(agg)/Ag	Multimers	CBA
	1350	13	43	64	0,20	0,67	Decrease in HWMW	0,56
	496	40	102	114	0,35	0,89	Normal	0,89
	796	65	177	180	0,36	0,98	Normal	0,84
	450	101	192	170	0,59	1,13	Normal	0,98
	820	46	95	145	0,32	0,66	Normal	0,57
	667	40	52	67	0,59	0,78	Decrease in HWMW	0,52
	640	11	60	91	0,12	0,66	Decrease in HWMW	0,33
MPN	1376	34	110	166	0,20	0,66	Normal	0,89
	1386	9	47	75	0,12	0,63	Decrease in HWMW	0,59
	649	94	123	164	0,57	0,75	Normal	0,8
	498	28	104	141	0,20	0,74	Normal	0,62
	1200	32	100	104	0,31	0,96	Normal	0,65
	452	43	149	150	0,29	0,99	Normal	0,79
	486	42	62	84	0,50	0,74	Normal	0,93
	916	71	142	193	0,37	0,74	Normal	0,97
	863	67	83	111	0,58	0,75	Normal	0,89
	861	18	48	51	0,35	0,94	Normal	1,2
	596	117	95	174	0,67	0,55	Normal	0,83
	543	25	82	86	0,29	0,95	Slight decrease in HWMW	0,79
	660	52	106	150	0,35	0,71	Normal	0,78
	814	44	81	103	0,43	0,79	Normal	0,8
	786	69	100	158	0,44	0,63	Slight decrease in HWMW	0,67
	1025	26	57	73	0,36	0,78	Normal	0,4
ST	1428	106	152	184	0,58	0,83	Normal	1,12
	867	201	320	379	0,53	0,84	Normal	0,85
	1134	108	161	217	0,50	0,74	Normal	1,05
	1016	89	121	165	0,54	0,73	Normal	0,65
	900	91	146	195	0,47	0,75	Normal	0,65
	1002	92	183	200	0,46	0,92	Normal	0,72

Figure 1

A



B

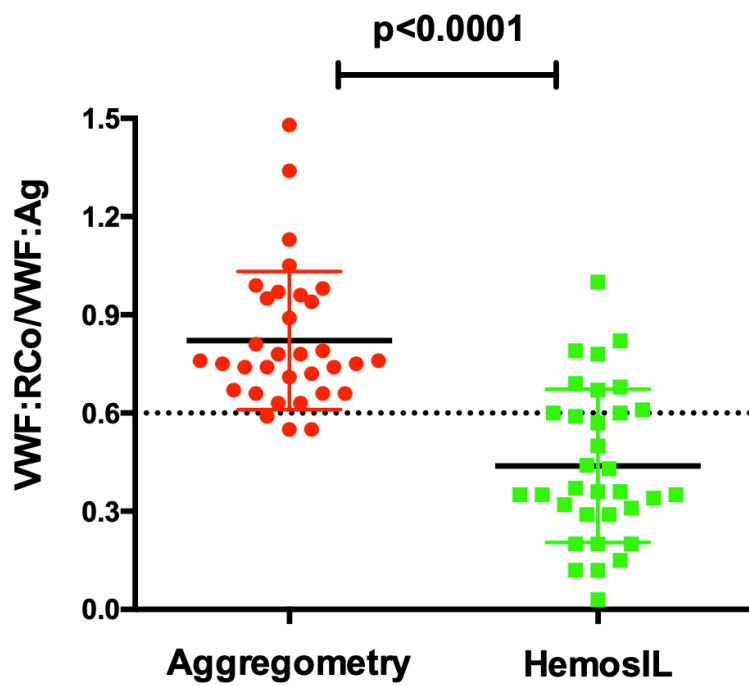
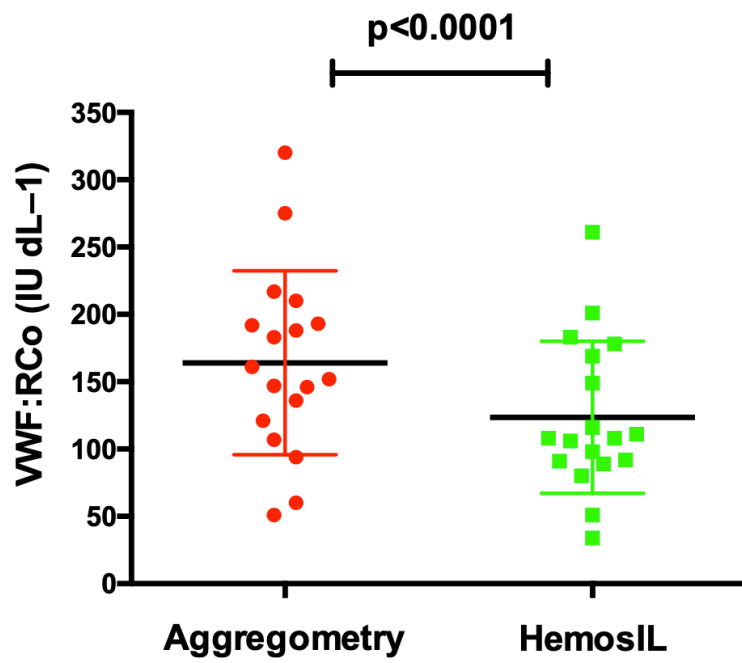


Figure 2

A



B

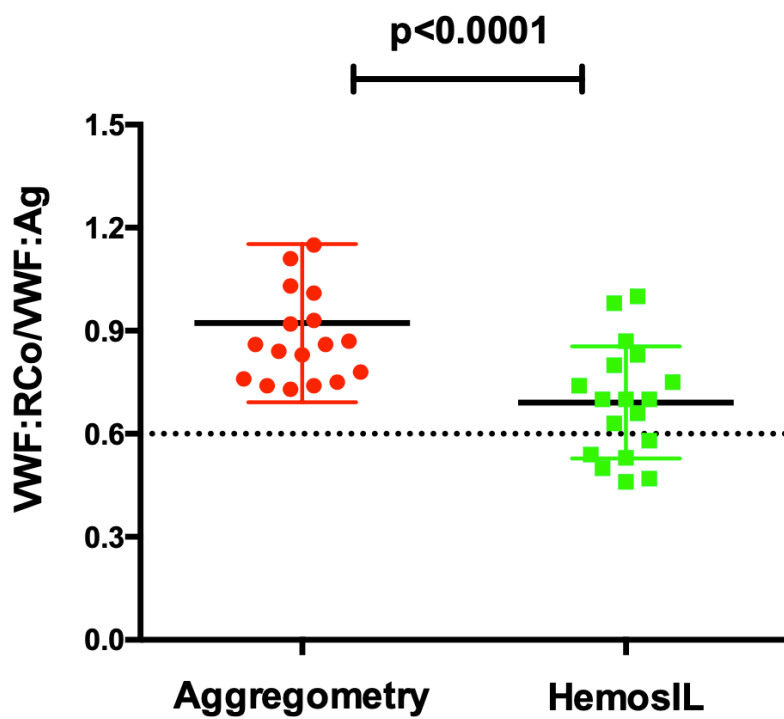
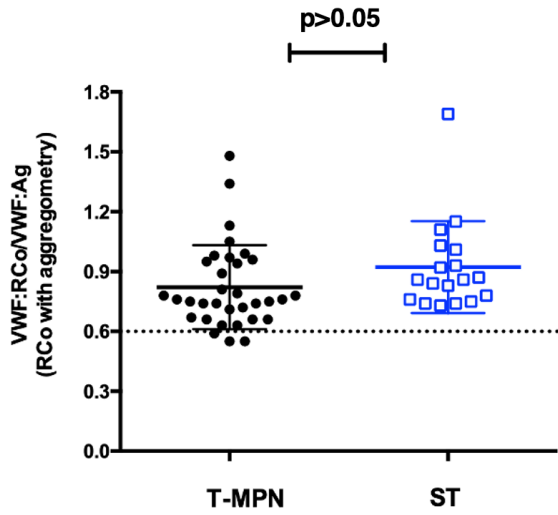
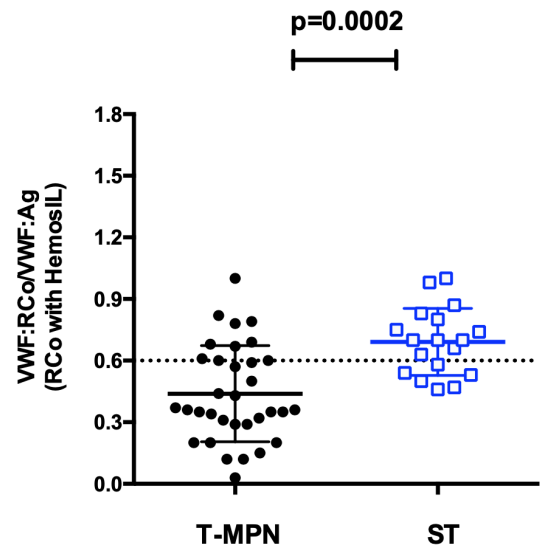


Figure 3

A



B



C

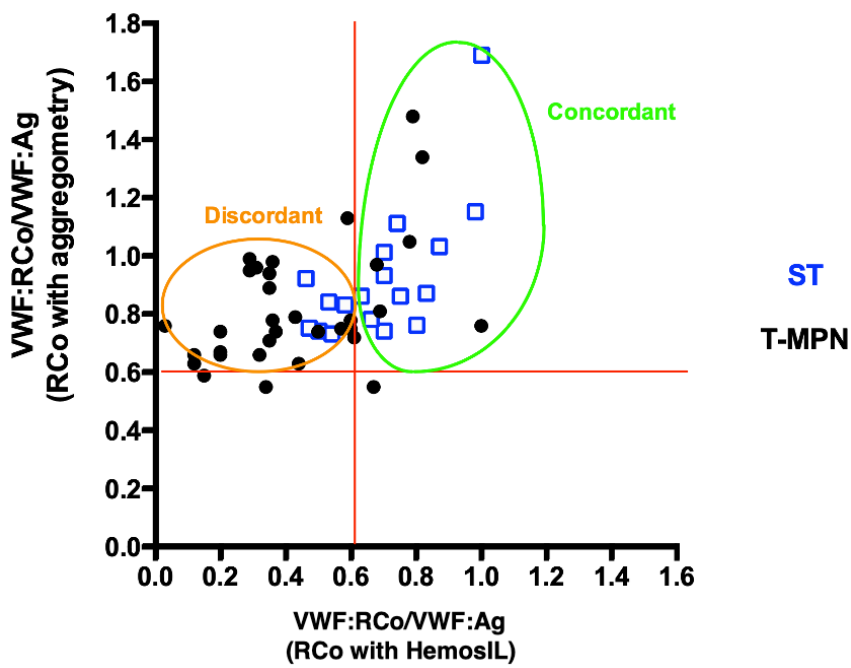


Figure 4

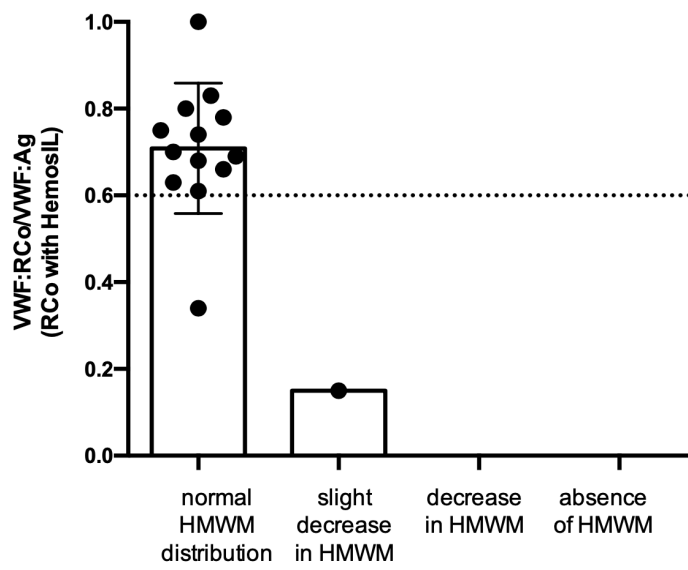


Figure 5

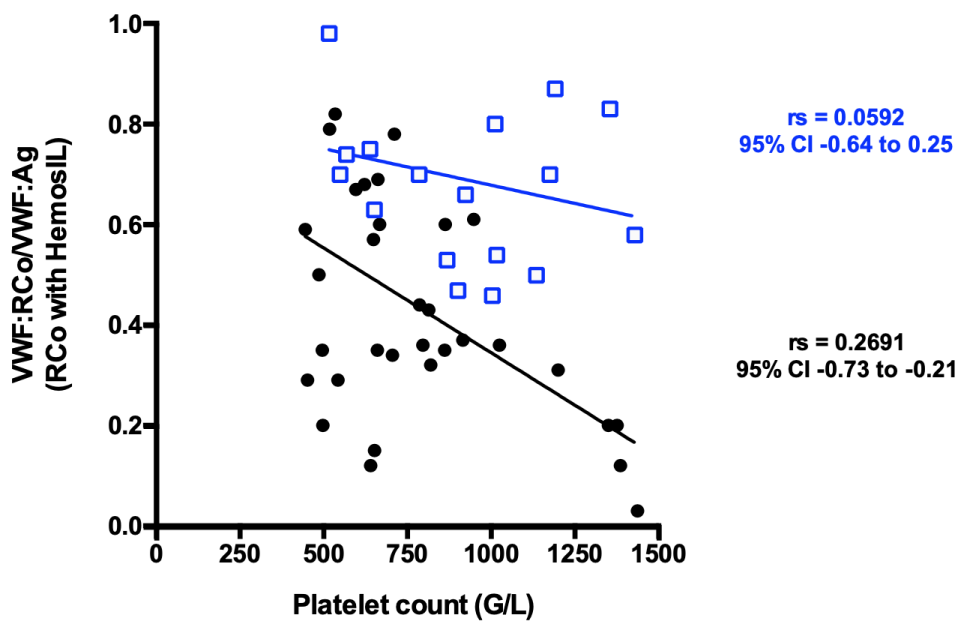
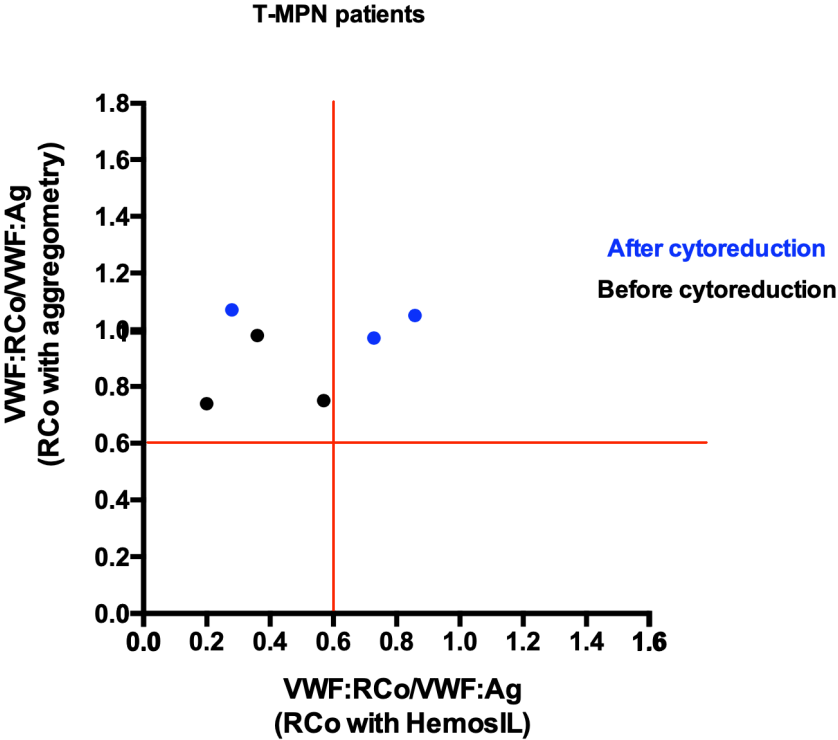


Figure 6



6. Legends

Table 1. Clinical data of patients with thrombocytosis associated with myeloproliferative neoplasm patients (T-MPN) and secondary thrombocytosis (ST). Age and platelet values are reported as mean, SD and range. Unpaired t test was used to compare means of age and platelet count.

Table 2. Patients with concordant VWF:RCo/VWF:Ag results with the two techniques.

VWF:RCo (IL), VWF ristocetin cofactor activity by HemosIL ; VWF:Ag, VWF antigen ; HMWM, high molecular weight multimers ; X, could not be evaluated

Table 3. Patients with discordant VWF:RCo/VWF:Ag results with the two techniques.

VWF:RCo (IL), VWF ristocetin cofactor activity by HemosIL ; VWF:Ag, VWF antigen ; HMWM, high molecular weight multimers ; X, could not be evaluated

Figure 1. Analysis of VWF adhesive function shows different results when using aggregometry and VWF:RCo Werfen in T-MPN patients. (A) VWF:RCo assessment and (B) VWF:RCo/VWF:Ag ratio.

Figure 2. Analysis of VWF adhesive function shows different results when using aggregometry and VWF:RCo Werfen ST patients. (A) VWF:RCo assessment and (B) VWF:RCo/VWF:Ag ratio

Figure 3. Comparison of aggregometry VWF:RCo/VWF:Ag ratio vs HemosIL ratio in the 2 groups.

(A) Aggregometry ratio did not show any significant difference between the 2 groups. **(B)** HemosIL ratio showed a highly significant difference with lower ratio values in MPN patients than in ST patients. **(C)** 30/51 (59%) subjects had discordant results between the two techniques.

Figure 4. Comparison of VWF:RCo/VWF:Ag ratio with HemosIL RCo assay with the distribution of multimers in T-MPN patients.

Subjects with concordant VWF:RCo/VWF:Ag ratio with HemosIL and aggregometry have concordant HMWM distribution.

Figure 5. Correlation between platelet count and VWF:RCo(IL)/VWF:Ag ratio in T-MPN and ST patients.

A slight correlation between VWF:RCo(IL)/VWF:Ag ratio and platelet count (G/L) in T-MPN patients (black line) was observed, $rs = 0.2670$ ($p = 0.0013$) but not in ST patients, $rs = 0.0592$ ($p > 0.33$).

Figure 6. Consequence of cytoreduction.

After cytoreductive treatment, 2/3 patients normalized their platelet count and VWF:RCo(IL)/Ag ratio.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 Sagheer S, Rodgers S, Yacoub O, Dauer R, Mcrae S, Duncan E. Comparison of von Willebrand factor (VWF) activity levels determined by HemosIL AcuStar assay and HemosIL LIA assay with ristocetin cofactor assay by aggregometry. *Haemophilia* 2016; **22**: e200–7.
- 2 Stocksclaeder M, Schneppenheim R, Budde U. Update on von Willebrand factor multimers: focus on high-molecular-weight multimers and their role in hemostasis. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2014; **25**: 206–16.
- 3 Weiss HJ, Hoyer LW, Rickles FR, Varma A, Rogers J. Quantitative Assay of a Plasma Factor Deficient in von Willebrand's Disease that is Necessary for Platelet Aggregation. RELATIONSHIP TO FACTOR VIII PROCOAGULANT ACTIVITY AND ANTIGEN CONTENT. *J Clin Invest* 1973; **52**: 2708–16.
- 4 Sadler JE, Budde U, Eikenboom JCJ, Favalaro EJ, Hill FGH, Holmberg L, Ingerslev J, Lee CA, Lillicrap D, Mannucci PM, Mazurier C, Meyer D, Nichols WL, Nishino M, Peake IR, Rodeghiero F, Schneppenheim R, Ruggeri ZM, Srivastava A, Montgomery RR, et al. Update on the pathophysiology and classification of von Willebrand disease: a report of the Subcommittee on von Willebrand Factor. *J Thromb Haemost* 2006; **4**: 2103–14.
- 5 Furlan M. Von Willebrand factor: molecular size and functional activity. *Ann Hematol* 1996; **72**: 341–8.
- 6 Wagner. Induction of Specific Storage Organelles by van Willebrand Factor Propolypeptide. *Cell*; 1991.
- 7 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**: 1047–51.
- 8 Favalaro EJ. Rethinking the diagnosis of von Willebrand disease. *Thromb Res* 2011; **127**: S17–21.
- 9 Kumar S, Pruthi RK, Nichols WL. Acquired von Willebrand Disease. *Mayo Clin Proc* 2002; **77**: 181–7.

- 10 Federici A, Rand J, Bucciarelli P, Budde U, van Genderen P, Mohri H, Meyer D, Rodeghiero F, Sadler E. Acquired von Willebrand Syndrome: Data from an International Registry: On behalf of the Subcommittee on von Willebrand Factor. *Thromb Haemost* 2000; **84**: 345–9.
- 11 Sanchez-Luceros. Acquired von Willebrand factor abnormalities in myeloproliferative disorders and other hematologic diseases. *Haematologica*; 2002.
- 12 Rottenstreich A, Kleinstern G, Krichevsky S, Varon D, Lavie D, Kalish Y. Factors related to the development of acquired von Willebrand syndrome in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Eur J Intern Med* 2017; **41**: 49–54.
- 13 Federici AB. Acquired von Willebrand syndrome: is it an extremely rare disorder or do we see only the tip of the iceberg? *J Thromb Haemost* 2008; **6**: 565–8.
- 14 Collins P, Budde U, Rand JH, Federici AB, Kessler CM. Epidemiology and general guidelines of the management of acquired haemophilia and von Willebrand syndrome. *Haemophilia* 2008; **14**: 49–55.
- 15 Tefferi A, Barbui T. Personalized management of essential thrombocythemia—application of recent evidence to clinical practice. *Leukemia* 2013; **27**: 1617–20.
- 16 Tefferi A, Barbui T. Polycythemia vera and essential thrombocythemia: 2015 update on diagnosis, risk-stratification and management: Polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Am J Hematol* 2015; **90**: 162–73.
- 17 Tiede A, Rand JH, Budde U, Ganser A, Federici AB. How I treat the acquired von Willebrand syndrome. *Blood* 2011; **117**: 6777–85.
- 18 Michiels JJ, Budde U, van der Planken M, van Vliet HHDM, Schroyens W, Berneman Z. Acquired von Willebrand syndromes: clinical features, aetiology, pathophysiology, classification and management. *Best Pract Res Clin Haematol* 2001; **14**: 401–36.
- 19 James C, Ugo V, Casadevall N, Constantinescu SN, Vainchenker W. A JAK2 mutation in myeloproliferative disorders: pathogenesis and therapeutic and scientific prospects. *Trends Mol Med* 2005; **11**: 546–54.
- 20 Rungjirajitranon T, Owattanapanich W, Ungprasert P, Siritanaratkul N, Ruchutrakool T. A systematic review and meta-analysis of the prevalence of thrombosis and bleeding at

- diagnosis of Philadelphia-negative myeloproliferative neoplasms. *BMC Cancer* 2019; **19**: 184.
- 21 Hultcrantz M, Björkholm M, Dickman PW, Landgren O, Derolf ÅR, Kristinsson SY, Andersson TML. Risk for Arterial and Venous Thrombosis in Patients With Myeloproliferative Neoplasms: A Population-Based Cohort Study. *Ann Intern Med* 2018; **168**: 317.
- 22 Finazzi G, Carobbio A, Thiele J, Passamonti F, Rumi E, Ruggeri M, Rodeghiero F, Randi ML, Bertozzi I, Vannucchi AM, Antonioli E, Gisslinger H, Buxhofer-Ausch V, Gangat N, Rambaldi A, Tefferi A, Barbui T. Incidence and risk factors for bleeding in 1104 patients with essential thrombocythemia or prefibrotic myelofibrosis diagnosed according to the 2008 WHO criteria. *Leukemia* 2012; **26**: 716–9.
- 23 Kaifia A, Kirschner M, Wolf D, Maintz C, Hänel M, Gattermann N, Gökkurt E, Platzbecker U, Hollburg W, Göthert JR, Parmentier S, Lang F, Hansen R, Isfort S, Schmitt K, Jost E, Serve H, Ehninger G, Berdel WE, Brümmendorf TH, et al. Bleeding, thrombosis, and anticoagulation in myeloproliferative neoplasms (MPN): analysis from the German SAL-MPN-registry. *J Hematol Oncol J Hematol Oncol* 2016; **9**: 18.
- 24 Carobbio A, Ferrari A, Masciulli A, Ghirardi A, Barosi G, Barbui T. Leukocytosis and thrombosis in essential thrombocythemia and polycythemia vera: a systematic review and meta-analysis. *Blood Adv* 2019; **3**: 1729–37.
- 25 Stein BL, Martin K. From Budd-Chiari syndrome to acquired von Willebrand syndrome: thrombosis and bleeding complications in the myeloproliferative neoplasms. : 10.
- 26 Rungjirajitranon T, Owattanapanich W, Ungprasert P, Siritanaratkul N, Ruchutrakool T. A systematic review and meta-analysis of the prevalence of thrombosis and bleeding at diagnosis of Philadelphia-negative myeloproliferative neoplasms. *BMC Cancer* 2019; **19**: 184.
- 27 Campbell PJ, MacLean C, Beer PA, Buck G, Wheatley K, Kiladjian J-J, Forsyth C, Harrison CN, Green AR. Correlation of blood counts with vascular complications in essential thrombocythemia: analysis of the prospective PT1 cohort. *Blood* 2012; **120**: 1409–11.
- 28 Jenkis CSP, Philmips DR, Clemmerson KJ, Meyer D, Larrieu M-J, Luscmf EF. Platelet Membrane Glycoproteins Implicated in Ristocetin-Induced Aggregation. : 13.

- 29 Rottenstreich A, Kleinstern G, Krichevsky S, Varon D, Lavie D, Kalish Y. Factors related to the development of acquired von Willebrand syndrome in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Eur J Intern Med* 2017; **41**: 49–54.
- 30 Sagheer S, Rodgers S, Yacoub O, Dauer R, Mcrae S, Duncan E. Comparison of von Willebrand factor (VWF) activity levels determined by HemosIL AcuStar assay and HemosIL LIA assay with ristocetin cofactor assay by aggregometry. *Haemophilia* 2016; **22**: e200–7.
- 31 Rottenstreich A, Kleinstern G, Krichevsky S, Varon D, Lavie D, Kalish Y. Factors related to the development of acquired von Willebrand syndrome in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Eur J Intern Med* 2017; **41**: 49–54.
- 32 Sagheer S, Rodgers S, Yacoub O, Dauer R, Mcrae S, Duncan E. Comparison of von Willebrand factor (VWF) activity levels determined by HemosIL AcuStar assay and HemosIL LIA assay with ristocetin cofactor assay by aggregometry. *Haemophilia* 2016; **22**: e200–7.
- 33 Stufano F, Baronciani L, Pagliari MT, Franchi F, Cozzi G, Garcia-Oya I, Bucciarelli P, Boscarino M, Peyvandi F. Evaluation of an heterogeneous group of patients with von Willebrand disease using an assay alternative to ristocetin induced platelet agglutination. *J Thromb Haemost* 2015; **13**: 1806–14.
- 34 Lawrie AS, Stufano F, Canciani MT, Mackie IJ, Machin SJ, Peyvandi F. A comparative evaluation of a new automated assay for von Willebrand factor activity. *Haemophilia* 2013; **19**: 338–42.