

Université de Montréal

**Caractérisation de l'ADNc et de l'ADN génomique
codant l'intégrine plaquettaire α IIb- β 3 chez un cheval
atteint de Thrombasthénie de Glanzmann**

par

SUSANA MARIA MOUTINHO NEVES MACIEIRA

Département de pathologie et microbiologie

Faculté de médecine vétérinaire

Mémoire présenté à la Faculté de médecine vétérinaire
en vue de l'obtention du grade de
maître en sciences (M.Sc.)
en sciences vétérinaires
option pathologie
Décembre 2010

© Susana Maria Moutinho Neves Macieira, 2010

Université de Montréal

Faculté de médecine vétérinaire

Ce mémoire intitulé

**Caractérisation de l'ADNc et de l'ADN génomique
codant l'intégrine plaquettaire α IIb- β 3 chez un cheval
atteint de Thrombasthénie de Glanzmann**

présenté par

SUSANA MARIA MOUTINHO NEVES MACIEIRA

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes

Malcolm Gains, président-rapporteur

Christian Bédard, directeur de recherche

Jacques G. Lussier, codirecteur

David W. Silversides, membre du jury

Résumé

La thrombasthénie de Glanzmann (TG) est une maladie caractérisée par un défaut d'agrégation plaquettaire. C'est une maladie génétique autosomale récessive causée par une anomalie du récepteur plaquettaire pour le fibrinogène. Ce récepteur est une intégrine localisée à la surface plasmatique qui est formée par un complexe composé des sous-unités α IIb et β 3. Nous avons identifié un cheval démontrant les caractéristiques clinico-pathologiques de la TG. Des études par cytométrie de flux ont révélé une déficience au niveau de la portion α IIb du récepteur. Ces résultats suggèrent une ou plusieurs mutations au niveau du gène codant pour cette portion α IIb du récepteur.

L'objectif de notre étude était de caractériser l'ADNc et l'ADN génomique codant pour les gènes *ITGA2B* et *ITGB3* codant respectivement pour les deux sous-unités α IIb et β 3 chez un cheval atteint de la TG. L'ADNc a été synthétisé par RT-PCR en utilisant l'ARN total récolté à partir des plaquettes. L'ADN génomique a été extrait à partir des globules blancs. Des amorces spécifiques ont été utilisées pour l'amplification par PCR d'*ITGA2B* et d'*ITGB3*. Les séquences d'ADNc et d'ADN génomique de notre patient ont été caractérisées par séquençage et comparées par l'analyse BLAST

(GenBank). Une substitution d'une guanine par une cytosine a été mise en évidence au niveau de l'exon 2 d'*ITGA2B* amenant à la substitution d'une arginine (Arg⁷²) par une proline (Pro⁷²). Ce changement d'acide aminé pourrait résulter en une conformation structurelle anormale qui amènerait à une sous-unité α IIb inactive. L'analyse de l'ADN génomique a démontré que ce cheval était homozygote pour cette mutation. Le séquençage de l'ADN génomique des parents et de la grand-mère du patient a démontré que ces individus étaient hétérozygotes pour cette mutation. Le séquençage d'*ITGB3* n'a démontré aucune anomalie.

MOTS CLÉS : Thrombasthénie de Glanzmann • hémostase • cheval • mutation exon2

Abstract

Glanzmann thrombasthenia (GT) is characterized by a defect of platelet aggregation. This autosomal recessive genetic disorder is caused by an abnormality of the platelet receptor for fibrinogen. This receptor is an integrin located on the plasma membrane formed by a complex of α IIb- β 3 subunits. Recently, we identified a horse with clinical and pathological features of GT. Flow cytometry studies revealed a deficiency of the α IIb subunit suggesting the presence of one or several mutations in the gene encoding for the α IIb subunit.

The aim of this study was to describe this case of GT at the molecular level by characterizing the cDNAs encoding for the β 3 (*ITGB3*) and α IIb (*ITGA2B*) subunits. Total RNA was extracted from platelets and converted into cDNA by reverse transcription using a poly-dT primer. Genomic DNA was extracted from white blood cells. Specific primers for α IIb and β 3 sequences were used to amplify by PCR the corresponding cDNA or genomic regions that were further characterized by sequencing and compared by BLAST analysis (GenBank). A point mutation from G to C in exon 2 of *ITGA2B* was identified, causing a substitution of the expected amino acid arginine 72 (Arg⁷²) by a proline (Pro⁷²). This amino acid change may result in abnormal

structural conformations that yield an inactive α IIb subunit. The analysis of genomic DNA showed that this horse was homozygous for the missense mutation. The genomic DNA sequences encoding exon 2 of the dam, grand dam and the sire were heterozygous for this nucleic acid change and were clinically normal. The analysis of *ITGB3* was unremarkable.

KEY WORDS: Glanzmann thrombasthenia • hemostasis • horse • exon2
mutation

Table des matières

Résumé.....	iii-iv
Abstract.....	v-vi
Table des matières.....	vii-viii
Liste des tableaux.....	ix
Liste des figures.....	x-xi
Liste des sigles et abréviations.....	xii-xiii
Remerciements.....	xiv-xv
INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE 1 – RECENSION DE LA LITTERATURE	
1. Les plaquettes.....	4
1.1 Le sang.....	4
1.2 Thrombopoïèse.....	4
1.3 Morphologie/ Structure.....	7
1.3.1 Système membranaire.....	7
1.3.2 Le cytosquelette.....	10
1.3.3 Système des organelles.....	10
1.4 Interactions plaquettaires.....	11
1.4.1 Adhésion plaquettaire.....	12
1.4.2 Agrégation plaquettaire.....	13
2. Maladies héréditaires plaquettaires intrinsèques.....	15
2.1 Récapitulatif.....	15
2.2 La thrombasthénie de Glanzmann.....	18

2.2.1 Chez l'homme.....	18
2.2.2 L'intégrine $\alpha\text{IIb-}\beta_3$	23
2.2.3 Dans l'espèce canine.....	32
2.2.4 Dans l'espèce équine.....	34
2.2.5 Le cas clinique de l'étude.....	37

CHAPITRE 2 - ARTICLE

Abstract.....	45
Introduction.....	46
Materials and methods.....	48
Results.....	53
Discussion.....	54
Aknowledgments.....	59
References.....	60
Table and figures.....	63

CHAPITRE 3 - DISCUSSION GÉNÉRALE.....69

CHAPITRE 4 – CONCLUSION.....77

BIBLIOGRAPHIE.....78

Liste des tableaux

Tableau I : Récepteurs membranaires plaquettaires, leurs ligands et leurs fonctions biologiques.

Tableau II : Désordres héréditaires plaquettaires intrinsèques décrites en médecine vétérinaire ainsi que les anomalies génétiques associées.

Tableau III : Séquence en acides aminés de l'exon 2 (arginine –R en position 72) chez différentes espèces.

Tableau IV : Séquence en acides aminés de l'exon 24 (arginine –R en position 798) chez différentes espèces.

Liste des figures

Figure 1 : Image de plaquettes au repos et activées, tiré du site <http://fez-zan.blogspot.com/2008/02/4.html>.

Figure 2 : Représentation schématique de la plaquette et de ses organelles.

Figure 3 : Adhésion plaquettaire. Liaison du fvW au récepteur glycoprotéine Ib (GPIb/IX/V) des plaquettes.

Figure 4 : Structure de l'intégrine α IIb- β 3.

Figure 5 : Représentation schématique du gène codant pour la sous unité α IIb (*ITGA2B*) avec les différentes anomalies génétiques pouvant mener à la TG chez l'homme.

Figure 6 : Représentation schématique du gène codant pour la sous unité β 3 (*ITGB3*) avec les différentes anomalies génétiques pouvant mener à la TG chez l'homme.

Figure 7 : Test de rétraction du caillot. (A) Rétraction du caillot chez un cheval contrôle. (B) Absence de rétraction du caillot chez le patient atteint de TG.

Figure 8 : Tracés de thrombélustographie initiés à l'aide de kaolin (A) et de facteur tissulaire recombinant humain (B) chez le cheval atteint de TG (pointillés) et chez le cheval contrôle (lignes).

Figure 9 : Études d'agrégation plaquettaire réalisées sur du plasma riche en plaquettes chez le cheval contrôle (C) et chez le cheval atteint de TG (A).

L'agrégation plaquettaire suite à l'ajout d'ADP (6 μ M) et de collagène (2 μ g/ml) est très diminuée chez le cheval atteint de TG par rapport au cheval contrôle.

Figure 10 : Analyse par cytométrie de flux réalisée chez le cheval atteint de TG, sa mère, sa grand-mère et sur un cheval contrôle. Les anticorps CD41 (anti- α IIb) réagissent positivement avec les plaquettes du cheval contrôle (—), de la mère (—) et de la grand-mère (—) mais ne se lient pas avec la sous unité α IIb des plaquettes du patient (—).

Liste des sigles et abréviations

A : adénosine

ADN : acide désoxyribonucléique

ADNc : acide désoxyribonucléique complémentaire

ADP : adénosine diphosphate

AMPc : adénosine monophosphate cyclique

APTT : le temps de thromboplastine partielle activée

ARN : acide ribonucléique

ARNm : acide ribonucléique messenger

C : cytosine

Ca²⁺ : calcium

CD : cluster de différenciation

D : acide aspartique

G : guanine

GP: glycoprotéine

H : histidine

IgG : immunoglobuline G

kDa : kilodalton

L : leucine

N : asparagine

P : proline

PFA-100 : platelet function analyser (un appareil qui analyse la fonction plaquettaire)

PT : le temps de prothrombine

Pb : paires de base

Q : glutamine

R : arginine

Séquence de liaison RGD : séquence arginine-glycine-acide aspartique

T : thymine

TEG : thrombélastographie

TG: Thrombasthénie de Glanzmann

fvW: facteur de von willebrand

μm : micromètre

μl : microlitre

À Angéline, Anna, Jean et Jocelyn,

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier le Dr Christian Bédard de m'avoir donné les moyens de réaliser ce travail. Merci d'avoir cru en moi. Merci de votre appui et de vos conseils toujours très précieux.

Mes remerciements vont également au Docteur Jacques Lussier. Il a constamment porté un regard pertinent, constructif et pédagogue sur mon travail. Merci pour m'avoir encadrée et soutenue. Merci de m'avoir fait bénéficier de vos vastes connaissances, de votre confiance et surtout de votre patience à mon égard.

Je remercie chaleureusement également les membres et le personnel technique de l'équipe du Docteur Jacques Lussier.

Merci au Dr G. Rivard (Hôpital de Ste-Justine) ainsi qu'à toute son équipe technique.

Merci à Mr Todaro et à sa famille.

C'est avec une immense tendresse que je remercie mes parents pour leur aide, leur soutien et leur indulgence.

Introduction

La Thrombasthénie de Glanzmann (TG) a été décrite pour la première fois en médecine humaine, en 1918 (Glanzmann 1918). Le tableau clinique de la TG chez l'homme est variable : certains patients présentent seulement quelques ecchymoses alors que d'autres ont des hémorragies fréquentes, sévères et parfois fatales. Les sites hémorragiques sont clairement définis et se situent surtout au niveau des muqueuses (purpura, épistaxis, gingivorragies, ménorragies). Les saignements gastro-intestinaux et les hématuries sont moins fréquents. Dans la plupart des cas, les saignements débutent rapidement après la naissance, même si la TG est parfois diagnostiquée plus tardivement (Bray, Rosa et al. 1987; George, Caen et al. 1990). Le syndrome est transmis sur un mode autosomique récessif (Caen 1966). Il est dû à des anomalies quantitatives ou qualitatives de l'intégrine $\alpha\text{IIb}-\beta_3$. Ce récepteur d'adhérence des cellules est essentiel pour l'agrégation plaquettaire et permet la formation d'un clou hémostatique en cas de bris vasculaire (Nurden 2006). Le diagnostic présomptif repose sur la présence d'un tableau clinique compatible et des tests de laboratoire démontrant une absence d'agrégation plaquettaire en réponse aux stimuli physiologiques et associés à une numération et une morphologie plaquettaire normales. Le diagnostic final est

établi lorsque le déficit de l'intégrine $\alpha\text{IIb-}\beta_3$ est confirmé habituellement par cytométrie de flux.

En médecine vétérinaire, la TG est une maladie héréditaire rare mais dont la prévalence n'est pas véritablement connue. Récemment, une pouliche de 18 mois de race Oldenbourg a été présentée au Centre hospitalier universitaire vétérinaire de l'Université de Montréal pour des hématomes d'origine indéterminée. Suite aux caractéristiques clinico-pathologiques et à des études par cytométrie de flux, nous avons pu diagnostiquer un premier cas de TG au Canada. Les études par cytométrie de flux ont révélé une déficience au niveau de la portion $\alpha\text{IIb-}\beta_3$ de la glycoprotéine membranaire. Les résultats de cette première étude suggéraient une ou plusieurs mutations au niveau du gène codant pour la portion αIIb du récepteur (Macieira, Rivard et al. 2007). Les objectifs de notre étude étaient dans un premier temps de caractériser l'ADNc et l'ADN génomique codant l'intégrine plaquettaire αIIb chez le cheval atteint de TG. Ensuite, nous voulions mettre en évidence la(es) mutation(s) qui selon les études réalisées par cytométrie de flux localisait l'anomalie au niveau du gène codant pour la portion αIIb de la glycoprotéine. L'ADNc codant la sous unité β_3 de l'intégrine a également été caractérisé pour s'assurer qu'il n'y avait aucune anomalie. Ensuite, l'analyse de l'ADN génomique nous a permis de préciser si notre (nos) mutation(s) étaient de

nature homozygote ou hétérozygote. Finalement une étude génomique sur la parenté (père, mère et grand-mère) du cheval atteint de TG a également été réalisée dans le but de confirmer la récessivité de la transmission de la maladie. Le but de notre étude était également de pouvoir caractériser la(es) mutation(s) chez notre cheval atteint de TG et pouvoir ainsi comparer avec les 2 différentes mutations déjà décrites dans l'espèce équine.

CHAPITRE 1 – RECENSION DE LA LITTERATURE

1. LES PLAQUETTES

1.1 Le sang

Le sang est un tissu conjonctif liquide formé de cellules libres, dont le plasma est la substance fondamentale. Le sang joue des rôles importants dans l'organisme, par exemple, il assure une double fonction de transport, distribue l'oxygène et les nutriments nécessaires au fonctionnement de toutes les cellules du corps et en même temps, récupère le dioxyde de carbone et les déchets (urée) qui résultent de l'activité cellulaire. Le sang est constitué de plasma dans lequel circulent les globules rouges, les globules blancs et les plaquettes.

1.2 Thrombopoïèse

Les plaquettes sont des éléments circulants sanguins anucléés, de petite taille (2-4 μm) présents au nombre de 150 000 et 400 000 par microlitre (μL) de sang. Approximativement, 30% des plaquettes circulantes sont mis en réserve dans la rate pour une courte période de temps chez un individu au

repos (George 2000). Leur demi-vie est de 5-9 jours dans la circulation sanguine dans la plupart des mammifères, avant d'être détruites par les macrophages de la rate et du foie. Les plaquettes font partie de la première ligne de défense contre les saignements aux sites d'atteinte vasculaire et apportent également une contribution importante à certains processus tels que les thromboses, l'inflammation et les néoplasies (Frojmovic et Milton 1982). La formation des plaquettes porte le nom de thrombopoïèse. Certaines cellules souches pluripotentes de la moelle osseuse se différencient en mégacaryoblastes, précurseurs des plaquettes. L'étape suivante est la transformation des mégacaryoblastes en prémégacaryocytes qui deviennent eux même des mégacaryocytes que l'on appelle également cellules géantes multinucléées qui, sous l'impulsion de cytokines, se fragmentent passant ainsi à l'état de mégacaryocyte thrombocytogène. Ce dernier produit alors des proto-plaquettes qui subissent une maturation pour donner les plaquettes sanguines (figure 1) (Kaushansky 2008).

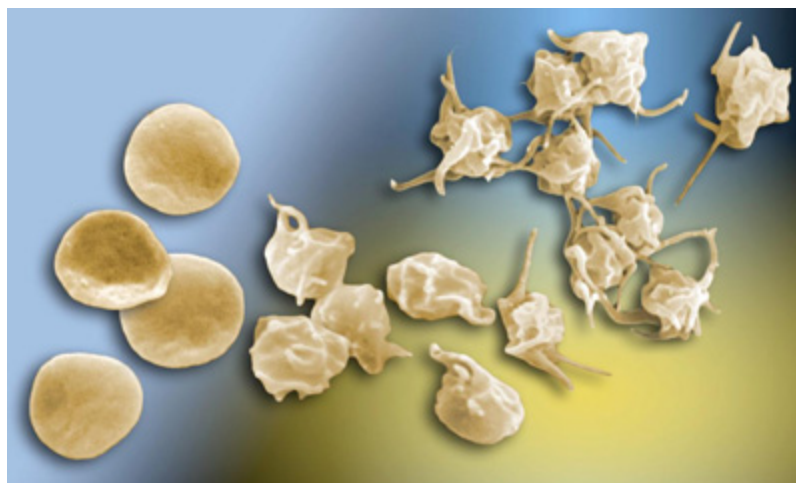


Figure 1 : Image de plaquettes au repos et activées, tiré du site <http://fez-zan.blogspot.com/2008/02/4.html>. Les plaquettes sont des particules anucléées de $0.5 \times 3 \mu\text{m}$ de diamètre qui au repos prennent une forme discoïdale. Lors d'un bris vasculaire, elles sont activées et leur morphologie change: elles deviennent sphériques et émettent des pseudopodes.

1.3 Morphologie/structure

Prenant au repos une forme discoïde d'environ $0,5 \times 3 \mu\text{m}$, les plaquettes sont composées d'une membrane cytoplasmique, d'un contenu cytoplasmique incluant un riche réseau de microtubules, des organelles, des protéines, des réserves de glycogène, de rares ribosomes et de l'ARN messager mais ne contiennent aucun résidu nucléaire (Hartwig 2006) (figure 2).

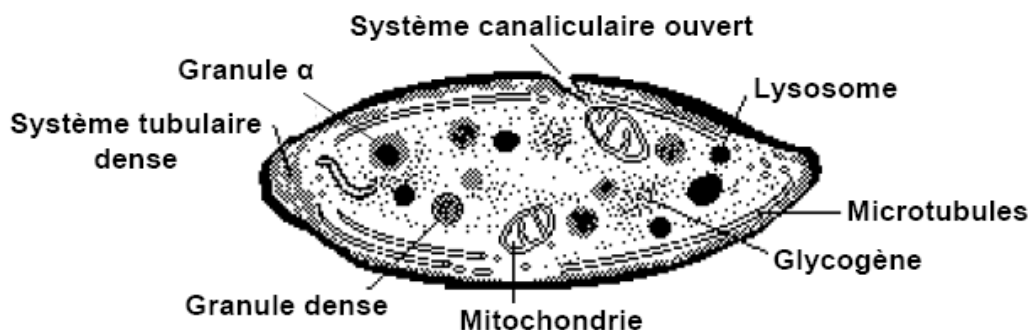


Figure 2 : Représentation schématique de la plaquette et de ces organelles.

1.3.1 Système membranaire

Les membranes des plaquettes sont semblables à celles des autres cellules. Elles sont composées de phospholipides arrangés en une double couche formant un noyau hydrophobe lipidique contenant plusieurs protéines transmembranaires (dont les intégrines) ayant des fonctions

importantes dans l'adhésion, l'activation et l'agrégation plaquettaire et dont les parties cytoplasmiques interagissent avec le cytosquelette (tableau I). Les protéines transmembranaires les plus importantes sont les complexes de protéines formant le récepteur glycoprotéique Ib-V-IX et l'intégrine $\alpha\text{IIb-}\beta_3$. Cette dernière permet l'agrégation des plaquettes entre elles, et constitue le récepteur le plus abondant à la surface des plaquettes. L'intégrine $\alpha\text{IIb-}\beta_3$ se répartit sur la membrane plasmique (70%), le système canaliculaire ouvert et la membrane des granules α (30%) (Berndt, Shen et al. 2001; Fox 2001).

Récepteurs membranaires	Ligands	Fonction biologique
α IIb- β ₃ (GPIIb-IIIa CD41/CD61)	fibrinogène, fvW, thrombospondine, fibronectine et vitronectine	agrégation plaquettaire
α _v - β ₃ (CD51/CD61)	thrombospondine, vitronectine, ostéopontine	adhésion
α ₂ - β ₁ (GPIa-IIa, CD49b/ CD29)	collagène	adhésion
α ₅ - β ₁ (CD49e/CD29)	fibronectine	adhésion
α ₆ - β ₁ (CD49f/CD29)	laminine	adhésion
GPIb - IX - V	fvW	adhésion

Tableau I : Récepteurs membranaires plaquettares, leurs ligands et leurs fonctions biologiques.

Tiré du Schalm's Veterinary Hematology. Sixth edition, Weiss D.J., Wardrop KJ, 2010.

1.3.2 Le cytosquelette

Le cytosquelette est un élément très contractile formé de filaments d'actine, de calmoduline, de myosine et qui a un rôle important dans l'étalement initial de la plaquette au cours du processus d'adhésion, de la formation de pseudopodes de la membrane plaquettaire ainsi que dans la contraction du caillot plaquettaire (Fox 1985).

1.3.3 Système des organelles

Les organelles plaquettaires comportent les mitochondries, le système canaliculaire ouvert, le système tubulaire dense ainsi que trois granules spécifiques: les granules denses, les granules alpha et les lysosomes. Le système canaliculaire ouvert représente une source importante de membrane utilisable pour la formation des filopodes et pour l'étalement des plaquettes (Escolar, Leistikow et al. 1989). Les plaquettes équines et bovines ne possèdent pas de système canaliculaire ouvert (Gader, Ghumlas et al. 2008). Le système tubulaire dense qui provient d'éléments du réticulum endoplasmique lisse a un rôle important dans la régulation de la concentration du calcium cytosolique au cours de l'activation plaquettaire puisqu'il en est le réservoir. C'est également un site de synthèse de prostaglandines. Les différents types de granules possèdent une membrane

qui sera fusionnée à la membrane cytoplasmique et contiennent des substances qui sont expulsées à l'extérieur de la plaquette lors de la sécrétion plaquettaire. Les granules denses, nommées en référence à leur densité observée en microscopie électronique, contiennent surtout de petites molécules non protéiniques. Les granules alpha, plus larges que les précédents et plus nombreux (environ 80 granules α /plaquette); contiennent un grand nombre de protéines telles que le fvW, la β - thromboglobuline, la fibronectine et le PF4 (*Platelet Factor 4*), le fibrinogène, et d'autres protéines plasmatiques comme l'albumine, des IgG, des protéines adhésives (thrombospondine) et des facteurs de croissance (PDGF). Le troisième type de granule, les lysosomes, contient des enzymes actives en milieu acide qui proviennent d'une synthèse à l'intérieur du réticulum endoplasmique rugueux des mégacaryocytes (Rendu et Brohard-Bohn 2001; Reed 2004).

1.4 Interactions plaquettaires

Les plaquettes sont la première ligne de défense contre les saignements au niveau des sites de dommage vasculaire (rôle principal – maintenir l'intégrité des vaisseaux sanguins à travers l'hémostase) et apportent une contribution majeure aux phénomènes de thrombose, inflammation et néoplasme (Frojmovic et Milton 1982).

1.4.1 Adhésion plaquettaire

Lors d'une insulte vasculaire, les plaquettes adhèrent fortement et fermement aux structures conjonctives du sous-endothélium, et particulièrement aux fibres de collagène exposées. Cette phase est largement dépendante du flot sanguin et de la contrainte de cisaillement appliquée sur les cellules. Dans un environnement veineux, où les forces de cisaillement sont faibles, l'adhésion est principalement dépendante des récepteurs GPVI et GPIa-IIa qui fixent le collagène du sous-endothélium vasculaire (Chow, Hellums et al. 1992). Dans un environnement de type artériel, les forces de cisaillement locales élevées vont favoriser l'étirement des multimères du fvW et exposer des sites de liaison du fvW au récepteur glycoprotéine Ib (GPIb/IX/V) des plaquettes (Moroi, Jung et al. 1997) (figure 3). Cette liaison, facilement réversible, ralentit la vitesse de la plaquette, l'entraîne dans un processus de roulement sur la paroi vasculaire et favorise une deuxième interaction du collagène avec son principal récepteur plaquettaire, la glycoprotéine VI (GP VI) (Moroi, Jung et al. 1996). La liaison du fvW à la GPIb/IX/V lors du roulement et de l'adhésion induit donc une signalisation de type « inside-out », entraînant l'activation des intégrines $\alpha\text{IIb-}\beta_3$ et GPIa-IIa induites par une mobilisation du calcium intracellulaire.

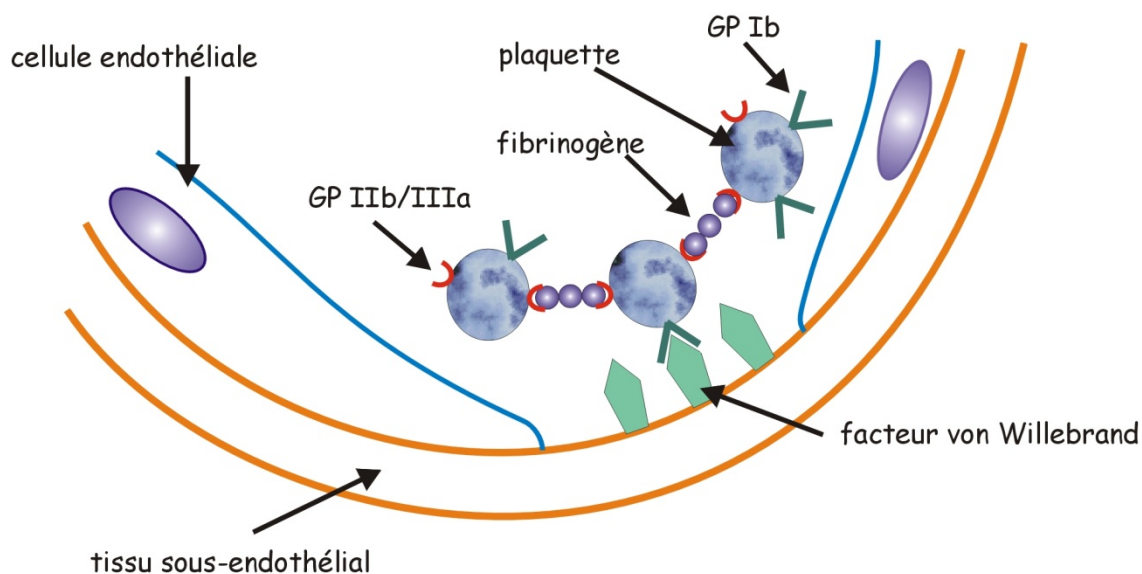


Figure 3 : Adhésion plaquettaire. Liaison du fvW au récepteur glycoprotéine Ib (GPIb/IX/V) des plaquettes. L'intégrine plaquettaire α IIb- β ₃ est représenté dans cette figure par le récepteur plaquettaire GPIIb/IIIa.

1.4.2 Agrégation plaquettaire

L'agrégation plaquettaire est une réaction physiologique importante dans la physiologie de multiples pathologies et dans le maintien de l'hémostase. La phase d'adhésion est suivie par l'activation et le recrutement secondaire des plaquettes circulantes grâce à des mécanismes auto- et paracrines mettant en jeu la sécrétion d'agonistes (ADP, sérotonine), de protéines de liaison (thrombospondine, fibrinogène), de granules puis la synthèse et la

sécrétion de thromboxane A₂. L'intégrine α IIb- β ₃ joue un rôle central dans l'agrégation plaquettaire. Le fibrinogène lie une intégrine α IIb- β ₃ d'une plaquette activée, et lie aussi une autre intégrine α IIb- β ₃ et forme entre ces deux plaquettes un pont de fibrinogène. Ce pont formé entre deux plaquettes par l'intermédiaire du fibrinogène et de l'intégrine α IIb- β ₃ constitue la dernière étape de l'agrégation plaquettaire (Shattil 1995). Les plaquettes recrutées vont former le thrombus plaquettaire.

2. MALADIES HÉRÉDITAIRES PLAQUETTAIRES

INTRINSÈQUES.

2.1 Récapitulatif

Les maladies héréditaires plaquettaires intrinsèques sont caractérisées par des anomalies qui touchent certaines structures plaquettaires et qui amènent à une thrombopathie ou à une thrombocytopénie. Des anomalies qui impliquent les récepteurs membranaires (glycoprotéines), les organelles sécrétoires, les protéines de transduction de signal ont déjà été documentées au niveau fonctionnel, biochimique et moléculaire, en médecine vétérinaire (Johnstone et Lotz 1979; Catalfamo, Raymond et al. 1986; Steficek, Thomas et al. 1993; Boudreaux, Crager et al. 1994; Boudreaux, Kvam et al. 1996; Frojmovic, Wong et al. 1996; Lipscomb, Bourne et al. 2000; Yamakuchi, Agaba et al. 2000; Benson, Li et al. 2003; Christopherson, Insalaco et al. 2006; Christopherson, van Santen et al. 2007; Davis, Toivio-Kinnucan et al. 2008). Le mode de transmission de ces maladies s'effectue de manière autosomale et récessive.

Les maladies héréditaires plaquettaires extrinsèques sont pour leur part caractérisées par des anomalies des protéines plasmatiques ou sous endothéliales qui sont essentielles à l'adhésion ou à l'agrégation plaquettaire.

La maladie de von Willebrand et l'hypo ou la dysfibrinogénémie en sont des exemples. En médecine vétérinaire, les désordres du fibrinogène sont extrêmement rares tandis que la maladie de von Willebrand est plus commune en particulier chez les chiens (Thomas 1996).

Les maladies intrinsèques et extrinsèques sont non distinguables cliniquement, les animaux présentent des pétéchies, des hémorragies au niveau des muqueuses et des ecchymoses. Dans les deux types de maladies, le temps de saignement buccal est habituellement prolongé tandis que les tests de dépistage des anomalies de la coagulation tels que le temps de prothrombine (PT) et le temps de thromboplastine partielle activée (APTT) sont normaux. Un résumé des maladies héréditaires plaquettaires intrinsèques décrites en médecine vétérinaire ainsi que les anomalies génétiques associées sont récapitulés dans le tableau II.

Anomalie/Race	Gène atteint	Site de la mutation	Nature de la mutation
<u>Macrothrombocytopenie</u> Épagneul cavalier King Charles	B1-Tubuline	Exon 4	G>A (D>N)
<u>Thrombasthénie de Glanzmann</u> Montagne des Pyrénées Otterhound Cheval Thoroughbred Cheval Quarter Horse Cheval Oldenbourg	α IIb α IIb α IIb α IIb α IIb	Exon 13 Exon 12 Exon2 Exon 2, exon/intron 11 Exon 2	Duplication 14 pb G>C, D>H G>C, R>P G>C, R>P et Délétion 10pb G>C, R>P
<u>Chediak-Higashi</u> Japanese black cattle	LYST	Nucléotide 6065	A>G, H>R
<u>Hématopoïèse cyclique</u> Colley gris	AP3 β 1	Exon 20	Duplication de 1 base
<u>Récepteur de l'ADP</u> Grand bouvier Suisse	P2Y12	Exon2	Délétion de 3 bases
<u>Déficiéne sélective en ADP</u> Épagneul Cocker Américain	Non connu	Non connu	Non connu
<u>Transduction du signal</u> Basset Hound Spitz Vache Simmental Cheval Arabe Chien Berger Allemand Landseer de Type Continental Européen	CaIDAG-GEFI CaIDAG-GEFI CaIDAG-GEFI CaIDAG-GEFI Kindlin-3 CaIDAG-GEFI	Exon 5 Exon 5 Exon 7 Exon 6 Exon 12 Exon 8	Délétion de 3 bases Duplication de 1 base T>C, L>P C>G, H>Q Insertion de 12 bases C>T, R>STOP

CaIDAG-GEFI : calcium diacylglycerol guanine nucleotide exchange factor I

AP3 β 1 : adaptor protein complex 3 β -subunit, LYST : lysosomal trafficking regulator

Tableau II : Désordres héréditaires plaquettaires intrinsèques décrites en médecine vétérinaire ainsi que les anomalies génétiques associées.

Tiré du Schalm's Veterinary Hematology. Sixth edition, Weiss D.J., Wardrop KJ, 2010.

2.2 La thrombasthénie de Glanzmann

2.2.1 Chez l'homme

La TG est une maladie hémorragique affectant la lignée des mégacaryocytes et caractérisée par un défaut d'agrégation plaquettaire. La TG est caractérisée par l'absence ou la diminution marquée de l'intégrine $\alpha\text{IIb-}\beta_3$ (Nurden 2006). La TG a été découverte en 1918, à Berne, en Suisse, par un pédiatre du nom d'Eduard Glanzmann. Les enfants atteints par cette maladie provenaient tous d'un petit village, appelé Le Valais, situé en altitude dans les Alpes suisses. Dans ce village, les mariages entre proches parents étaient fréquents. Il a nommé la maladie, la thrombasthénie héréditaire hémorragique (plaquettes faibles), ce qui a mené à l'introduction du concept de désordre plaquettaire qualitatif (Glanzmann 1918). La TG est un désordre hémorragique modéré à sévère ayant comme conséquence des saignements muco-cutanés. La base moléculaire de la maladie est liée à des anomalies quantitatives et/ou qualitatives du récepteur qui intervient dans l'incorporation des plaquettes au sein du clou plaquettaire qui se forme lors de l'atteinte de l'intégrité des vaisseaux sanguins (George, Caen et al. 1990; Nurden 2006). Une avancée majeure du point de vue technique a été l'invention en 1962 d'une technique évaluant l'agrégométrie plaquettaire en laboratoire. Cette technique est une méthode turbidimétrique optique

quantitative qui évalue les interactions entre plaquettes. En utilisant cette technique, plusieurs groupes ont rapporté qu'il n'y avait pas d'agrégation plaquettaire chez les patients atteints de TG lors de stimulation des plaquettes par les agonistes physiologiques connus tels l'ADP, le collagène, l'épinéphrine, la sérotonine et la thrombine (Hardisty, Dormandy et al. 1964; Zucker, Pert et al. 1966). Ensuite le développement de l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide, qui a permis la séparation à haute-résolution des protéines plaquettaires, a mené à l'opportunité de définir le défaut des plaquettes des patients atteints de TG. Dans les années 1970, Nurden et Caen ont démontré que les plaquettes des patients atteints de TG possédaient des anomalies importantes et sélectives au niveau de la composition de leurs glycoprotéines membranaires. Ces études ont mené à l'évidence que la TG est provoquée par des déficiences spécifiques des glycoprotéines $\alpha\text{IIb-}\beta_3$ (Nurden et Caen 1974; Phillips et Agin 1977).

La TG est répartie mondialement, elle a été rapportée, en autres, au Japon (Tomiya, Kashiwagi et al. 1995; Ambo, Kamata et al. 1998; Ambo, Kamata et al. 1998), en Inde (Khanduri, Pulimood et al. 1981), en Chine (Gu, Xu et al. 1993; Grimaldi, Chen et al. 1996), en Iran (Peretz, Rosenberg et al. 1995), en Algérie (Morel-Kopp, Kaplan et al. 1997) et chez les bohémiens de France (Schlegel, Gayet et al. 1995).

La TG a été décrite d'un point de vue moléculaire chez l'homme pour la première fois en 1990 (Bray et Shuman 1990). La TG est transmise de façon autosomale et récessive. En effet les hommes et les femmes sont affectées en proportions égales, les parents des patients atteints de TG sont asymptomatiques et environ 25% des cas sont associés à de la consanguinité (Caen 1966).

L'apparition d'épisodes hémorragiques pendant l'enfance mène au diagnostic de TG avant l'âge de 5 ans, cependant les symptômes diminuent graduellement jusqu'à ce que les individus affectés atteignent l'âge adulte (George, Caen et al. 1990). Les symptômes de la TG varient beaucoup d'une personne à l'autre, et les saignements résultants varient de bénins à potentiellement mortels. Les hémorragies associées à la TG apparaissent principalement au niveau muco-cutané (Bray, Rosa et al. 1987). Les personnes atteintes de la TG peuvent présenter différents symptômes, tels que des ecchymoses au moindre choc; des saignements de nez; des saignements des gencives; des saignements menstruels abondants ou prolongés (ménorragie) ou des saignements après l'accouchement; des saignements anormaux après une chirurgie, une circoncision ou un traitement dentaire; rarement, des vomissements de sang ou la présence de sang dans l'urine ou les selles à cause de saignements gastriques ou intestinaux ou au niveau de l'appareil

génito-urinaire (reins, uretère, vessie et urètre). La TG est souvent plus problématique pour les femmes, en raison des menstruations et de l'accouchement (Awidi 1983; Seligsohn et Rososhansky 1984; George, Caen et al. 1990). La sévérité des saignements associés à la TG est imprévisible, même lorsque l'on compare des frères et des sœurs de même âge (George, Caen et al. 1990). Actuellement la classification de la maladie en trois types tient en compte l'ampleur de la déficience des plaquettes en intégrines $\alpha\text{IIb-}\beta_3$ (Caen 1966; Bray, Rosa et al. 1987; Phillips, Charo et al. 1988).

La TG de type I représente la plupart des cas et constitue la forme la plus sévère de déficience en intégrines $\alpha\text{IIb-}\beta_3$ immunologiquement détectable (taux à moins de 5 % de la normale). Les plaquettes activées sont incapables de lier le fibrinogène, le fibrinogène contenu dans les granules alpha est diminué et il y a absence d'agrégation plaquettaire ou rétraction du clou plaquettaire (George, Caen et al. 1990). Les plaquettes des patients atteints de TG en raison d'une mutation dans le gène codant pour la sous-unité αIIb détiennent souvent des concentrations accrues du récepteur à la vitronectine ($\alpha\nu\beta_3$). Ce phénomène peut s'expliquer par le fait de la disponibilité augmentée de la sous-unité β_3 pour lier les sous-unités $\alpha\nu$ (Coller, Seligsohn et al. 1987). Les défauts génétiques observés chez les patients atteints de TG de type I comportent des délétions, des insertions, des

mutations qui causent des défauts d'épissages et qui résultent en la formation de protéines tronquées (French et Coller 1997; Peyruchaud, Nurden et al. 1998).

La TG de type II représente 14% des cas décrits. Les plaquettes des individus possèdent un taux d'intégrines $\alpha\text{IIb-}\beta_3$ de 10 à 20% de la normale. Les plaquettes activées lient minimalement le fibrinogène et démontrent une agrégation plaquettaire minimale et une rétraction du caillot plaquettaire anormale (George, Caen et al. 1990). La TG de type II survient habituellement lorsque des anomalies sont présentes dans le gène codant pour la sous-unité β_3 bien que des mutations au niveau du gène codant pour la sous-unité αIIb ont également été déjà décrits (French et Coller 1997). La séquence de liaison RGD de la sous-unité β_3 est une région très susceptible (Tozer, Liddington et al. 1996).

Le type III représente une variante de la TG, les plaquettes de ces individus possèdent plus de 50% d'intégrines $\alpha\text{IIb-}\beta_3$ néanmoins l'agrégation plaquettaire est minime voire absente et la rétraction du caillot est variable. Tandis que les type I et II sont les conséquences d'une déficience quantitative de $\alpha\text{IIb-}\beta_3$, le type III est causé par un défaut qualitatif de $\alpha\text{IIb-}\beta_3$. Le type III est souvent le résultat de mutations au niveau du gène codant pour la sous-unité β_3 (Phillips, Charo et al. 1988; George, Caen et al. 1990).

2.2.2 L'intégrine α IIb- β_3

Au début des années 1980, Jennings et Phillips ont purifié les glycoprotéines α IIb et β_3 à partir des plaquettes. Ces études ont également permis d'établir que les glycoprotéines α IIb- β_3 contiennent des résidus d'hydrates de carbones et que la sous-unité α IIb (poids moléculaire de 140 kDa) est composée d'une chaîne lourde et d'une chaîne légère (poids moléculaire de 120 et 20 kDa respectivement) liées ensemble par un pont disulfure. La sous-unité α IIb comprend dans son domaine extracellulaire quatre sites de liaison pour des cations divalents qui témoignent de sa dépendance calcique. β_3 possède une simple chaîne polypeptidique (116 kDa) (Jennings et Phillips 1982; Phillips, Charo et al. 1988) (figure 4).

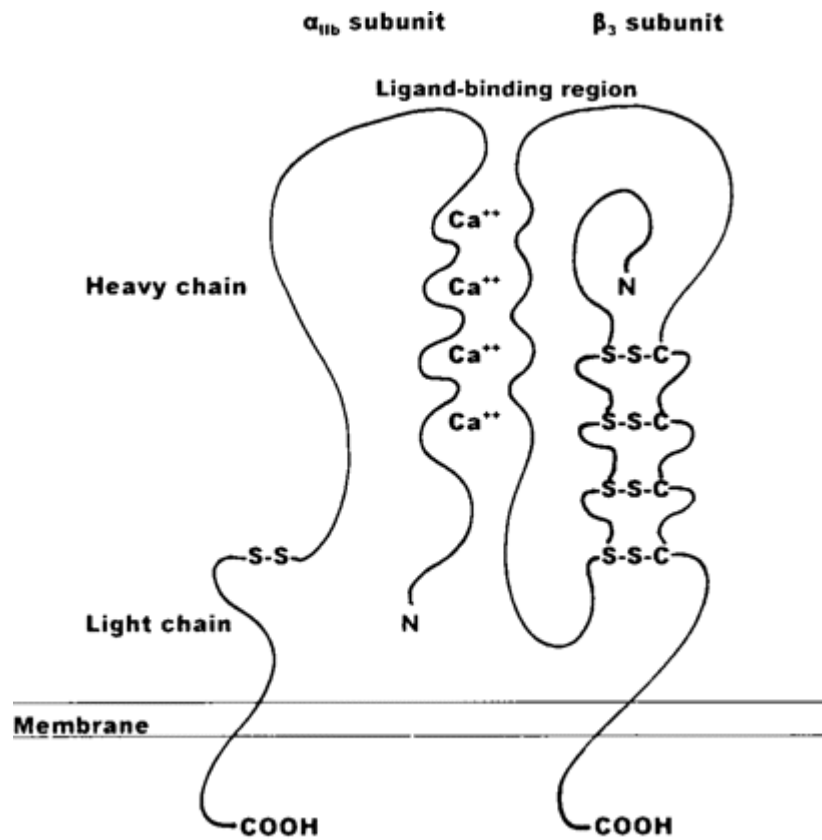


Figure 4 : Structure de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ (tiré de Boudreaux et Lipscomb 2001).

L'intégrine $\alpha\text{IIb-}\beta_3$ est constitué de 2 sous unités, la sous-unité αIIb (Glycoprotéine IIb ou GPIIb) et la sous-unité β_3 (Glycoprotéine IIIa ou GPIIIa). L'intégrine $\alpha\text{IIb-}\beta_3$ est fonctionnellement importante et exprimée à la surface plaquettaire. Les sous-unités $\alpha\text{IIb-}\beta_3$ sont assemblées grâce à une liaison non-covalente ce qui résulte en un hétérodimère qui requiert des ions de calcium pour maintenir la structure en place. Ce récepteur va se lier avec une haute affinité au fibrinogène, mais se lie également à d'autres molécules contenant la séquence RGD – arginine – glycine - acide aspartique - soit la fibronectine, le fvW, la thrombospondine et la vitronectin (Bennett et Vilaire 1979; Ruggeri, Bader et al. 1982; Ginsberg, Forsyth et al. 1983; Plow et Ginsberg 1989; Shattil 1995). Les plaquettes possèdent de 40,000 à 80,000 molécules de $\alpha\text{IIb-}\beta_3$ par cellule (Wagner, Mascelli et al. 1996). Dans les plaquettes au repos, les intégrines $\alpha\text{IIb-}\beta_3$ sont en état de basse affinité ce qui permet aux plaquettes de circuler librement dans le sang qui contient des ligands solubles des intégrine $\alpha\text{IIb-}\beta_3$. La capacité de l'intégrine $\alpha\text{IIb-}\beta_3$ à lier ces ligands solubles augmente rapidement suite à l'exposition des plaquettes aux agonistes solubles ou aux protéines de la matrice endothéliale. Suite à l'activation plaquettaire, les intégrines $\alpha\text{IIb-}\beta_3$ sont amenées à la surface plaquettaire suite à la fusion entre les granules alpha et la membrane cytoplasmique (Niiya, Hodson et al. 1987; Calvete 1994). Lors de l'activation

des plaquettes, il y a apparition de signaux cytoplasmiques - signalisation « intérieur-extérieur » (inside-out signaling) qui déclenchent un changement de conformation des domaines extracellulaires du récepteur $\alpha\text{IIb-}\beta_3$ qui acquiert ainsi une haute affinité à se lier aux autres plaquettes et amorcer l'agrégation plaquettaire. Ensuite, les queues cytoplasmiques des deux sous-unités s'associent entre elles et aussi avec d'autres protéines dont la présence influence grandement le maintien de l'état d'activation du récepteur $\alpha\text{IIb-}\beta_3$ (Shattil, Hoxie et al. 1985; Calvete 1994). Faisant suite à la signalisation "inside-out", la liaison du ligand à la portion extracellulaire du récepteur $\alpha\text{IIb-}\beta_3$ provoque un regroupement des intégrines et des changements de conformation dans leurs domaines cytoplasmiques, déclenchant des signaux vers l'intérieur de la cellule, un processus appelé signalisation "extérieur-intérieur" ("outside-in signaling"). Vraisemblablement, les modifications des queues des intégrines par la liaison du ligand et le regroupement des intégrines induisent l'interaction de la queue avec des protéines intracellulaires, donnant naissance à des cascades signalétiques (Calvete 1994). Ces signaux induits par le récepteur $\alpha\text{IIb-}\beta_3$ jouent un rôle important dans la sécrétion, l'activité procoagulante, la réorganisation du cytosquelette, la rétraction des caillots de fibrine et dans le processus d'agrégation irréversible (Levy-Toledano 1999).

La synthèse des intégrines se fait dans les mégacaryocytes (Plow et Byzova 1999). La sous-unité α IIb est premièrement synthétisée en une simple protéine qui forme un complexe dimérique avec la sous-unité β_3 . L'assemblage des 2 molécules se fait dans le réticulum endoplasmique où ils vont subir une N-glycosylation en sus (O'Toole, Loftus et al. 1989). Ce complexe est ensuite transporté dans l'appareil de Golgi pour l'assemblage final avec des oligosaccharides et pour le clivage de la simple-chaine pro- α IIb en un α IIb mature constitué d'une chaîne lourde et légère (Duperray, Troesch et al. 1989; Calvete 1994). Ensuite, le complexe est transporté de l'appareil de Golgi vers le système canaliculaire connecté à la surface et les granules alpha (Wencel-Drake, Plow et al. 1986). L'assemblage des molécules d' α IIb et β_3 est un pré requis pour l'expression du récepteur α IIb- β_3 à la surface des plaquettes (O'Toole, Loftus et al. 1989).

La sous-unité α IIb possède sept domaines fonctionnels : extracellulaire, transmembranaire, cytoplasmique, et quatre domaines extra cytoplasmiques de liaison au calcium (Frachet, Duperray et al. 1992; Calvete 1994). Le Ca^{2+} étant un co-facteur essentiel à la formation du complexe α IIb- β_3 et à la fixation des protéines adhésives.

La sous-unité $\beta 3$ est une chaîne polypeptidique unique qui possède cinq domaines fonctionnels: cytoplasmique, transmembranaire, extracellulaire, une séquence de liaison RGD et une région dépendante du calcium associée à la poche de liaison du fibrinogène (Fitzgerald, Steiner et al. 1987; Frchet, Duperray et al. 1992; Shattil 1993). La sous-unité $\beta 3$ possède en plus cinq régions extracellulaires riches en cystéines qui facilitent la formation de ponts disulfures qui confère une conformation globulaire à la sous-unité (Calvete, Henschen et al. 1991).

Les sous-unités $\alpha \text{IIb}-\beta 3$ sont codées par les gènes *ITGA2B* et *ITGB3*, respectivement. Chez l'homme, l'expression du gène d'*ITGA2B* est restreinte à la lignée des mégacaryocytes, tandis que l'expression du gène d'*ITGB3* survient également dans d'autres types de cellules (cellules endothéliales, ostéoblastes, leucocytes, cellules du muscle lisse) comme composant du récepteur à la vitronectine ($\alpha \text{v}\beta 3$) (Sosnoski, Emanuel et al. 1988). Chez l'homme, il existe une centaine de mutations associées à la TG (figures 5 et 6), qui sont toutes répertoriées dans le site : <http://sinaicentral.mssm.edu/intranet/research/glanzmann> .

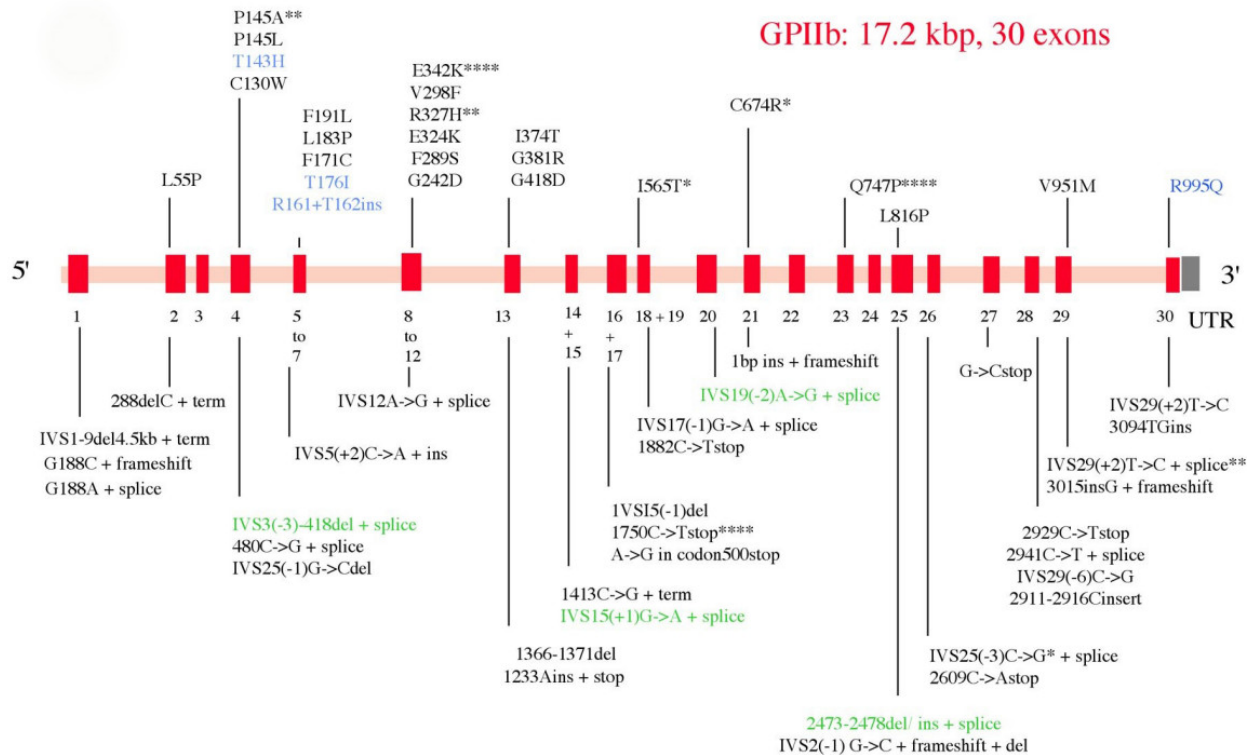


Figure 5 : Représentation schématique du gène codant pour la sous-unité α IIb (*ITGA2B*) avec les différentes anomalies génétiques pouvant mener à la TG chez l'homme (tiré de Nurden 2006).

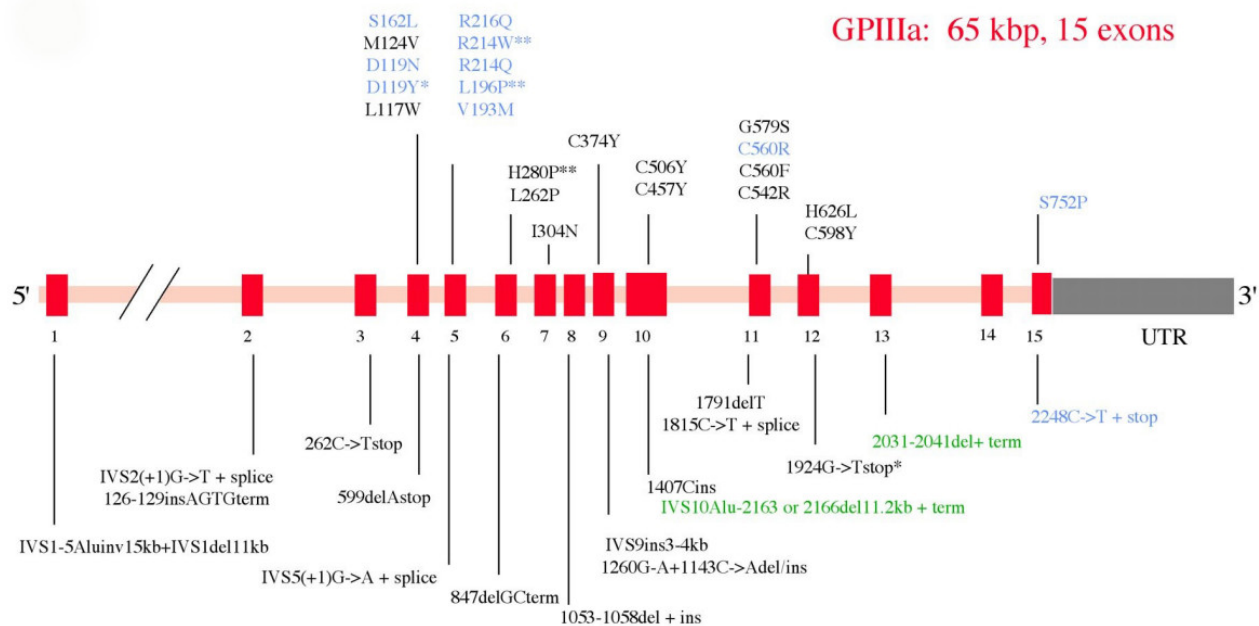


Figure 6 : Représentation schématique du gène codant pour la sous-unité $\beta 3$ (*ITGB3*) avec les différentes anomalies génétiques pouvant mener à la TG chez l'homme (tiré de Nurden 2006).

Les gènes *ITGA2B* et *ITGB3* peuvent tous les deux être atteints. Les gènes qui codent pour les sous-unités α IIb- β 3 ont été listés sur la bande chromosomique q21-23 du chromosome 17 chez l'homme (Sosnoski, Emanuel et al. 1988). *ITGA2B* (génomique) possède approximativement 17.2 kilobases (kb) et 30 exons, dont la taille varie de 45 paires de base à 249 paires de base (Heidenreich, Eisman et al. 1990). Chaque domaine des quatre sites de liaisons au calcium est constitué de 12 acides aminés qui sont codés par des segments de gènes de deux exons adjacents (Plow et Byzova 1999). Le premier domaine de liaison au calcium est codé par les exons 8 et 9; le second domaine de liaison au calcium est codé par les exons 11 et 12; le troisième est codé par les exons 12 et 13; et le quatrième est codé par les exons 13 et 14 (Poncz, Eisman et al. 1987). La chaîne légère de la sous-unité α IIb possède des domaines cytoplasmiques, transmembranaires et une petite portion qui est extracellulaire. La majorité du domaine extracellulaire de la sous-unité α IIb qui comporte les quatre domaines de liaison au calcium est associé à la chaîne lourde de la sous-unité α IIb (Kieffer et Phillips 1990; Nurden 1995). Chez l'homme, *ITGB3* possède 14 exons, dont la taille varie de 87 paires de base à 430 paires de base (Lanza, Kieffer et al. 1990).

2.2.3 Dans l'espèce canine

Otterhounds

En 1967, Dodds a décrit la thrombopathie thrombasthénique chez les Otterhounds (Dodds 1967). Les chiens affectés par cette maladie présentaient un temps de saignement augmenté ainsi que des saignements spontanés au niveau des muqueuses. L'agrégation plaquettaire en réponse à tous les agonistes était minime ou diminuée, la rétraction du caillot était anormale et le contenu intra plaquettaire en fibrinogène était sévèrement réduit. Ces chiens présentaient également une diminution de l'intégrine $\alpha\text{IIb-}\beta\text{3}$ à la surface de leurs plaquettes. Cependant certains chiens présentaient de larges plaquettes ayant une morphologie bizarre, caractéristique typique de la maladie de Bernard Soulier (Raymond et Dodds 1979). Cette observation a mené donc à la possibilité que les Otterhounds présentaient un défaut plaquettaire qui était la combinaison d'un désordre fonctionnel des plaquettes avec des caractéristiques de la TG et de la maladie de Bernard Soulier. Cette dernière est un désordre intrinsèque de la fonction plaquettaire attribuable à des niveaux diminués voire nuls du complexe plaquettaire GPIIb-IX-V. La thrombopathie des Otterhounds a été ensuite largement éliminée de la race vers les années 1970. Cependant vers les années 1990, les descendants de certains Otterhounds ont également présenté des

dysfonctionnements plaquettaires. L'agrégation plaquettaire en réponse aux agonistes physiologiques était réduite voire absente, le fibrinogène intra plaquettaire et la rétraction du caillot étaient diminués comme cela avait été décrit initialement. Les glycoprotéines plaquettaires de type $\alpha\text{IIb-}\beta\text{3}$ étaient de quantité diminuée. La cytométrie de flux a permis d'indiquer la présence de la sous-unité β3 au niveau de la surface des plaquettes affectées, suggérant donc que le défaut impliquait le gène codant pour la sous-unité αIIb . La morphologie et la taille des plaquettes étaient normales contrairement à ce qui avait été décrit dans la population originale. Le séquençage d'*ITGA2B* et d'*ITGB3* a permis de déceler un polymorphisme d'un nucléotide unique, un G1193 en C1193 au niveau de l'exon 12 d'*ITGA2B* (Boudreaux et Catalfamo 2001). Ce changement de nucléotide résulte en la substitution d'une histidine par un acide aspartique à la position 398, à l'intérieur du troisième domaine de liaison au calcium de la sous-unité αIIb (Boudreaux et Lipscomb 2001). En se basant sur des études humaines, ce changement pourrait déstabiliser le complexe $\alpha\text{IIb-}\beta\text{3}$, ayant comme résultat un manque d'expression du complexe à la surface des plaquettes.

Chien de Montagne des Pyrénées

La TG a été décrite chez un chien Montagne des Pyrénées en 1996 (Boudreaux, Kvam et al. 1996). Le comptage et la morphologie plaquettaires

étaient normaux, cependant il n'y avait pas d'agrégation plaquettaire in vitro lors de stimulation par des agonistes physiologiques. La rétraction du caillot était également anormale et les analyses électrophorétiques ont révélé que les plaquettes avaient des quantités moindres de sous-unités α IIb et β 3. Au niveau du gène codant pour la sous-unité α IIb, l'insertion de 14 paires de bases à la fin de l'exon 13 et un épissage défectueux au niveau de l'intron 13 ont été mis en évidence. Cette insertion mène à une mutation à trame décalée et à l'interruption du segment de l'ADNc qui code pour le quatrième domaine de liaison de calcium et mène à la formation d'une sous-unité α IIb tronquée (Lipscomb, Bourne et al. 1999; Lipscomb, Bourne et al. 2001). En se basant sur des études humaines, l'assemblage du complexe α IIb- β 3 survient probablement, mais son transport à la surface plaquettaire serait altéré. D'autres chiens de Montagnes des Pyrénées atteints de TG et présentant les mêmes anomalies décrites ont été rapportés par la suite (Brdecka, Adin et al. 2004).

2.2.4 Dans l'espèce équine

Très peu de cas de TG ont été décrits dans l'espèce équine. Un premier cas de suspicion TG chez un poulain de race Thoroughbred a été publié par Miura en 1987. Le poulain présentait une rétraction de caillot prolongée et

une absence d'agrégation plaquettaire suite à la stimulation d'agonistes tels l'ADP et le collagène (Miura, Senba et al. 1987).

Un autre rapport probable de TG a été décrit chez un hongre de race standardbred dont les plaquettes ne s'agrégeaient pas suite à la stimulation par la sérotonine, l'ADP, le collagène et le U46619 -un analogue de la prostaglandine endopéroxyde H₂, (Sutherland, Cambridge et al. 1989). La nature exacte de ces anomalies plaquettaires chez ces 2 chevaux n'a pas été investiguée.

Plus récemment, une jument de race Quarter Horse de 2 ans et un cheval hongre de race Thoroughbred de 7 ans qui présentaient un épistaxis chronique intermittent non relié à l'exercice ont été diagnostiqués avec la TG. Ces deux chevaux ne présentaient aucune anomalie dans les tests standards de dépistage d'un problème de coagulation, le comptage plaquettaire était normal et les niveaux de l'antigène du fvW étaient dans les normes. Par contre la rétraction du caillot et les tests d'agrégation plaquettaires étaient très altérés. Des études de cytométrie de flux ont mis en évidence une diminution de l'expression du complexe α IIb- β ₃ à la surface de leurs plaquettes (Livesey, Christopherson et al. 2005). La première étude qui a caractérisé les séquences de cADN codant pour les sous-unités α IIb et β ₃ chez deux chevaux atteints de TG a été publiée par l'équipe du Dr Boudreaux

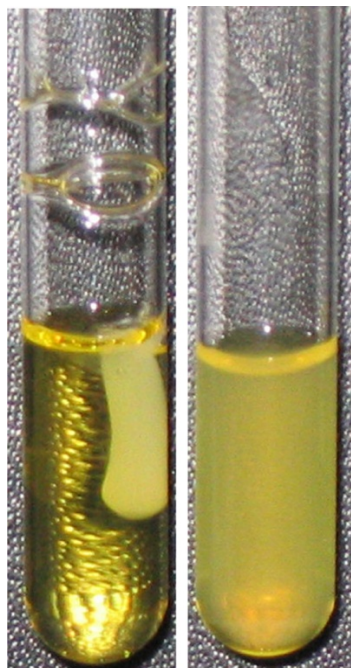
(Christopherson, Insalaco et al. 2006). Selon cette étude, les séquences de cADN codant pour la sous-unité β_3 chez ces deux chevaux étaient identiques aux séquences obtenues chez un cheval sain. Les séquences de cADN codant pour la sous-unité αIIb étaient également identiques excepté pour une seule substitution d'une guanine par une cytosine (CGG par CCG) au niveau du codon 41 de l'exon 2. Ce changement résulterait en la substitution d'une arginine par une proline au niveau d'une zone hautement conservée parmi différentes espèces de la protéine codante. Au niveau génomique, le cheval de race Thoroughbred de 7 ans présentait la même mutation au niveau des 2 allèles et il a été considéré homozygote pour cette mutation. La jument Quarter Horse de 2 ans était hétérozygote pour cette mutation au niveau de l'exon 2 (Christopherson, Insalaco et al. 2006). Une seconde étude a ensuite été publiée dans le but de déceler et de décrire la seconde mutation chez la jument Quarter Horse. Cette seconde mutation qui résultait selon les auteurs de l'étude en un manque de détection d'ARNm de l'autre allèle était théoriquement dû à un défaut de synthèse d'ARNm ou à la dégradation des ARNm non-sens. À partir de cette supposition, ils ont évalué les zones non codantes de la sous unité αIIb chez ce patient. Les séquences des fragments amplifiés à partir de l'ADN génomique incluant les sites d'épissage et tous les introns entre 2 et 10, 13 et des parties d'introns 1 et 12 à proximité des exons

n'ont révélé aucune différence entre un cheval normal et le cheval atteint de TG. Cependant, la seule différence a été identifiée à la jonction entre l'exon 11 et l'intron 11. Une délétion de 10 paires de base incluant le site d'épissage entre l'exon 11 et l'intron 11 a été mise en évidence chez le cheval atteint de TG. Cette mutation amènerait à un manque d'épissage de l'intron 11 et l'inclusion d'un codon stop prématuré, 50 paires de bases en aval de la mutation dans l'ARNm incomplètement épissé (Christopherson, van Santen et al. 2007).

2.2.5 Le cas clinique de l'étude

Notre patient sur lequel l'étude a été réalisée est une jument de race Oldenbourg de 18 mois présentée au Centre hospitalier universitaire vétérinaire de l'Université de Montréal pour l'évaluation d'une masse thoracique gauche qui était apparue quatre jours avant son admission. Il n'y avait pas d'histoire de trauma récent. La jument était gardée au repos, au box, car elle était en convalescence suite à une chirurgie élective d'arthroscopie au jarret droit qui avait eu lieu six semaines auparavant. La chirurgie s'était très bien déroulée si ce n'est que les points de suture du cathéter intraveineux ont saigné excessivement pendant 4 heures. A sa seconde admission, la jument

était alerte et en bonne condition. Les signes vitaux étaient normaux. Au niveau des muqueuses buccales de nombreuses pétéchies étaient visibles. On notait également une large masse sous-cutanée de 15 cm de diamètre au niveau du thorax gauche. Une aspiration écho guidée de la masse a révélé un liquide séreux sanguinolent, l'évaluation cytologique du liquide était compatible avec un hématome. Différents tests de laboratoire ont été réalisés tels que le comptage plaquettaire, le temps de saignement buccal, le temps de prothrombine (PT), le temps de thromboplastine partielle activée (APTT), la mesure de l'antigène du fvW, la mesure du fibrinogène, l'évaluation de la rétraction du caillot, le temps d'occlusion sur l'automate PFA-100, des études d'agrégation plaquettaire en utilisant différents agonistes et la thrombélastographie (TEG). La TEG a été réalisée en utilisant du kaolin et du facteur tissulaire comme activateurs de la coagulation. Les résultats de ces nombreux tests incluaient une prolongation du temps de saignement buccal (>12 heures), une prolongation du temps d'occlusion en utilisant de l'ADP comme activateur de la coagulation et une absence de la rétraction du caillot après soixante minutes (figure 7).



A) B)

Figure 7 : Test de rétraction du caillot

(A) Rétraction du caillot chez un cheval contrôle

(B) Absence de rétraction du caillot chez le patient atteint de TG

Au niveau de la TEG, l'amplitude maximale chez notre patient était diminuée lors des utilisations du kaolin (43.7 mm; contrôle, 63.9 mm) et du facteur tissulaire (37.7 mm; contrôle, 57.8 mm) (figure 8).

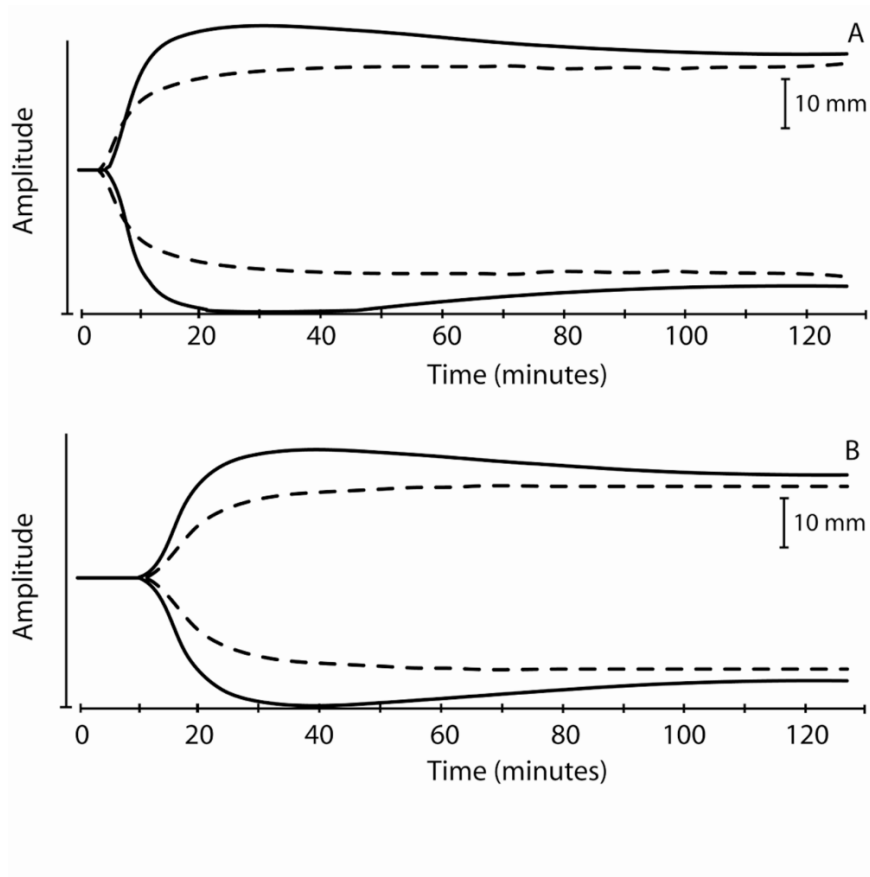


Figure 8 : Tracés de thrombélastrographie initiés à l'aide de kaolin (A) et de facteur tissulaire recombinant humain (B) chez le cheval atteint de TG (pointillés) et chez le cheval contrôle (lignes).

Des études d'agrégation plaquettaire suite à l'activation avec de l'ADP et du collagène ont démontré que l'agrégation plaquettaire était extrêmement diminuée chez notre patient comparativement au cheval contrôle (figure 9).

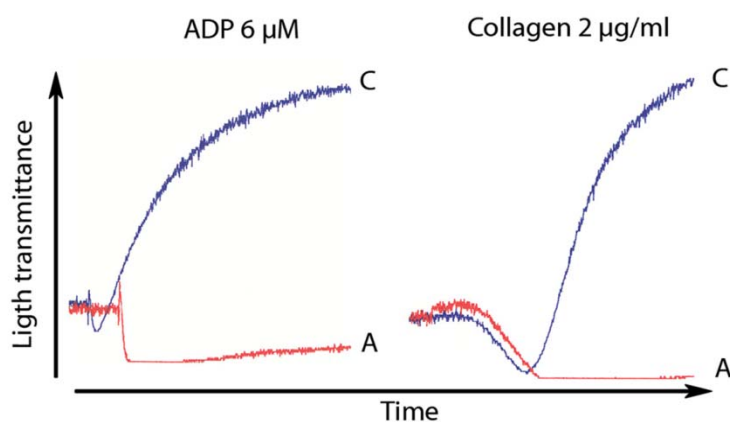


Figure 9 : Études d'agrégation plaquettaire réalisées sur du plasma riche en plaquettes chez le cheval contrôle (C) et chez le cheval atteint de TG (A).

L'agrégation plaquettaire suite à l'ajout d'ADP (6µM) et de collagène (2 µg/ml) est très diminuée chez le cheval atteint de TG par rapport au cheval contrôle.

À ce stade-ci de l'évaluation de notre patient nous avons une suspicion de TG. Une analyse par cytométrie de flux a ensuite été réalisée pour le confirmer. La cytométrie de flux est une technique qui permet de dépister certaines thrombopathies constitutionnelles, par la mise en évidence d'un déficit en glycoprotéines au niveau des membranes plaquettaires. L'expression du récepteur plaquettaire pour le fibrinogène a été donc évaluée par cette technique en utilisant des anticorps anti-CD41 (α IIb ou GPIIb)/CD61 (β_3 ou GPIIIa). Les résultats des études par cytométrie de flux ont montré l'absence d'expression du complexe CD41 et une diminution de l'expression du complexe CD41/CD61 au niveau des plaquettes du patient atteint de TG comparativement à notre cheval contrôle (figure 10). Ce résultat nous a donc permis de supporter le fait que notre patient atteint de TG présentait une déficience au niveau de la sous-unité α IIb, bien qu'une anomalie au niveau de la sous-unité β_3 ne pouvait à ce stade-ci être totalement exclue (Macieira, Rivard et al. 2007).

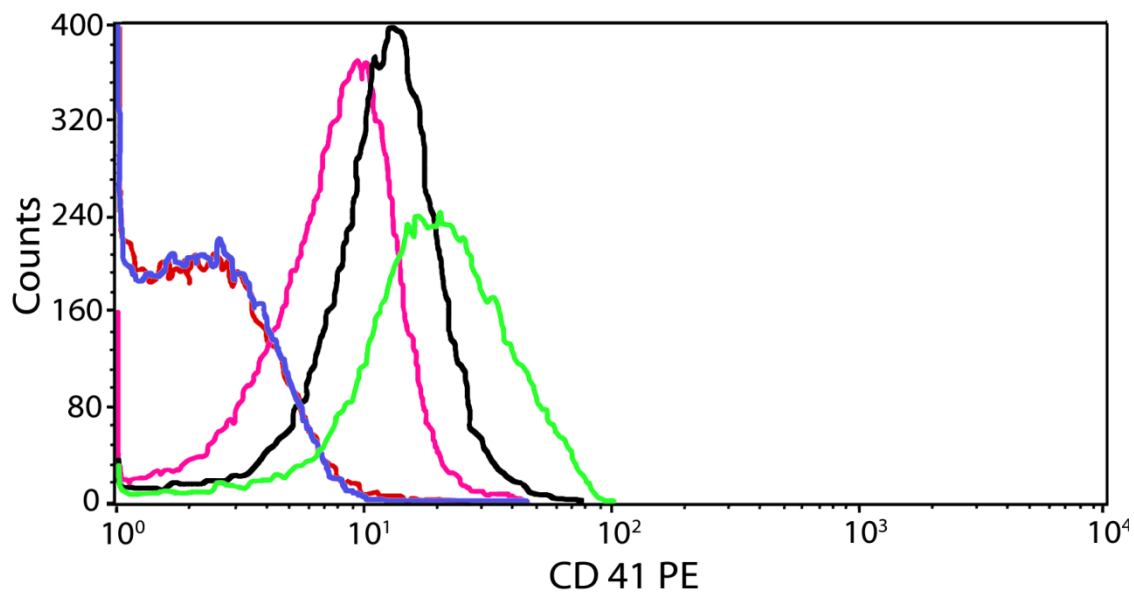


Figure 10 : Analyse par cytométrie de flux réalisée chez le cheval atteint de TG, sa mère, sa grand-mère et sur un cheval contrôle. Les anticorps CD41 (anti- α IIb) réagissent positivement avec les plaquettes du cheval contrôle (—), de la mère (—) et de la grand-mère (—) mais ne se lient pas avec la sous unité α IIb des plaquettes du patient (—).

CHAPITRE 2 – ARTICLE

CHARACTERIZATION OF THE cDNA AND GENOMIC DNA SEQUENCE
ENCODING FOR THE PLATELET INTEGRIN ALPHA IIB AND BETA III IN
A HORSE WITH GLANZMANN THROMBASTHENIA

Susana Macieira¹, Jaques Lussier², Christian Bédard³.

¹Department of Clinical Sciences, ²Department of Veterinary Biomedicine,

³Department of Pathology and Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine,

Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, QC, Canada

ABSTRACT

Glanzmann thrombasthenia (GT) is characterized by a defect of platelet aggregation. This autosomal recessive genetic disorder is caused by an abnormality of the platelet glycoprotein receptors alpha IIb or beta III. Recently, we identified a horse with clinical and pathological features of GT. The aim of this study was to describe this case of GT at the molecular level. A point mutation from G to C in exon 2 of *ITGA2B* causing a substitution of the expected amino acid arginine 72 (Arg⁷²) by a proline (Pro⁷²) was encountered. This amino acid change may result in abnormal structural conformations that yield an inactive alpha IIb subunit. The genomic DNA analysis showed that this horse was homozygous for the missense mutation.

KEY WORDS

Glanzmann thrombasthenia • hemostasis • horse • exon2 mutation

Introduction

Glanzmann's thrombasthenia (GT) is a rare genetic disorder affecting platelet function that was first described in humans in 1918.⁽¹⁾ It is an inherited disease transmitted through an autosomal recessive mode. This disorder is characterized by quantitative or qualitative defects in the platelet glycoprotein receptors alpha IIb (GPIIb) or beta III (GPIIIa). These two subunits interact to form the alpha and the beta subunit of the GPIIb/IIIa complex, also known as the α IIb/ β 3 that belongs to the integrin class of cell adhesion molecule receptors.⁽²⁾ The α IIb and β 3 subunits are encoded by the integrins alpha-2B (*ITGA2B*) gene and beta-3 (*ITGB3*) gene respectively. The glycoprotein receptor GPIIb/IIIa, a calcium-dependent heterodimeric complex is crucial for platelet aggregation. The receptor mediates the interaction of activated platelets with ligands, including fibrinogen, von Willebrand factor, vitronectin, and fibronectin.⁽²⁾ A deficiency of the receptor leads to life-long cutaneous bleeding.⁽³⁾ In human GT, many gene mutations affecting *ITGA2B* and *ITGB3* have been reported. These include: nonsense mutations (and stop codons), gene deletions, insertions or inversions, splice site mutations, and missense mutations.^(4,5) In veterinary medicine, GT has been diagnosed in

dogs (Great Pyrenees, Otterhounds), a Thoroughbred-cross and a Quarter Horse.

Recently, an Oldenbourg filly was presented with bleeding diathesis to the Centre Hospitalier Universitaire Vétérinaire de l'Université de Montréal. Abnormal laboratory findings included prolonged oral mucosal bleeding time (>12 hours), prolonged closure time with collagen/ADP (>300 seconds), and absence of clot retraction after 60 minutes. Platelet aggregation responses to ADP and collagen were profoundly reduced. Flow cytometry showed an absence of CD41 (GPIIb) on the patient's platelets, supporting a diagnosis of GT, likely caused by a mutation in *ITGA2B*.⁽⁶⁾

In horses, one single guanine to cytosine substitution in codon 41 localized in exon 2 and a 10-bp deletion, that includes the splice site at the end of exon 11 of the α IIb are known.^(7,8,9) Mutations that impair the synthesis of either α IIb or β 3 prevent the export of sufficient numbers of α IIb β 3 complexes to the platelet cytoplasmic membrane resulting in GT. However, α IIb or β 3 mutations that have no apparent effect on the synthesis of either subunit can also give rise to GT either by perturbing the conformation of pro- α IIb β 3 complexes so that they fail to be exported out of the endoplasmic reticulum or by impairing α IIb β 3 function.⁽¹⁰⁾

The objectives of this study were to characterize mutational defects in an Oldenburg filly that presented phenotypic features of GT.⁽⁶⁾ Initially, we characterized the open reading frame encoding for *ITGA2B* and *ITGB3* by sequencing cDNAs generated from reverse-transcribed total RNA isolated from the platelet-enriched fraction of blood. At the genomic level, we also characterized the *ITGA2B* proximal promoter and intron-exon boundaries. Nucleotide sequences were compared between an in-house blood donor control horse and the GT horse. A genotype study of *ITGA2B* exons 2 and 24 was performed for the GT horse, her sire, dam and grand dam, as well as five control horses using genomic DNA isolated from white blood cells.

Materials and methods

Animals

An 18-month-old Oldenburg filly was determined to have clinical and laboratory findings consistent with GT.⁽⁶⁾ Her parents (sire, dam) and grand dam did not suffer from any hematological disorder nor had recognized inbreeding. A control horse without the bleeding disorder was used for the complete characterization of *ITGA2B* and *ITGB3* cDNA; it was the blood

donor for the past 10 years at the equine hospital at the Centre Hospitalier Universitaire Vétérinaire de l'Université de Montréal. Five other control horses (teaching herd) that had no clinical signs of the bleeding disease also served as controls for the characterization of the specific mutation in exon 2 or single nucleotide polymorphism in exon 24 of *ITGA2B*.

Preparation of platelets

Platelets were isolated from 140 ml of ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA)-anticoagulated whole blood from the patient and a control horse. Platelet-rich plasma (PRP) from the two horses was obtained by differential centrifugation at 150g for 15 min at 22 °C. The supernatant (PRP) was collected and centrifuged at 2,000g for 15 min. The obtained pellet contained a rich concentrate of platelets: $146 \times 10^9/L$ for the control horse, and $169 \times 10^9/L$ for the GT horse. The buffy coat from the first centrifugation was collected for isolation of the genomic DNA whereas total RNA was isolated from the PRP pellet.

Isolation of total RNA and genomic DNA

Pellets of platelet concentrate from the thrombasthenic and control horses were homogenized in guanidium isothiocyanate lysis buffer, and total RNA was sedimented on a cesium chloride cushion by ultracentrifugation

followed by phenol/chloroform extraction, as previously described.⁽¹¹⁾ The concentration of total RNA was evaluated by optical density at 260 nm, and quality was estimated by visualizing the 28S and 18S ribosomal bands following electrophoretic separation on 0.66 M formaldehyde denaturing 1% agarose gel using ethidium bromide. Genomic DNA of the thrombasthenic and control horses was isolated from white blood cells in EDTA-anticoagulated whole blood. The buffy coat was treated with a red blood cell lysis solution (0.83% ammonium chloride) followed by serial phenol-chloroform extractions and precipitated with ethanol, as previously described.⁽¹²⁾ Genomic DNA from the dam, sire, and grand dam of the patient and 5 other control horses was isolated from the buffy coat of EDTA-anticoagulated whole blood using a kit (QIAamp blood and tissue kit; QIAGEN Corporation, Chatsworth, California, USA). The DNA concentration was evaluated by optical density at 260 nm using a NanoDrop apparatus which is a spectrophotometer for nucleic acid and protein quantitation (Thermo Scientific, Wilmington, USA).

Generation of cDNA from platelet RNA

Platelet mRNA was converted to cDNA by reverse transcription (RT). First strand cDNAs were generated using 2 μ M oligo(dT)₁₂₋₁₈ primers in a

total volume of 20 μ l containing 4 μ l of 5X RT buffer (250 mM Tris-HCl pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂; Invitrogen), 10 mM DTT, 0.75 mM dNTP mix (GE Healthcare Bio-Sciences Inc.), 1 μ g of total RNA and 1 μ l (200 units) of Superscript III reverse transcriptase (Invitrogen), and incubated at 37°C then at 42°C for 30 min each.

Polymerase chain reaction (PCR) amplification from cDNA

PCR amplification of *ITGA2B* and *ITG3B* coding sequences was performed using equine specific oligonucleotides as described in Table I. Oligonucleotides were synthesized by Invitrogen. A pre-denaturation step at 94°C for 1 min was initially performed. PCR amplification was performed for 30 cycles under the following conditions: denaturation, 94°C for 30 sec; annealing, 64°C for 30 sec; and extension, 68°C for 2 min. The reaction volume was 25 μ l and consisted of 2.5 μ l of 10X Advantage 2 PCR buffer (Clontech), 1.5 μ l dNTP mix (10 mM each), 1.5 μ l of each forward and reverse primers (10 μ M), 1 μ l of cADN mix, and 0.5 μ l of 50X Advantage 2 polymerase mix (Clontech).

PCR amplification from genomic DNA

Missense mutations found in exons 2 and 24 for the *ITGA2B* cDNA were further analyzed at the DNA level to determine the genotype of the

thrombasthenic patient and her relatives (sire, dam and grand dam) as well as five control horses. Furthermore, the proximal promoter of *ITGA2B* was characterized and exon and intron boundaries of the thrombasthenic patient were identified. A pre-denaturation step at 95°C for 10 min was initially done using 1 µg of genomic DNA. PCR amplification was performed for 40 cycles using the following conditions: denaturation at 95°C for 30 sec, annealing at 64°C for 45 sec, and extension at 68°C for 1 min. The same reagents and concentrations described for the PCR amplification of cADN were used with the addition of a drop of mineral oil. The list of forward and reverse primers used to amplify equine *ITGA2B* from genomic DNA is provided in Table II.

Nucleic acid sequencing and analyses

The amplified products were resolved on a 1% to 2% agarose gel in TAE buffer (40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA, 0.5 µg/mL ethidium bromide) for 45 to 60 min at 125 V. Specific PCR products were purified from agarose gel using a kit (QIAquick gel extraction kit; Qiagen) then sequenced on a ABI Prism 310 Genetic Analyzer machine (Applied BioSystem, Foster city, California) which is an automated single-capillary genetic analyzer designed for a wide range of sequencing and fragment analysis applications. Sequence

analyses were done using the basic local alignment search tool (BLAST) and compared with GenBank nucleotide data banks.

Results

Polymerase chain reaction amplification from cDNA of ITGA2B and ITG3B.

In the thrombasthenic patient, the only abnormality identified was a point mutation from G to C in exon 2 of *ITGA2B* causing a substitution of the expected amino acid arginine 72 (Arg⁷²) by a proline (Pro⁷²). In the control horse, an A to G point mutation was identified in exon 24 of *ITGA2B* causing a substitution of the expected amino acid arginine 798 (Arg⁷⁹⁸) by a glycine (Gly⁷⁹⁸). Analysis of the cDNA sequence for *ITG3B* revealed no amino acid changes in the thrombasthenic patient or the control horse.

Polymerase chain reaction amplification from genomic DNA

Analysis of genomic DNA for exon 2 of *ITGA2B* showed that the thrombasthenic horse was homozygous for the missense mutation G to C (Figure 1). Analysis of the dam, sire and grand dam showed that these animals were heterozygous for this nucleic acid change whereas the six control horses showed no base substitution at exon 2. The nucleic acid

sequence generated by PCR for the *ITGA2B* of the control horse was deposited into GenBank (EU493340). Analysis of the genomic DNA for exon 24 of *ITGA2B* of the control horse demonstrated that it was homozygous for the A to G point mutation (Figure 2). The thrombasthenic horse and her relatives (sire, dam and grand dam), as well as the five other control horses, showed no base substitution in exon 24 of *ITGA2B*.

Discussion

We have investigated the molecular basis for the bleeding diathesis in an Oldenbourg filly whose clinical laboratory findings were consistent with GT.⁽⁶⁾ Nucleotide sequencing of the *ITGA2B* cDNA revealed a point mutation from G to C in exon 2 whereas the proximal promoter and all exon and intron boundaries were normal. Analysis of genomic DNA for exon 2 of *ITGA2B* showed that the thrombasthenic horse was homozygous for the missense mutation G to C causing a substitution of the expected amino acid arginine 72 (Arg⁷²) by a proline (Pro⁷²). The dam, sire and grand dam were heterozygous for the defect. The genomic DNA sequences encoding exon 2 in the six normal horses showed no base substitution at this site. In veterinary medicine, all gene mutations identified for GT thus far have been in the *ITGA2B*. In GT

horses, one mutation has been identified as a single nucleotide change, a guanine to a cytosine in codon 41 in exon 2 of *ITGA2B* resulting in the substitution of an arginine for a proline.⁽⁸⁾ The latter mutation located in exon 2 corresponds to the one we have identified in the present study. Their amino acid annotation excludes the signal peptide.

In humans, a substitution of T to C was found at base 258 in exon 2 resulting in a leucine 55 to a proline substitution in the integrin α II β . Experiments using in vitro transfected cells with either human normal or C²⁵⁸ mutated α II β cDNAs co-transfected with the wild-type β 3 cDNA, have shown that the α II β 3 complex was scarcely expressed for the C²⁵⁸ mutated α II β cDNAs as compared with normal, demonstrating that this mutation is responsible for this specific human case of GT.⁽¹³⁾

The arginine residue at position 72 (VVGAPRTLG) in horse integrin α IIb is found in a highly conserved region when compared with α IIb sequences of others species such as humans, rats, dogs and pigs, suggesting that this residue is localized in a site probably contributing to the conformation or the function of the receptor. In humans, the amino-terminal region of α IIb, the first 334 amino acids, has been shown to contribute to the ligand-binding pocket of the α IIb β 3, and several mutations in humans

affected by GT have been identified in that region. ⁽¹⁴⁾ (<http://sinaicentral.mssm.edu/intranet/research/glanzmann>). In our patient, the substitution Arg72Pro is localized in this functional region. In general, the change of an arginine for a proline residue is predicted to affect secondary structure as a consequence of the ring and the tertiary nitrogen of the prolyl residue. Within the normal architecture of a protein molecule, proline residues can usually be found in regions of change of direction.⁽¹⁵⁾ These observations led to the conclusion that prolyl residues perturb the structure of the preceding amino acid residues due both to steric interactions and to prevention of hydrogen bond formation with carbonyls in the preceding turn of the helix. Due to the high similarity, at the amino acid level, between humans and horse, we hypothesized that the substitution Arg72Pro causes an aberrant conformational change in the encoded protein that prevents association of α IIb with β 3, with the ultimate lack of expression of the complex on the surface of platelets. Our hypothesis is upheld by the lack of detection of the α IIb β 3 complex on platelets membranes following our attempt to detect the α IIb β 3 complex by fluorescence flow cytometry analysis using an antibody against the protein complex.⁽⁶⁾

Another interesting finding was an A to G point mutation identified in exon 24 of *ITGA2B* causing substitution of Arg⁷⁹⁸ to Gly in the control horse.

The α IIb Arg⁷⁹⁸ residue is not highly conserved when compared to other mammalian and human integrins. Furthermore in bovine species, a Gly⁷⁹⁸ was characterized (GenBank: BC147903). Comparison of adjacent amino acids to Arg⁷⁹⁸ among different species showed that this region of the protein is not well conserved, in opposition to the well conserved region of exon 2. This control horse was the blood donor, for the past 10 years, at the equine hospital. Mucosal bleeding time and platelet aggregation studies were unremarkable, and no signs or history of bleeding diathesis were ever reported for that horse. The GT horse and her relatives (sire, dam and grand dam), as well as the five other control horses, showed no base substitution in exon 24 of *ITGA2B*. For this reason, it is probable that the Arg⁷⁹⁸Gly substitution is due to a single nucleotide polymorphism that translates into an amino acid change without functional modification. The glycine residue, with only a hydrogen atom as a side chain, can adapt to conformational strain imposed by other amino acids of the sequence. To our knowledge, only one mutation in exon 24 of human *ITGA2B* that corresponds to an His⁸¹³Asn substitution, was described in a GT patient.⁽¹⁶⁾ That mutation is localized to the calf-2 domain and contact between the calf-2 domain of α IIb and β 3.⁽¹⁷⁾ The partial disruption of this contact due to mutation does not influence the

complex formation with $\beta 3$, but could be responsible for the impaired transport of the aberrant complex from the endoplasmic reticulum.⁽¹⁸⁾

In conclusion, we have identified an *ITGA2B* point mutation, an Arg72Pro substitution producing a GT phenotype in an Oldenburg filly. A nucleotide polymorphism was also found in a healthy horse which causes a change in the amino acid sequence Arg798Gly without altering the functional aspect of the protein.

ACKNOWLEDGMENTS

Supported by a Pfizer research grant (to C.B. and S.M.) and a Discovery Grant (to J.G.L.) from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC). The nucleotide sequence reported in this paper has been submitted to GenBank with accession number EU493340. The authors thank Mrs. Manon Salvas for her technical assistance during nucleic acid sequencing and Dr. Christine Theoret (Université de Montréal) for constructive comments on the manuscript.

REFERENCES

1. Glanzmann E: Hereditäre hämorrhagische Thrombasthenie. Ein Beitrag zur Pathologie de Blutplättchen. J Kinderkr 88:1-42, 1918.
2. Phillips DR, Charo IF, Parise LV et al. The platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa complex. Blood 71:831, 1988.
3. George JN, Caen JP, Nurden AT. Glanzmann's thrombasthenia: the spectrum of clinical disease. Blood 75:1383–1395, 1990.
4. French DL. The molecular genetics of Glanzmann's thrombasthenia. Platelets 9:5–20, 1998.
5. Nurden AT. Inherited abnormalities of platelets. Thromb Haemost 82:468–80, 1999.
6. Macieira S, Rivard GE, Champagne J et al. Glanzmann's thrombasthenia in a horse. Vet Clin Pathol 36:204–208, 2007.
7. Livesey L, Christopherson P, Hammond A et al. Platelet dysfunction (Glanzmann's Thrombasthenia) in horses. J Vet Intern Med 19:917–919, 2005.
8. Christopherson PW, Insalaco TA, van Santen VL et al. Characterization of the cDNA encoding α IIb and β 3 in normal horses and two horses with Glanzmann thrombasthenia. Vet Pathol 43:78–82, 2006.

9. Christopherson PW, van Santen VL, Livesey L et al. A 10-basepair deletion in the gene encoding platelet glycoprotein IIb associated with Glanzmann Thrombasthenia in a horse. *J Vet Intern Med* 21:196–198, 2007.
10. French DL and Seligsohn U. Platelet glycoprotein IIb/IIIa receptors and Glanzmann thrombasthenia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20: 607–610, 2000.
11. Bédard J, Brûlé S, Price CA et al. Serine protease inhibitor-E2 (SERPINE2) is differentially expressed in granulosa cells of dominant follicles in cattle. *Molecular Reproduction and Development* 64:152–165, 2003.
12. Sambrook J and Russell DW. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 2001.
13. Tanaka S, Hayashi T, Hori Y et al. A Leu55 to Pro substitution in the integrin α IIb is responsible for a case of Glanzmann's thrombasthenia. *Br J Haematol* 118:833-835, 2002.
14. Loftus JC, Halloran CE, Ginsberg MH et al. The amino-terminal one-third of α IIb defines the ligand recognition specificity of integrin α IIb β 3. *J Biol Chem* 271:2033-2039, 1996.

15. Yaron A, Naider F. Proline-dependent structural and biological properties of peptides and proteins. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 28:31, 1993.
16. Gergely L, Nurit R, Zoltán B et al. Three novel mutations in the glycoprotein IIb gene in a patient with type II Glanzmann thrombasthenia. *Haematologica* 92:698-701, 2007.
17. Calvete JJ, Mann K, Alvarez MV et al. Proteolytic dissection of the isolated platelet fibrinogen receptor, integrin GPIIb/IIIa: localization of GPIIb and GPIIIa sequences putatively involved in the subunit interface and in intra-subunit and intrachain contacts. *Biochem J* 282:523-32, 1992.
18. Rosenberg N, Yatuv R, Sobolev V et al. Major mutations in calf-1 and calf-2 domains of glycoprotein IIb in patients with Glanzmann thrombasthenia enable GPIIb/IIIa complex formation, but impair its transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus. *Blood* 101:4808-15, 2003.

Table I. Forward and reverse primer sequences (5' to 3' direction) used for PCR amplification of equine *ITGA2B* and *ITGB3* cDNAs.

Gene	Forward primer*	Reverse primer*	Amplicon size (bp)
<i>ITGA2B</i>	ATGGCCAGAGCTTTGCGT CCACTTC	GACTCCCACACACATCTGAT GTC	1570
	GTCCAGCTGCTAGTGAA CGATTTCG	TCACTCATCTTCTTCATCTTC TTCCAGC	1650
<i>ITGB3</i>	ATGCGAGCGCGGCTGCT CTGG	GCGTTGAAGGATAGAGACA ACTC	1181
	TCTACCGATTCTAGCAAT GTCCTC	CTGTAAACATGACAGCAGA GACAC	1362

*Oligonucleotide sequences for *ITGA2B* and *ITGB3* were derived from GenBank entries AY999064 and AY322154, respectively.

Table II. Forward and reverse primer sequences (5' to 3' direction) used for PCR amplification of equine *ITGA2B* genomic DNA.

<i>ITGA2B</i> gene fragment	Forward primer*	Reverse primer*	Amplicon size (bp)
Prom 2	GAGGAAGCTACTGCACCA ATATGG	TTCGGTTTCCACCACA GGAAGTC	558
Prom 1 to Exon 1	CCAAATAGGTCCAGCTCC TATAGC	CTATCATAAGTGGGG AACTCGAGG	430
Intron 1 to Exon 3	GATAGTCTAGGAGGTCTC ATTGAG	CTCATCATCTGGAGGA CACAAGAG	359
Exon 2 to Intron 4	CTGTCCTTCGACCTCAGTG AGTC	GCGCTAGGACGATCA GATTAAGG	549
Intron 4 to Intron 5	CTCCAGCGAAGGCATTCT TGACC	TGCTCCCTACTTGCCT GAGTGAC	126
Intron 4 to Exon 7	CTCCAGCGAAGGCATTCT TGACC	ATGGAATCGAATGTG AAGCGCTGG	413
Exon 6 to Exon 8	CTTAGGTACGTGACCATC CATAAC	TAGTGCTGAGATCTTC ATCGAACTC	636
Exon 8 to Exon 10	GTTTCGATGAAGATCTCAG CACTACAG	TGCAGCATCCTGGAA AGTTCCGAG	416
Intron 9 to Intron 11	CTTGGCATCCTGAATCCCT GACTC	ATCTGCTGGTCCATCT TCACTCTC	515

Intron 10 to Intron 12	AGAGGGTCCCATGTCCAG GATCG	GGTCTCCCTTAACTCT CTCCTGC	643
Intron 12 to Intron 13	GATCTTTGCATCCCTCTCC TGGTC	GGCTGTCTCTCAGTAT CTCCAGC	378
Intron 12 to Intron 16	GTCTGGGCAGAGAAGGA GCTCC	AGGATCTCCCTGACCA GCCTCAG	1021
Exon 13 to Exon 16	CCTTCGAGGTGCCACAGA CATCG	CAGTGACTCCCACAC ACATCTGG	694
Exon 16 to Intron 18	GCAGCTTTGACATCCAGA TGTGTG	GATTAGAGGTGACAT CAAGGCTTGG	664
Intron 18 to Intron 20	CCAAACTCCTTTCATTCTC AGACC	GATGAGAGTCAAGGC TCCTGTGC	543
Intron 20 to Intron 22	TGGGCTGCTCTGTAAGT CCTTC	GAGGGTCTCTGTAGCA GGATCAG	569
Intron 22 to Intron 24	CCCTGACCTGATTCTCCTG TCTCC	GATGTTAGGTAGCTCA GCAACTAGC	412
Intron 24 to Intron 26	GCTGAGCTACCTAACATC CTGCTG	CCTGCTGGAGACCGC AGAGTCTG	465
Intron 26 to Intron 27	CTTCTCGAGAGAGTGGAC TGAGC	CTCTCCCCAGAGCATA ATCAGTCC	305
Intron 27 to Intron 29	GAAGGGATGGGATTAGGC CAGG	ATCTCTCTCTGCCTCC CTGTGAG	600
Intron 29 to Intron 30	GCATACTTCCCTCCACGGC TGCTC	CTCTAGTTGTGGGTCC CTCTAGTTG	638
Intron 30	TGCTCAAGTGGCGTCCCA CATG	TGTTGCTGCTCCATC TCAGCAC	703

*Oligonucleotide sequences for *ITGA2B* were derived from GenBank entry NC_009154.

Figure 1: Identification of mutations in exon 2 of the *ITGAB2*. Genomic DNA analysis of horse C revealed that it was homozygous for the missense mutation G to C whereas horse B was heterozygous for the same mutation. A) Control horse; B) dam of the thrombasthenic patient; and C) thrombasthenic patient.

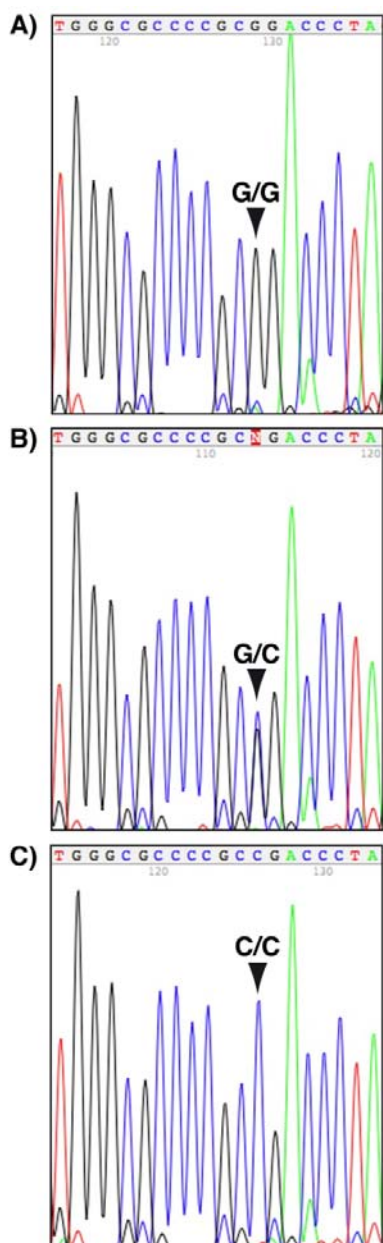
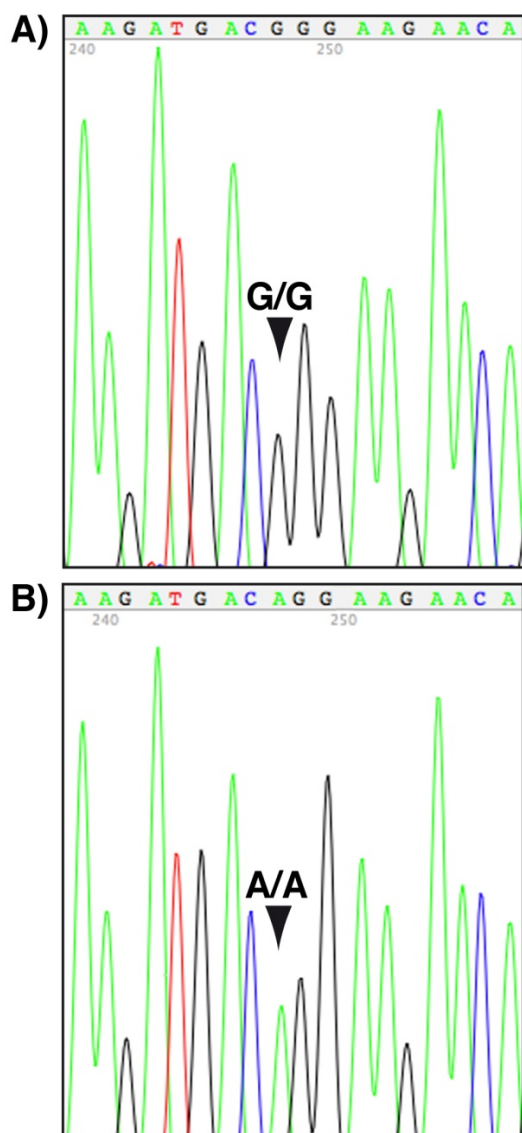


Figure 2: Identification of mutations in exon 24 of the *ITGAB2*. Genomic DNA analysis of horse A revealed that it was homozygous for the missense mutation A to G. A) Control horse; and B) thrombasthenic patient.



CHAPITRE 3 – DISCUSSION GÉNÉRALE

Le séquençage de l'ADNc d'*ITGA2B* a mis en évidence une substitution d'une guanine par une cytosine au niveau de l'exon 2. Les séquençages du promoteur proximal, de tous les autres 29 exons ainsi que les jonctions introns/exons étaient normaux comparativement à un cheval contrôle (donneur de sang du Centre hospitalier universitaire vétérinaire). Au niveau de l'analyse de l'ADN génomique, le séquençage de l'exon 2 d'*ITGA2B* a permis de démontrer que notre cheval atteint de TG était homozygote pour la mutation d'une guanine en cytosine causant ainsi le remplacement de l'arginine en position 72 (Arg⁷²) par une proline (Pro⁷²). Une étude génétique a été également réalisée chez la mère, le père et la grand-mère de notre patient et elle a révélé que tous étaient hétérozygotes pour la mutation au niveau de l'exon 2. La mère et la grand-mère du patient atteint n'ont jamais présenté de signes cliniques compatibles avec un problème de coagulation. Ces deux chevaux ont également subi des études d'agrégation plaquettaire et de cytométrie de flux, qui se sont révélés normaux. Il n'y avait pas de consanguinité rapportée au niveau des parents et des grands parents du patient atteint de TG. Le séquençage de l'exon 2 au niveau génomique a été également réalisé sur six chevaux normaux (sans signes cliniques de

maladie hémorragique) et n'a révélé aucune mutation. En médecine vétérinaire, toutes les mutations associées à la TG ont été identifiées au niveau d'*ITGA2B*. Chez les chevaux atteints de TG, une substitution d'une guanine en une cytosine a été identifiée au niveau du codon 41 de l'exon 2 d'*ITGA2B* qui résultait en la substitution d'une arginine en une proline. Cette mutation a été décrite chez 2 chevaux atteints de TG. Cette mutation localisée au niveau de l'exon 2 (codon 41) correspond à celle qui a été trouvée sur notre patient atteint de TG, par contre leur annotation d'acides aminés diffère de la notre par le fait qu'ils ont exclu le peptide signal.

En médecine humaine, 4 différentes anomalies ont été décrites au niveau de l'exon 2 :

- Substitution d'une thymine (T²⁵⁸) par une cytosine (C²⁵⁸) résultant en une substitution d'une leucine 55 par une proline 55 (Tanaka, Hayashi et al. 2002).
- Délétion d'une cytosine en position 288 (Tao, Arias-Salgado et al. 2000; Vijapurkar, Ghosh et al. 2009).
- Insertion d'une guanine en position 243 provoquant un décalage du cadre de lecture (Peretz, Rosenberg et al. 2006).

- Mutation au site d'épissage IVS 2 (+1)G→A (Vijapurkar, Ghosh et al. 2009).

Quelques expériences *in vitro* ont été réalisées sur des cellules transfectées avec l'ADNc humain normal et l'ADNc muté (exon 2) du récepteur plaquettaire α IIb et β_3 . Les résultats de ces études ont démontré que les cellules ayant l'ADNc muté de la sous-unité α IIb exprimaient à peine le complexe α IIb- β_3 à leurs surfaces comparativement à celles qui possédaient l'ADNc normal. Ces études concluaient également que les mutations au niveau de l'exon 2 étaient responsables du phénotype thrombasthénique des patients. De plus, elles ont aussi déterminé que l'hétérodimérisation de l'intégrine α IIb- β_3 exige l'intégrité des exons 2 et 3 de la sous-unité α IIb (Tao, Arias-Salgado et al. 2000; Peretz, Rosenberg et al. 2006).

Chez notre patient, nous avons mis en évidence le remplacement de l'arginine en position 72 (Arg⁷²) par une proline (Pro⁷²). La position 72 de l'arginine est hautement conservée comparativement aux séquences codant pour la sous-unité α IIb dans d'autres espèces telles que chez l'humain, le rat, le chien, le porc (tableau III). Cela pourrait suggérer que l'arginine en position 72 serait localisée dans un site clé qui interviendrait dans la conformation ou dans la fonction de l'intégrine α IIb- β_3 . Par ailleurs, chez l'homme, la région

amino-terminale de la sous-unité α IIb comprenant les premiers 334 acides aminés contribuent au domaine de liaison du ligand de l'intégrine α IIb- β ₃ (Loftus, Halloran et al. 1996).

Description	Exon 2: R72P
Equus caballus	IV <u>V</u> GAP <u>R</u> TL <u>G</u> RSQ
Pan troglodytes	IV <u>V</u> GAP <u>R</u> TL <u>G</u> PSQ
Macaca mulatta	IV <u>V</u> GAP <u>R</u> TL <u>G</u> PSQ
Canis familiaris	FV <u>V</u> GAP <u>R</u> TL <u>G</u> RSQ
Homo sapiens	IV <u>V</u> GAP <u>R</u> TL <u>G</u> PSQ
Bos taurus	VV <u>V</u> GAP <u>R</u> TL <u>G</u> HSE
Oryctolagus cuniculus	IV <u>V</u> GAP <u>R</u> TL <u>G</u> L <u>G</u> Q
Sus scrofa	IV <u>V</u> GAP <u>R</u> TL <u>G</u> RNL
Mus musculus	IV <u>V</u> GAP <u>R</u> ALNASQ
Rattus norvegicus	IV <u>V</u> GAP <u>R</u> ALNANQ

Tableau III : séquence en acides aminés de l'exon 2 (arginine –R en position 72) chez différentes espèces.

Des études de Yaron ont déterminé que le fait qu'une arginine soit remplacée par une proline amenait à des anomalies structurales au niveau de la sous-unité α IIb (Yaron et Naider 1993). La proline entraînerait des changements de configuration au niveau des protéines en raison des restrictions que la structure de son noyau pyrrole impose. Habituellement, les résidus de proline sont retrouvés dans les régions de changements de direction (fin des hélices α , bords des feuillets β) car ils empêcheraient la constitution des liaisons hydrogènes de la structure secondaire (Yaron et Naider 1993). En raison de la grande similitude en acides aminés de la région, notre hypothèse est que la substitution de l'Arg72 par une Pro72 causerait une conformation anormale de la sous-unité α IIb qui aurait comme conséquence un manque d'expression du complexe α IIb- β_3 à la surface des plaquettes. Notre hypothèse est soutenue par le fait que lors des études de cytométrie de flux, les résultats ont montré l'absence d'expression du complexe CD41 et une diminution de l'expression du complexe CD41/CD61 au niveau des plaquettes du patient atteint de TG comparativement à notre cheval contrôle (Macieira, Rivard et al. 2007).

Une autre trouvaille intéressante de notre étude a été l'identification d'une substitution d'une adénosine par une guanine au niveau de l'exon 24 d'*ITGA2B* de notre cheval contrôle. Au niveau de l'analyse de l'ADN

génomique, le séquençage de l'exon 24 d'*ITGA2B* a permis de démontrer que notre cheval contrôle était homozygote pour la mutation d'une adénosine en guanine causant ainsi le remplacement de l'arginine (Arg⁷⁹⁸) en glycine (Gly⁷⁹⁸). Ce cheval contrôle est donneur de sang du Centre hospitalier universitaire vétérinaire et n'a jamais présenté de signes cliniques compatibles avec un problème de coagulation. Avant son implication dans l'étude, il avait également subi un temps de saignement buccal et des études d'agrégation plaquettaire, qui se sont révélés normaux. Le cheval atteint de TG, sa mère, son père, sa grand-mère et 6 autres chevaux contrôle n'ont montré aucune mutation au niveau de l'exon 24. Cette mutation, par extrapolation des études en médecine humaine, serait localisée dans le domaine calf-2 et elle n'aurait aucune influence sur la formation du complexe $\alpha\text{IIb}-\beta_3$. Les mutations au niveau de l'exon 24 chez l'homme sont très peu décrites. Par ailleurs, la position 798 de l'arginine d'*ITGA2B* est très peu conservée parmi les différentes espèces (tableau IV). Pour cette raison, il est très probable que la substitution de l'Arg⁷⁹⁸Gly soit uniquement un simple polymorphisme de nucléotide (Rosenberg, Yatuv et al. 2003).

Description	Exon 24 R798G
Équus caballus	AAEEDDR-KNSSD
Pan troglodytes	AAEEGEREQNSLD
Macaca mulatta	AAEEGDREQNSLD
Canis familiaris	VAEEDNRENSSES
Homo sapiens	AAEEGEREQNSLD
Bos taurus	AAEEGNGQNSSDS
Oryctolagus cuniculus	AEEGDQEQNSLDL
Sus scrofa	AA-EGDWENSSDN
Mus musculus	AAEEGDREQEDLD
Rattus norvegicus	AAEEVDKEQDGLD

Tableau IV : Séquence en acides aminés de l'exon 24 (arginine –R en position 798) chez différentes espèces.

Comme déjà mentionné, la substitution d'une guanine par une cytosine au niveau de l'exon 2 a été tout d'abord décrite chez 2 chevaux de race Quarter Horse et Thoroughbred. Notre patient est de race Oldenbourg. L'Oldenbourg est une race de cheval de selle qui existe depuis le XVIème siècle, qui est originaire d'Allemagne et qui est né à partir de croisements entre juments

d'usage agricole et carrossier à l'origine et les meilleurs étalons d'Europe de l'époque. Au milieu du XXème siècle la race fut profondément modifiée par l'apport de Pur-Sang Anglais, de chevaux normands, de Trakehners et de Hanovriens pour arriver au cheval de sport qu'on connaît actuellement. Le fait que la même mutation ait été trouvée chez une autre race de cheval nous ferait penser que cette mutation serait assez présente dans l'espèce équine. Par ailleurs pour supporter cette hypothèse il serait fort intéressant d'étudier la prévalence de la substitution d'une guanine par une cytosine au niveau de l'exon 2 dans la population équine.

CHAPITRE 4 – CONCLUSION

Le but de notre étude était d'investiguer les bases moléculaires chez un jument de race Oldenbourg de 18 mois présentée au Centre hospitalier universitaire vétérinaire de l'Université de Montréal pour des problèmes de coagulation. Suite à une série de tests de dépistage, les résultats obtenus ont permis de supporter le fait que notre patient était atteint de TG et présentait une déficience au niveau de la sous-unité α IIb du récepteur plaquettaire. Le séquençage de l'ADNc d'*ITGA2B* a mis en évidence une mutation d'une guanine en cytosine au niveau de l'exon 2 causant ainsi le remplacement de l'arginine en position 72 (Arg⁷²) par une proline (Pro⁷²) au niveau d'une zone hautement conservée parmi différentes espèces de la protéine codante. C'est le premier cas de TG chez un cheval décrit au Canada. Les parents du patient atteint de TG étaient hétérozygotes pour cette mutation.

BIBLIOGRAPHIE

- Ambo, H., T. Kamata, et al. (1998). "Novel point mutations in the alphaIIb subunit (Phe289-->Ser, Glu324-->Lys and Gln747-->Pro) causing thrombasthenic phenotypes in four Japanese patients." Br J Haematol **102**(3): 829-840.
- Ambo, H., T. Kamata, et al. (1998). "Three novel integrin beta3 subunit missense mutations (H280P, C560F, and G579S) in thrombasthenia, including one (H280P) prevalent in Japanese patients." Biochem Biophys Res Commun **251**(3): 763-768.
- Awidi, A. S. (1983). "Increased incidence of Glanzmann's thrombasthenia in Jordan as compared with Scandinavia." Scand J Haematol **30**(3): 218-222.
- Bennett, J. S. and G. Vilaire (1979). "Exposure of platelet fibrinogen receptors by ADP and epinephrine." J Clin Invest **64**(5): 1393-1401.
- Benson, K. F., F. Q. Li, et al. (2003). "Mutations associated with neutropenia in dogs and humans disrupt intracellular transport of neutrophil elastase." Nat Genet **35**(1): 90-96.
- Berndt, M. C., Y. Shen, et al. (2001). "The vascular biology of the glycoprotein Ib-IX-V complex." Thromb Haemost **86**(1): 178-188.
- Boudreaux, M. K. and J. L. Catalfamo (2001). "Molecular and genetic basis for thrombasthenic thrombopathia in otterhounds." Am J Vet Res **62**(11): 1797-1804.
- Boudreaux, M. K., C. Crager, et al. (1994). "Identification of an intrinsic platelet function defect in Spitz dogs." J Vet Intern Med **8**(2): 93-98.
- Boudreaux, M. K., K. Kvam, et al. (1996). "Type I Glanzmann's thrombasthenia in a Great Pyrenees dog." Vet Pathol **33**(5): 503-511.
- Boudreaux, M. K. and D. L. Lipscomb (2001). "Clinical, biochemical, and molecular aspects of Glanzmann's thrombasthenia in humans and dogs." Vet Pathol **38**(3): 249-260.

- Bray, P. F., J. P. Rosa, et al. (1987). "Platelet glycoprotein IIb. Chromosomal localization and tissue expression." J Clin Invest **80**(6): 1812-1817.
- Bray, P. F. and M. A. Shuman (1990). "Identification of an abnormal gene for the GPIIIa subunit of the platelet fibrinogen receptor resulting in Glanzmann's thrombasthenia." Blood **75**(4): 881-888.
- Brdecka, D. J., C. A. Adin, et al. (2004). "Successful ovariectomy in a dog with Glanzmann thrombasthenia." J Am Vet Med Assoc **224**(11): 1796-1798, 1788.
- Caen, P. A. C., J.C. Leclerc, S. Inceman, M.J. Larrieu, M. Probst and Jean Bernard (1966). "Congenital bleeding disorders with long bleeding time and normal platelet count: I. Glanzmann's thrombasthenia (report of fifteen patients)" The American Journal of Medicine **41**, (1): Pages 4-26.
- Calvete, J. J. (1994). "Clues for understanding the structure and function of a prototypic human integrin: the platelet glycoprotein IIb/IIIa complex." Thromb Haemost **72**(1): 1-15.
- Calvete, J. J., A. Henschen, et al. (1991). "Assignment of disulphide bonds in human platelet GPIIIa. A disulphide pattern for the beta-subunits of the integrin family." Biochem J **274** (Pt 1): 63-71.
- Catalfamo, J. L., S. L. Raymond, et al. (1986). "Defective platelet-fibrinogen interaction in hereditary canine thrombopathia." Blood **67**(6): 1568-1577.
- Chow, T. W., J. D. Hellums, et al. (1992). "Shear stress-induced von Willebrand factor binding to platelet glycoprotein Ib initiates calcium influx associated with aggregation." Blood **80**(1): 113-120.
- Christopherson, P. W., T. A. Insalaco, et al. (2006). "Characterization of the cDNA Encoding alphaIIb and beta3 in normal horses and two horses with Glanzmann thrombasthenia." Vet Pathol **43**(1): 78-82.
- Christopherson, P. W., V. L. van Santen, et al. (2007). "A 10-base-pair deletion in the gene encoding platelet glycoprotein IIb associated with Glanzmann thrombasthenia in a horse." J Vet Intern Med **21**(1): 196-198.

- Coller, B. S., U. Seligsohn, et al. (1987). "Type I Glanzmann thrombasthenia patients from the Iraqi-Jewish and Arab populations in Israel can be differentiated by platelet glycoprotein IIIa immunoblot analysis." Blood **69**(6): 1696-1703.
- Davis, B., M. Toivio-Kinnucan, et al. (2008). "Mutation in beta1-tubulin correlates with macrothrombocytopenia in Cavalier King Charles Spaniels." J Vet Intern Med **22**(3): 540-545.
- Dodds, W. J. (1967). "Familial canine thrombocytopathy." Thromb Diath Haemorrh Suppl **26**: 241-248.
- Duperray, A., A. Troesch, et al. (1989). "Biosynthesis and assembly of platelet GPIIb-IIIa in human megakaryocytes: evidence that assembly between pro-GPIIb and GPIIIa is a prerequisite for expression of the complex on the cell surface." Blood **74**(5): 1603-1611.
- Escolar, G., E. Leistikow, et al. (1989). "The fate of the open canalicular system in surface and suspension-activated platelets." Blood **74**(6): 1983-1988.
- Fitzgerald, L. A., B. Steiner, et al. (1987). "Protein sequence of endothelial glycoprotein IIIa derived from a cDNA clone. Identity with platelet glycoprotein IIIa and similarity to "integrin"." J Biol Chem **262**(9): 3936-3939.
- Fox, J. E. (1985). "Linkage of a membrane skeleton to integral membrane glycoproteins in human platelets. Identification of one of the glycoproteins as glycoprotein Ib." J Clin Invest **76**(4): 1673-1683.
- Fox, J. E. (2001). "Cytoskeletal proteins and platelet signaling." Thromb Haemost **86**(1): 198-213.
- Frachet, P., A. Duperray, et al. (1992). "Role of the transmembrane and cytoplasmic domains in the assembly and surface exposure of the platelet integrin GPIIb/IIIa." Biochemistry **31**(8): 2408-2415.
- French, D. L. and B. S. Coller (1997). "Hematologically important mutations: Glanzmann thrombasthenia." Blood Cells Mol Dis **23**(1): 39-51.
- Frojmovic, M. M. and J. G. Milton (1982). "Human platelet size, shape, and related functions in health and disease." Physiol Rev **62**(1): 185-261.

- Frojmovic, M. M., T. Wong, et al. (1996). "Platelets from bleeding Simmental cattle have a long delay in both ADP-activated expression of GpIIB-IIIa receptors and fibrinogen-dependent platelet aggregation." Thromb Haemost 76(6): 1047-1052.
- Gader, A. G., A. K. Ghumlas, et al. (2008). "The ultrastructure of camel blood platelets: a comparative study with human, bovine, and equine cells." Platelets 19(1): 51-58.
- George, J. N. (2000). "Platelets." Lancet 355(9214): 1531-1539.
- George, J. N., J. P. Caen, et al. (1990). "Glanzmann's thrombasthenia: the spectrum of clinical disease." Blood 75(7): 1383-1395.
- Ginsberg, M. H., J. Forsyth, et al. (1983). "Reduced surface expression and binding of fibronectin by thrombin-stimulated thrombasthenic platelets." J Clin Invest 71(3): 619-624.
- Glanzmann (1918). "Hereditäre hämorrhagische Thrombasthenie. Ein Beitrag zur Pathologie de Blutplättchen. ." J Kinderkr 88: 1-42.
- Grimaldi, C. M., F. Chen, et al. (1996). "A Cys374Tyr homozygous mutation of platelet glycoprotein IIIa (beta 3) in a Chinese patient with Glanzmann's thrombasthenia." Blood 88(5): 1666-1675.
- Gu, J. M., W. F. Xu, et al. (1993). "Identification of a nonsense mutation at amino acid 584-arginine of platelet glycoprotein IIb in patients with type I Glanzmann thrombasthenia." Br J Haematol 83(3): 442-449.
- Hardisty, R. M., K. M. Dormandy, et al. (1964). "Thrombasthenia. Studies on Three Cases." Br J Haematol 10: 371-387.
- Hartwig, J. H. (2006). "The platelet: form and function." Semin Hematol 43(1 Suppl 1): S94-100.
- Heidenreich, R., R. Eisman, et al. (1990). "Organization of the gene for platelet glycoprotein IIb." Biochemistry 29(5): 1232-1244.
- Jennings, L. K. and D. R. Phillips (1982). "Purification of glycoproteins IIb and III from human platelet plasma membranes and characterization of a

calcium-dependent glycoprotein IIb-III complex." J Biol Chem **257**(17): 10458-10466.

Johnstone, I. B. and F. Lotz (1979). "An inherited platelet function defect in Basset hounds." Can Vet J **20**(8): 211-215.

Kaushansky, K. (2008). "Historical review: megakaryopoiesis and thrombopoiesis." Blood **111**(3): 981-986.

Khanduri, U., R. Pulimood, et al. (1981). "Glanzmann's thrombasthenia. A review and report of 42 cases from South India." Thromb Haemost **46**(4): 717-721.

Kieffer, N. and D. R. Phillips (1990). "Platelet membrane glycoproteins: functions in cellular interactions." Annu Rev Cell Biol **6**: 329-357.

Lanza, F., N. Kieffer, et al. (1990). "Characterization of the human platelet glycoprotein IIIa gene. Comparison with the fibronectin receptor beta-subunit gene." J Biol Chem **265**(30): 18098-18103.

Levy-Toledano, S. (1999). "Platelet signal transduction pathways: could we organize them into a 'hierarchy'?" Haemostasis **29**(1): 4-15.

Lipscomb, D. L., C. Bourne, et al. (1999). "DNA sequence of the canine platelet beta3 gene from cDNA: comparison of canine and mouse beta3 to segments that encode alloantigenic sites and functional domains of beta3 in human beings." J Lab Clin Med **134**(3): 313-321.

Lipscomb, D. L., C. Bourne, et al. (2000). "Two genetic defects in alphaIIb are associated with type I Glanzmann's thrombasthenia in a Great Pyrenees dog: a 14-base insertion in exon 13 and a splicing defect of intron 13." Vet Pathol **37**(6): 581-588.

Lipscomb, D. L., C. Bourne, et al. (2001). "Nucleotide sequence of the canine alphaIIb gene from platelet-derived cDNA." Am J Vet Res **62**(9): 1486-1492.

Livesey, L., P. Christopherson, et al. (2005). "Platelet dysfunction

- (Glanzmann's thrombasthenia) in horses." J Vet Intern Med **19**(6): 917-919.
- Loftus, J. C., C. E. Halloran, et al. (1996). "The amino-terminal one-third of alpha IIb defines the ligand recognition specificity of integrin alpha IIb beta 3." J Biol Chem **271**(4): 2033-2039.
- Macieira, S., G. E. Rivard, et al. (2007). "Glanzmann thrombasthenia in an Oldenbourg filly." Vet Clin Pathol **36**(2): 204-208.
- Miura, N., H. Senba, et al. (1987). "A case of equine thrombasthenia." Nippon Juigaku Zasshi **49**(1): 155-158.
- Morel-Kopp, M. C., C. Kaplan, et al. (1997). "A three amino acid deletion in glycoprotein IIIa is responsible for type I Glanzmann's thrombasthenia: importance of residues Ile325Pro326Gly327 for beta3 integrin subunit association." Blood **90**(2): 669-677.
- Moroi, M., S. M. Jung, et al. (1997). "Analysis of the involvement of the von Willebrand factor-glycoprotein Ib interaction in platelet adhesion to a collagen-coated surface under flow conditions." Blood **90**(11): 4413-4424.
- Moroi, M., S. M. Jung, et al. (1996). "Analysis of platelet adhesion to a collagen-coated surface under flow conditions: the involvement of glycoprotein VI in the platelet adhesion." Blood **88**(6): 2081-2092.
- Niiya, K., E. Hodson, et al. (1987). "Increased surface expression of the membrane glycoprotein IIb/IIIa complex induced by platelet activation. Relationship to the binding of fibrinogen and platelet aggregation." Blood **70**(2): 475-483.
- Nurden, A. T. (1995). "Polymorphisms of human platelet membrane glycoproteins: structure and clinical significance." Thromb Haemost **74**(1): 345-351.
- Nurden, A. T. (2006). "Glanzmann thrombasthenia." Orphanet J Rare Dis **1**: 10.
- Nurden, A. T. and J. P. Caen (1974). "An abnormal platelet glycoprotein pattern in three cases of Glanzmann's thrombasthenia." Br J Haematol **28**(2): 253-260.

- O'Toole, T. E., J. C. Loftus, et al. (1989). "Efficient surface expression of platelet GPIIb-IIIa requires both subunits." Blood **74**(1): 14-18.
- Peretz, H., N. Rosenberg, et al. (2006). "Molecular diversity of Glanzmann thrombasthenia in southern India: new insights into mRNA splicing and structure-function correlations of alphaIIb beta3 integrin (ITGA2B, ITGB3)." Hum Mutat **27**(4): 359-369.
- Peretz, H., N. Rosenberg, et al. (1995). "Glanzmann's thrombasthenia associated with deletion-insertion and alternative splicing in the glycoprotein IIb gene." Blood **85**(2): 414-420.
- Peyruchaud, O., A. T. Nurden, et al. (1998). "R to Q amino acid substitution in the GFFKR sequence of the cytoplasmic domain of the integrin IIb subunit in a patient with a Glanzmann's thrombasthenia-like syndrome." Blood **92**(11): 4178-4187.
- Phillips, D. R. and P. P. Agin (1977). "Platelet membrane defects in Glanzmann's thrombasthenia. Evidence for decreased amounts of two major glycoproteins." J Clin Invest **60**(3): 535-545.
- Phillips, D. R., I. F. Charo, et al. (1988). "The platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa complex." Blood **71**(4): 831-843.
- Plow, E. F. and T. Byzova (1999). "The biology of glycoprotein IIb-IIIa." Coron Artery Dis **10**(8): 547-551.
- Plow, E. F. and M. H. Ginsberg (1989). "Cellular adhesion: GPIIb-IIIa as a prototypic adhesion receptor." Prog Hemost Thromb **9**: 117-156.
- Poncz, M., R. Eisman, et al. (1987). "Structure of the platelet membrane glycoprotein IIb. Homology to the alpha subunits of the vitronectin and fibronectin membrane receptors." J Biol Chem **262**(18): 8476-8482.
- Raymond, S. L. and W. J. Dodds (1979). "Platelet membrane glycoproteins in normal dogs and dogs with hemostatic defects." J Lab Clin Med **93**(4): 607-613.
- Reed, G. L. (2004). "Platelet secretory mechanisms." Semin Thromb Hemost **30**(4): 441-450.

- Rendu, F. and B. Brohard-Bohn (2001). "The platelet release reaction: granules' constituents, secretion and functions." Platelets **12**(5): 261-273.
- Rosenberg, N., R. Yatuv, et al. (2003). "Major mutations in calf-1 and calf-2 domains of glycoprotein IIb in patients with Glanzmann thrombasthenia enable GPIIb/IIIa complex formation, but impair its transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus." Blood **101**(12): 4808-4815.
- Ruggeri, Z. M., R. Bader, et al. (1982). "Glanzmann thrombasthenia: deficient binding of von Willebrand factor to thrombin-stimulated platelets." Proc Natl Acad Sci U S A **79**(19): 6038-6041.
- Schlegel, N., O. Gayet, et al. (1995). "The molecular genetic basis of Glanzmann's thrombasthenia in a gypsy population in France: identification of a new mutation on the alpha IIb gene." Blood **86**(3): 977-982.
- Seligsohn, U. and S. Rososhansky (1984). "A Glanzmann's thrombasthenia cluster among Iraqi Jews in Israel." Thromb Haemost **52**(3): 230-231.
- Shattil, S. J. (1993). "Regulation of platelet anchorage and signaling by integrin alpha IIb beta 3." Thromb Haemost **70**(1): 224-228.
- Shattil, S. J. (1995). "Function and regulation of the beta 3 integrins in hemostasis and vascular biology." Thromb Haemost **74**(1): 149-155.
- Shattil, S. J., J. A. Hoxie, et al. (1985). "Changes in the platelet membrane glycoprotein IIb.IIIa complex during platelet activation." J Biol Chem **260**(20): 11107-11114.
- Sosnoski, D. M., B. S. Emanuel, et al. (1988). "Chromosomal localization of the genes for the vitronectin and fibronectin receptors alpha subunits and for platelet glycoproteins IIb and IIIa." J Clin Invest **81**(6): 1993-1998.
- Steficek, B. A., J. S. Thomas, et al. (1993). "A primary platelet disorder of consanguineous simmental cattle." Thromb Res **72**(2): 145-153.
- Sutherland, R. J., H. Cambridge, et al. (1989). "Functional and morphological studies on blood platelets in a thrombasthenic horse." Aust Vet J **66**(11): 366-370.

- Tanaka, S., T. Hayashi, et al. (2002). "A Leu55 to Pro substitution in the integrin α IIb is responsible for a case of Glanzmann's thrombasthenia." Br J Haematol **118**(3): 833-835.
- Tao, J., E. G. Arias-Salgado, et al. (2000). "A novel (288delC) mutation in exon 2 of GPIIb associated with type I Glanzmann's thrombasthenia." Br J Haematol **111**(1): 96-103.
- Thomas, J. S. (1996). "von Willebrand's disease in the dog and cat." Vet Clin North Am Small Anim Pract **26**(5): 1089-1110.
- Tomiyama, Y., H. Kashiwagi, et al. (1995). "Abnormal processing of the glycoprotein IIb transcript due to a nonsense mutation in exon 17 associated with Glanzmann's thrombasthenia." Thromb Haemost **73**(5): 756-762.
- Tozer, E. C., R. C. Liddington, et al. (1996). "Ligand binding to integrin α IIb β 3 is dependent on a MIDAS-like domain in the β 3 subunit." J Biol Chem **271**(36): 21978-21984.
- Vijapurkar, M., K. Ghosh, et al. (2009). "Novel mutations in GP IIb gene in Glanzmann's thrombasthenia from India." Platelets **20**(1): 35-40.
- Wagner, C. L., M. A. Mascelli, et al. (1996). "Analysis of GPIIb/IIIa receptor number by quantification of 7E3 binding to human platelets." Blood **88**(3): 907-914.
- Wencel-Drake, J. D., E. F. Plow, et al. (1986). "Localization of internal pools of membrane glycoproteins involved in platelet adhesive responses." Am J Pathol **124**(2): 324-334.
- Yamakuchi, H., M. Agaba, et al. (2000). "Chediak-Higashi syndrome mutation and genetic testing in Japanese black cattle (Wagyu)." Anim Genet **31**(1): 13-19.
- Yaron, A. and F. Naider (1993). "Proline-dependent structural and biological properties of peptides and proteins." Crit Rev Biochem Mol Biol **28**(1): 31-81.
- Zucker, M. B., J. H. Pert, et al. (1966). "Platelet function in a patient with thrombasthenia." Blood **28**(4): 524-534.

