



HAL
open science

Modèles murins en hémostasie

Cécile Denis, Caterina Casari, Stéphanie Roulet

► **To cite this version:**

Cécile Denis, Caterina Casari, Stéphanie Roulet. Modèles murins en hémostasie. *Hématologie*, 2023, 29 (6), pp.338-353. 10.1684/hma.2023.1827 . hal-04457009

HAL Id: hal-04457009

<https://hal.science/hal-04457009>

Submitted on 14 Feb 2024

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

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

Modèles murins en hémostase

Cécile V. Denis¹, Stéphanie Rouillet^{1,2}, Caterina Casari¹

1. Université Paris-Saclay, INSERM, Hémostase inflammation thrombose HITH
U1176, 94276, Le Kremlin-Bicêtre, France

2. Département d'Anesthésie Réanimation, Hôpital Paul Brousse, Assistance
Publique - Hôpitaux de Paris, Université Paris-Saclay, 94800, Villejuif, France

Correspondance :

Cécile Denis

INSERM Unité 1176

80 rue du Général Leclerc

94276 Le Kremlin-Bicêtre Cedex

Email : cecile.denis@inserm.fr

Titre en anglais : Murine models of hemostasis

Résumé

Depuis l'avènement des techniques de transgénèse, le modèle murin s'est imposé comme le modèle par excellence dans les laboratoires de recherche, permettant de modéliser différentes pathologies ou de mieux comprendre les fonctions de nombreuses protéines, dans un environnement génétique contrôlé. Le défi qui en a résulté a été de développer des méthodes permettant d'évaluer divers phénotypes dans un modèle de petite taille, tel que la souris. L'hémostase ne fait pas exception et des procédures adaptées à la mesure du saignement ont vu le jour. Certaines de ces procédures et en particulier les plus fréquemment utilisées seront détaillées dans cette revue. Si ces modèles technologiques se sont multipliés, c'est pour répondre à l'hétérogénéité phénotypique des souris transgéniques développées dans le domaine de la coagulation. Nous nous sommes attachées à présenter un exemple de cette hétérogénéité en nous focalisant sur les modèles murins de maladie de Willebrand, existants à ce jour. En effet, de très nombreux modèles de maladie de Willebrand sont actuellement disponibles, essayant au mieux de reproduire les aspects les plus variés de cette pathologie extrêmement polymorphe. Ces modèles seront discutés en faisant le point sur leur apport respectif soit dans l'amélioration de notre connaissance des mécanismes physiopathologiques, soit en tant que modèles pré-cliniques pour l'évaluation de nouvelles thérapies.

Mots clés: Modèle de saignement, Facteur Von Willebrand, Souris, Hémostase, Maladie de Willebrand

Abstract

Since the advent of transgenesis techniques, the mouse model has become the model par excellence in research laboratories, making it possible to model various pathologies or better understand the functions of numerous proteins, in a controlled genetic environment. The resulting challenge has been to develop methods for assessing various phenotypes in a small model such as the mouse. Hemostasis is no exception, and procedures adapted to the measurement of bleeding have emerged. Some of these procedures, and in particular the most frequently used, will be detailed in this review. These experimental models have proliferated in response to the phenotypic heterogeneity of transgenic mice developed in the field of coagulation. We have endeavored to present an example of this heterogeneity, focusing on the mouse models of Willebrand disease that exist today. Indeed, a large number of Willebrand disease models are currently available, attempting as best they can to reproduce the most varied aspects of this extremely polymorphic pathology. These models will be discussed, taking stock of their respective contributions either to improving our knowledge of pathophysiological mechanisms, or as pre-clinical models for the evaluation of new therapies.

Key words: Bleeding models, von Willebrand factor, Mouse, Hemostasis, von Willebrand disease

Les modèles animaux ont de tous temps été indispensables dans la recherche biomédicale, aidant les chercheurs à mieux comprendre les mécanismes biologiques qui gouvernent le développement et la santé d'organismes complexes, avec une pertinence directe pour l'être humain [1]. L'avènement des techniques de transgénèse dans les années 1970s [2] et la génération de la première souris exprimant un gène humain, en l'occurrence celui de l'hormone de croissance [3], a encore plus accentué l'utilité des modèles animaux, faisant même de la souris la star incontestée des laboratoires de recherche. Ce statut incontournable du modèle murin n'a pas toujours été aussi évident car la souris, outre sa petite taille qui constitue un handicap pour certaines expériences, présente aussi des différences physiopathologiques par rapport à l'homme. De fait, les animaux souvent utilisés étaient les rats, les cochons d'inde, les hamsters, les lapins, les cochons et bien entendu les primates pour tout ce qui concernait la modélisation des maladies humaines. En ce qui concerne les études de développement embryologique et de génétique, les modèles du poisson-zèbre, de la drosophile et du ver *C. elegans* restent à ce jour très utilisés. Malgré tout, la souris est le modèle actuellement le plus utilisé au monde. Outre la possibilité de manipuler leur génome, les souris présentent de gros avantages comme animal de laboratoire en raison de l'espace restreint qui est nécessaire à leur élevage, leur cycle de vie assez court (environ deux ans de durée de vie), la relative facilité de maintenance et la rapidité et efficacité de reproduction [4]. Du fait de la consanguinité de nombreuses souches murines, il est également possible de cibler précisément la fonction du gène visé dans un environnement génétique parfaitement contrôlé, sans être perturbé par les facteurs confondants. Tous ces aspects ont conduit au développement de souches de souris mutées pour des centaines de gènes différents (gènes délétés, mutés, humanisés, etc...) générant ainsi autant de modèles précieux et utiles, reproduisant les pathologies identifiées chez l'homme. Tous les domaines de la recherche ont fait appel et continuent à faire appel à de tels modèles et l'hémostase ne fait pas exception. La très grande majorité, pour ne pas dire l'intégralité des acteurs moléculaires connus pour être impliqués dans le processus hémostatique ont fait l'objet de ciblage dans divers modèles murins. Ceci implique autant les facteurs pro- ou anti-coagulants de la cascade de la coagulation que les protéines de la fibrinolyse, les protéines plaquettaires ou encore des protéines endothéliales. Les modèles murins dérivés du ciblage génétique de ces différentes protéines sont bien trop nombreux pour être tous cités ici mais il est intéressant de noter que beaucoup d'entre eux sont disponibles pour la communauté scientifique par l'intermédiaire du Jackson laboratory (<https://mice.jax.org/>) en tant que modèles prêts à être utilisés ou au stade de vecteurs de ciblage/cellules embryonnaires souches via le European Mouse Mutant Cell Repository (<https://www.eummc.info/>).

Nous avons choisi de centrer cette revue sur deux aspects. Nous aborderons d'abord les modèles qui, d'un point de vue technologique, sont disponibles pour évaluer le saignement chez les souris. Puis nous décrirons les modèles murins génétiquement modifiés qui ont été développés pour reproduire la maladie hémorragique constitutionnelle la plus fréquente, à savoir la maladie de Willebrand (MW).

Modèles de saignement

Avant de pouvoir étudier le phénotype hémostatique des souris, il est important de bien cerner les différentes méthodes qui permettent de caractériser au mieux cet aspect. Il existe beaucoup de méthodes différentes, certaines propres à un seul laboratoire ou encore certaines adaptées à une question particulière comme c'est le cas des modèles de saignement articulaires pour provoquer des hémarthroses chez les souris hémophiles dépourvues de facteur VIII (FVIII) ou en facteur IX de la coagulation [5].

Certains modèles de saignement sont plus largement utilisés et sont répertoriés en Table 1 et Figure 1. Les trois modèles les plus fréquents sont indiqués en gris dans le tableau et sont détaillés ci-dessous.

Modèle du "tail clip"

De loin le plus utilisé de par sa simplicité, ce modèle consiste à couper l'extrémité de la queue de la souris avec un scalpel ou une lame de rasoir puis à immerger la queue dans du NaCl 0,9% à 37°C ou à absorber le sang sur un papier filtre [6]. Les paramètres mesurés sont: temps nécessaire à l'arrêt du saignement, quantité de sang perdu, nombre de re-saignements...Ce modèle qui implique la transection de tous les vaisseaux de la queue (veines et artères) ne nécessite aucun équipement spécial ni compétences chirurgicales, ce qui explique sa popularité. C'est un modèle que l'on peut qualifier de sévérité moyenne. Bien que ce modèle soit très utilisé, il manque cruellement de standardisation ce qui peut compliquer les comparaisons entre différentes études publiées [7-9]. En effet, la longueur du bout de queue amputée peut varier de 1 à 5 mm selon les laboratoires ou même se faire à diamètre constant plutôt qu'à une longueur pré-déterminée. Parmi les paramètres qui peuvent également varier considérablement d'un protocole à un autre figurent aussi le temps d'observation (entre 10 et 40 min), l'utilisation ou non d'un tapis chauffant et la qualité de la lame utilisée pour effectuer la coupure. Une lame émoussée ou un mouvement de scie, plutôt qu'un effet "guillotine", résultera davantage en un écrasement des vaisseaux plutôt qu'en une transection nette. Dans notre laboratoire, les lames de rasoir sont changées systématiquement après deux coupures. Il est à noter que ces paramètres

sont très rarement décrits dans les articles. L'anesthésiant utilisé est également une source importante de variabilité avec par exemple des saignements plus importants lorsque les souris sont anesthésiées par injection de kétamine/xylazine par rapport à une anesthésie gazeuse à l'isoflurane (observations personnelles). Malgré toutes ces limites, ce modèle reste tout à fait pertinent car il permet de détecter facilement des défauts de coagulation ou de fonctions plaquettaires.

Modèle de transection de la veine latérale de la queue ou TVT

Dans un souci de pallier les problèmes de variabilité du modèle du "tail clip", un modèle plus standardisé a été mis au point, modèle qui implique une coupure très précise d'une des deux veines latérales de la queue des souris à une profondeur de 0,7 mm pour un diamètre de queue de 2,3 mm [10, 11]. Le TVT (Tail Vein Transection) requiert l'acquisition de deux petites pièces usinées afin de mesurer précisément le diamètre de la queue puis la profondeur de 0,7 mm, le rendant un peu moins accessible que le tail clip. Le paramètre mesuré est la quantité de sang perdu sur une période donnée (30-45 ou 60 min). C'est un modèle que l'on peut qualifier de sévérité légère à modérée selon qu'on y incorpore ou non des étapes de retrait du caillot formé (challenge hémostatique) lorsque la souris ne saigne plus après 15, 30 ou 45 min. L'avantage de ce modèle qui se déroule sous anesthésie gazeuse à l'isoflurane et sur souris maintenues à 37°C pendant toute la durée de l'expérience, est sa reproductibilité assez importante ce qui permet de réduire le nombre de souris utilisées, en accord avec la règle des 3 "R" qui régit l'expérimentation animale [12, 13]. Son utilité s'est avérée particulièrement intéressante afin de tester des agents pharmacologiques visant à corriger le saignement chez des souris (ou des rats) avec défaut de coagulation [14, 15]. Il est également à noter que ce modèle peut être adapté pour effectuer une coupure similaire mais au niveau de l'artère ventrale de la queue, représentant alors un modèle de transection artérielle ou TAT (Tail Artery Transection).

Modèle de saignement de la veine saphène

Ce modèle, exclusivement veineux, a été développé originalement pour tester l'effet de doses faibles de FVIII dans des souris hémophiles [16]. Il se différencie assez nettement des deux modèles précédents puisque ce ne sont pas les vaisseaux de la queue qui sont visés et qu'il nécessite donc un minimum de compétences chirurgicales. En effet, la veine saphène de la jambe de la souris doit être exposée avant de réaliser une piqûre avec la pointe d'une aiguille de 23G au niveau de ce vaisseau. Le premier caillot formé est retiré puis une pointe fine de ciseau est introduite dans la perforation pour l'agrandir sur 1 mm. A partir de cet instant, à

chaque fois qu'un caillot se forme, il est délicatement retiré (compresse ou autre matériel), conduisant à un nouvel épisode de saignement, ceci pendant une période de 30 minutes. Le paramètre principal qui est mesuré est le nombre de caillots formés pendant cette durée d'observation. Des paramètres secondaires peuvent aussi être objectivés, tels que la durée totale de saignement ou le temps moyen de saignement entre chaque caillot. Contrairement aux deux modèles précédents, le saignement a lieu à l'air et non en milieu liquide et c'est la capacité des souris à reformer des caillots après chaque challenge qui est mesurée. Dans notre expérience, ce modèle est plus sévère que les deux précédents. Il s'est avéré particulièrement utile pour tester l'efficacité du ciblage des anticoagulants naturels ou encore l'effet d'anticoagulants oraux puisqu'il n'est pas nécessaire d'effectuer un surdosage comme c'est le cas pour les autres modèles [17, 18].

Comme précédemment mentionné, d'autres modèles existent mais sont généralement utilisés de manière plus anecdotique. Un des points critiques des modèles de saignement chez la souris est de ne pas se laisser tromper par leur apparente facilité et ceci particulièrement pour le modèle du tail clip qui est simple à réaliser mais complexe à maîtriser. De nombreux paramètres peuvent influencer les résultats, que ce soit l'anesthésiant, la température de la pièce et/ou des animaux, l'état des lames de rasoirs, etc....En absence d'une standardisation universelle, il est au moins recommandé de standardiser la technique dans son propre laboratoire, au risque de se retrouver avec des résultats difficiles à interpréter. Chaque modèle a ses avantages et inconvénients et le choix doit s'effectuer en fonction de la question posée. Par exemple, les modèles de saignement veineux et artériels sont affectés de manière assez similaire par les défauts de la coagulation tandis que les défauts plaquettaires seront plus faciles à mettre en évidence dans des modèles qui incorporent une blessure artérielle [19]. Le test de plusieurs modèles est évidemment à recommander.

Modèles murins de maladie de Willebrand (MW)

La MW représente non seulement la maladie hémorragique constitutionnelle la plus fréquente mais aussi un challenge intéressant pour la recherche. En effet, de par son hétérogénéité (nombreux type et sous-types, cf. Table 2), elle offre un vaste terrain de jeu en termes de mécanismes physiopathologiques à déchiffrer. La MW est causée par des défauts quantitatifs ou qualitatifs en facteur von Willebrand (FW), une protéine de l'hémostase primaire dont le rôle principal est de promouvoir l'adhésion et l'agrégation plaquettaire lors d'une brèche vasculaire

(Figure 2) [20]. Le FW est également impliqué dans la coagulation puisqu'il sert de protéine chaperone au FVIII, ou facteur anti-hémophilique A, en le protégeant d'une clairance accélérée. Protéine complexe de par sa taille, sa multimérisation ou encore la multiplicité de ses ligands, le FW a vu l'étendue de ses fonctions s'allonger assez considérablement grâce aux modèles murins qui ont été développés au fil des ans (Table 3). Bien qu'il existe quelques modèles spontanés [21], seuls les modèles génétiquement modifiés seront décrits ici.

Modèle murin de MW de type 3 ou type sévère

La MW de type sévère est caractérisée par une absence quasi totale en FW et une forte réduction en facteur VIII de la coagulation. Les souris déficientes en FW, générées dans les années 1990s ont représenté le premier modèle murin génétiquement modifié de MW [22]. Ces souris reproduisent assez fidèlement le phénotype clinique observé chez les patients et ont été très largement étudiées dans de nombreux laboratoires du monde entier. Ces souris saignent abondamment dans les trois modèles de saignement décrits précédemment. Leur utilité en tant que modèle pré-clinique visant à tester de nouveaux traitements de la MW s'est par contre avérée limitée en raison d'une barrière d'espèce importante. En effet, tous les traitements potentiels à base de FW humain sont inefficaces chez cette souris puisque le FW humain n'interagit pas avec les plaquettes murines et en particulier avec son récepteur plaquettaire, la glycoprotéine (GP) Ib α murine [23]. Par contre, ces souris ont pu être utilisées pour tester un traitement alternatif à base de plaquettes synthétiques [24] ou encore pour des études préliminaires de thérapie génique de la MW [25, 26].

Les souris déficientes en FW ont été principalement utilisées pour mettre en évidence le rôle du FW dans divers processus physiopathologiques au-delà de l'hémostase tels que cancer, l'athérosclérose, l'inflammation, l'angiogenèse ou encore la prolifération néo-intimale [27-30]. Un autre aspect de la biologie du FW qui a pu être déchiffré au moins partiellement grâce aux souris déficientes en FW concerne les mécanismes de clairance de la protéine avec l'identification des domaines impliqués ainsi qu'un certain nombre de récepteurs cellulaires [31, 32].

Modèles transitoires par injection hydrodynamique

La disponibilité des souris déficientes en FW a ouvert la voie à leur utilisation en tant que modèle dans lequel introduire rapidement différentes mutations désirées. En effet, en introduisant dans ces souris un plasmide codant pour le FW murin et comprenant n'importe quelle variation génétique, il est possible de faire exprimer la protéine correspondante par les

hépatocytes de la souris. Le plasmide en question doit être administré par injection hydrodynamique, une technique visant à injecter par voie intraveineuse un très large volume correspondant à 10% du poids de la souris (*i.e.* 2 ml pour une souris de 20 g). Si l'injection est faite rapidement, il se produit une hyperpression au niveau de l'oreillette droite, entraînant un reflux dans les veines sus-hépatiques, permettant un contact de la solution avec le parenchyme hépatique, résultant en une transfection *in vivo* des hépatocytes [33]. Cette approche a été utilisée avec succès afin de faire produire aux souris déficientes en FW divers FW mutés, permettant ainsi d'étudier les relations structure-fonctions du FW *in vivo*, et d'identifier les résidus/régions les plus importantes dans sa fonction hémostatique [34-36].

Ce modèle offre l'avantage de tester rapidement diverses mutations mais il a aussi un certain nombre de limites puisque l'expression de la protéine désirée est transitoire (environ 2 semaines) et l'expression est limitée aux hépatocytes. Dans le cas du FW qui est normalement produit par les cellules endothéliales et les mégacaryocytes, cela résulte en une expression supraphysiologique (>100%) restreinte au compartiment plasmatique [37].

Malgré ces limites, ce modèle a été utilisé pour reproduire différents types/sous-types de MW. Le type 1, caractérisée par un défaut quantitatif partiel en FW, a été modélisé par l'expression indépendante de deux mutations communément retrouvées dans le type 1 de MW, (p.R1205H) et (p.Y1584C) [38]. Le sous-type 2A de MW, caractérisé par une augmentation de dégradation du FW par sa protéase ADAMTS13 et résultant en une perte d'interaction avec les plaquettes a quant à lui été modélisé par l'expression de la mutation (p.R1597W) [39]. Et enfin, le sous-type 2N de la MW caractérisé par une perte d'interaction entre le FW et le FVIII a été modélisé par l'expression indépendante de trois mutations (p.R763A), (p.R854Q) et (p.R816W) [40]. L'injection hydrodynamique permet également de reproduire l'effet dominant négatif propre aux variants du FW, surtout ceux qui affectent les processus de dimérisation ou de multimérisation, comme nous l'avons démontré grâce à l'expression d'un FW portant une large délétion respectant le cadre de lecture (p.P1127_C1948delinsR) [41]. Dans chacun de ces cas, le phénotype clinique observé chez les patients a pu être reproduit et ces modèles ont permis d'élucider les mécanismes par lesquels ces mutations conduisaient à leur effet pathogène, soulignant l'utilité de cette technique peu coûteuse par rapport à la création d'une souris transgénique. En ce qui concerne le dernier cas cité (l'expression du FW avec délétion), le modèle d'injection hydrodynamique a aussi été utilisé pour tester des approches correctives par ARN interférent ou par ciblage génétique, servant de première preuve de concept à une prise en charge personnalisée de la MW [41].

Modèles murins de MW 2B

La MW 2B représente un sous-type unique de MW car c'est le seul sous-type qui peut être associé à une thrombopénie [42]. Elle résulte de mutations gain de fonction sur la séquence du FW, mutations qui augmentent l'affinité du FW pour les plaquettes [43]. Selon les mutations, le phénotype clinique de la maladie est plus ou moins sévère. Une des mutations causales de la MW de type 2B, (p.V1316M) a ainsi été choisie pour créer un modèle de souris avec MW de type 2B afin de mieux en comprendre les mécanismes physiopathologiques sous-jacents. Cette mutation a été exprimée d'abord par injection hydrodynamique puis par une approche de recombinaison homologue classique afin de l'introduire dans la séquence du FW de souris [44-46]. Ces différents modèles ont permis de mettre en évidence qu'au-delà de la thrombopénie, une thrombopathie était également présente et pouvait contribuer au phénotype hémorragique [47, 48]. Les mécanismes expliquant la thrombopénie ont également pu être étudiés grâce à ces modèles murins, démontrant à la fois une cause périphérique de clairance des plaquettes et une cause centrale avec un défaut de mégacaryocytopoïèse dû à une activation constitutive de la voie RhoA/LIMK/cofilin et une désorganisation de l'actine [49, 50]. Récemment, afin de s'affranchir des problèmes de barrière d'espèce, la même mutation a été introduite chez une souris partiellement humanisée pour le FW et humanisée pour le récepteur plaquettaire du FW, la GPIb α [51]. Ce nouveau modèle a confirmé les résultats de mégacaryocytopoïèse aberrante mais a surtout permis de tester l'effet d'un anticorps monoclonal bloquant l'interaction FW-GPIb α comme une approche thérapeutique possible afin de restaurer la mégacaryocytopoïèse et améliorer le compte plaquettaire [51].

Modèles murins de MW 2M

La MW de sous-type 2M est caractérisée par un défaut d'interaction, soit avec la GPIb α , soit avec le collagène sous-endothélial dont il existe plusieurs types, les collagènes I, III, IV et VI. Afin d'étudier l'importance de l'interaction entre le FW et le collagène IV, une souris transgénique exprimant la mutation la plus fréquemment identifiée chez l'homme et induisant une perte de cette interaction (p.R1399H) a été générée [52]. Les souris exprimant ce variant ont montré une augmentation modérée du saignement, suggérant que la présence du variant a le potentiel d'exacerber une symptomatologie hémorragique [52].

Un second modèle murin transgénique exprimant une mutation de type 2M, la mutation (p.K1362A) connue pour fortement affecter la liaison entre le FW et la GPIb α , a aussi été généré. Contrairement à beaucoup d'autres mutations citées, celle-ci n'a pas été identifiée chez

un patient avec MW mais par des études de mutagenèse dans des modèles cellulaires [53]. Cette mutation avait déjà été étudiée par injection hydrodynamique et avait montré un profil hémorragique, soulignant bien l'importance de l'interaction FW-GPIb α [54]. La souris transgénique a révélé un phénotype très surprenant avec une absence totale d'expression de la protéine mutée [55], ce qui n'avait pas été le cas ni dans les expériences *in vitro* où la protéine recombinante mutée avait été produite normalement par les cellules HEK (human embryonic kidney), ni après injection hydrodynamique où la protéine avait aussi été produite normalement par les hépatocytes. Aucune réelle explication à ce phénomène inattendu n'a pu être proposée [55].

Modèle murin de MW 2N

Récemment, une souris transgénique exprimant un FW muté en position 785 (p.G785E) a été créée par la technique des ciseaux moléculaires CRISPR/Cas9 [56]. Cette mutation est connue pour abolir l'interaction entre le FW et le FVIII, conduisant au sous-type 2N de la MW chez l'homme. Les souris ainsi générées expriment un taux normal de FW mais des taux très réduits en FVIII, reproduisant ainsi le phénotype clinique des patients. Le phénotype hémorragique de ces souris MW 2N a été étudié par l'intermédiaire de plusieurs modèles, le tail clip, le TVT ou le TAT. De manière intéressante, les souris MW 2N n'ont pas saigné dans les modèles de TVT ou de TAT mais ont saigné de manière importante après tail clip [56]. Cette étude souligne l'importance d'utiliser plusieurs modèles de saignement pour pouvoir conclure sur le phénotype hémorragique d'un modèle murin. Ce modèle de souris MW 2N peut en tous cas s'avérer extrêmement utile pour étudier les propriétés biologiques du complexe FW/FVIII en hémostase aussi bien que dans d'autres domaines.

Modèles murins humanisés pour le FW

Du fait de la barrière d'espèce entre FW et GPIb α plaquettaire précédemment mentionnée, l'utilité des modèles murins de MW a longtemps été limitée à des problématiques de recherche sans pouvoir prendre avantage de ces modèles pour une visée plus thérapeutique. Au fil des années, des modèles partiellement humanisés ont été développés afin de pallier à cette limite. La problématique rencontrée est qu'il faut humaniser à la fois le FW mais aussi la GPIb α . Selon la question posée, c'est ainsi que divers modèles ont vu le jour.

1- Modèle avec simple mutation humanisée (p.R1326H)

Dans cette étude, les auteurs avaient pour but de tester l'effet *in vivo* d'agents anti-plaquettaires mais ceux-ci étant dirigés contre les plaquettes humaines, il était nécessaire de développer un modèle permettant d'infuser des plaquettes humaines dans une souris et que ces plaquettes remplissent normalement leur fonction hémostatique. Grâce à des études de modélisation, ils ont pu identifier un unique résidu sur le FW de souris qui pouvait être remplacé par son équivalent humain et ainsi court-circuiter la barrière d'espèce. En substituant l'arginine en position 1326 du FW murin par une histidine normalement présente dans le FW humain à cette même position, ils ont obtenu une souris transgénique dont le FW n'interagissait plus avec les plaquettes de souris mais au contraire reconnaissait désormais les plaquettes humaines [57]. L'effet anti-thrombotique de plusieurs agents anti-plaquettaires a ainsi pu être étudié dans ce modèle [58].

2- Modèle humanisé avec domaine A1 murin

La problématique inverse, c'est-à-dire le désir de tester des approches antithrombotiques ciblées sur le FW avec des outils reconnaissant spécifiquement la protéine humaine a poussé vers le développement de modèles partiellement humanisés dans lesquels du FW chimérique humain/murin a été exprimé. Dans une première étude parue en 2012, du FW humain mais dont le domaine A1 (domaine contenant le site de liaison à la GPIIb α) a été conservé d'origine murine, a été exprimé dans des souris déficientes en FW par injection hydrodynamique. Grâce à ce modèle, l'effet d'anticorps monoclonaux ciblant les interactions entre le FW et le collagène ou entre le FW et la GPIIbIIIa plaquettaire a pu être évalué dans des modèles de thrombose *in vivo* [59]. Par contre, le fait que le domaine A1 soit d'origine murine représente un handicap certain pour tester des agents anti-FW humain bloquant l'interaction FW-GPIIb α .

3- Modèles avec exon 28 humanisé

En miroir avec le modèle précédent, une souris transgénique a été créée en 2018, exprimant un FW murin mais dont l'exon 28, codant pour les domaines A1 et A2 du FW est d'origine humaine. En humanisant également la GPIIb α dans ce modèle, les auteurs ont ainsi généré une souris totalement humanisée en termes d'interaction FW-GPIIb α [60]. Toutes les combinaisons humaines/murines de cette interaction sont également décrites dans cette publication, permettant aux auteurs de caractériser de manière fine les mécanismes de régulation de cette interaction cruciale lors de l'hémostase primaire. Ce modèle offre surtout la possibilité de tester

l'inhibition pharmacologique de cette interaction en étant au plus près de la physiopathologie humaine.

Ce modèle représente aussi une plateforme permettant d'introduire des mutations identifiées au niveau de l'exon 28 du FW chez des patients avec MW, en respectant le contexte "humain". C'est d'ailleurs ce qui a été fait pour la mutation provoquant une MW de type 2B décrite plus haut [51]. Un second exemple de mutation testée dans ce modèle est le variant génétique (p.D1724H), qui est associé à une diminution de la fonction du FW *in vitro* sans réelle conséquence hémorragique chez l'homme. Afin de mieux comprendre le rôle exact de ce résidu, les auteurs ont introduit ce variant chez les souris humanisées pour l'exon 28 et n'ont mis en évidence aucun phénotype hémorragique, confirmant que ce variant est en fait non pathogène [61].

4- Modèles totalement humanisés

Tous les modèles humanisés précédemment cités le sont uniquement partiellement. Il s'agit en fait de FW chimériques humains/murins. Notre laboratoire a donc souhaité développer de nouveaux modèles complètement humanisés en faisant exprimer les ADNc du FW humain et de la GPIIb α humaine sous le contrôle respectif de leurs promoteurs endogènes murins, tout en invalidant les gènes murins. Ces deux souris individuelles ayant été générées, elles ont ensuite été croisées ensemble. Ce modèle, non encore publié, s'est révélé assez surprenant car l'expression du FW a plafonné autour de 12-15% alors qu'aucune mutation n'avait été introduite dans la séquence et qu'une expression de 100% était attendue. Il est possible que l'absence de séquences régulatrices potentiellement présentes au niveau des introns ait joué un rôle dans cette expression suboptimale. Finalement nous avons donc généré un modèle de MW de type 1 avec une multimérisation normale. Ces souris ne saignent pas du tout dans un modèle de TVT mais expriment un phénotype légèrement hémorragique dans les modèles de tail clip et de la veine saphène, phénotype qui est corrigé par l'administration de FW recombinant humain. Grâce à ce modèle, nous avons désormais la capacité de tester diverses approches thérapeutiques visant à mieux prendre en charge les patients avec MW.

Conclusion

Les modèles techniques permettant d'évaluer l'hémostase et les modèles de souris transgéniques reproduisant des pathologies hémorragiques sont absolument indissociables les uns des autres. Les premiers ont évolué et se sont raffinés au fur et à mesure que les seconds ont été développés.

Selon le lit vasculaire et l'expression locale des différentes protéines de la coagulation, les résultats peuvent s'avérer très différents et être plus ou moins sensibles à l'effet recherché. Pour certains modèles murins tels que les modèles d'hémophilie A ou B, un phénotype hémorragique est observé dans quasiment tous les cas de figure. Pour la MW, en fonction des types/sous-types, un nouveau challenge se présente à chaque fois sur la meilleure manière de mettre en évidence le phénotype hémorragique observé chez les patients. Les modèles de MW se sont multipliés depuis la souris déficiente en FW, publiée il y a 25 ans, mais c'est pour mieux modéliser la complexité de cette pathologie. Même dans l'état actuel des choses avec ces multiples modèles, cela reste complexe de tirer des conclusions définitives. En effet, pour ne citer que l'exemple de la MW 2B, les observations faites chez la souris portant la mutation (p.V1316M) ne sont pas applicables à toutes les mutations conduisant à une MW 2B. Auparavant, des protéines recombinantes étaient produites de manière à examiner l'effet de chaque mutation. Il n'est évidemment pas possible de générer une souris transgénique pour chaque variant génétique du FW et c'est pourquoi les modèles par injection hydrodynamiques, aussi imparfaits soient-ils, offrent de gros avantages dans le cadre de la MW. Dans leur ensemble, les modèles murins de MW ont énormément contribué à élargir notre connaissance sur le FW et sur les mécanismes physiopathologiques de la MW.

Références

1. Mukherjee P, Roy S, Ghosh D, Nandi SK. Role of animal models in biomedical research: a review. *Lab Anim Res* 2022; 38: 18.
2. Jaenisch R, Mintz B. Simian virus 40 DNA sequences in DNA of healthy adult mice derived from preimplantation blastocysts injected with viral DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1974; 71: 1250-4.
3. Palmiter RD, Brinster RL, Hammer RE, Trumbauer ME, Rosenfeld MG, Birnberg NC, Evans RM. Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes. *Nature* 1982; 300: 611-5.
4. Bryda EC. The Mighty Mouse: the impact of rodents on advances in biomedical research. *Mo Med* 2013; 110: 207-11.
5. Valentino LA, Hakobyan N, Kazarian T, Jabbar KJ, Jabbar AA. Experimental haemophilic synovitis: rationale and development of a murine model of human factor VIII deficiency. *Haemophilia* 2004; 10: 280-7.
6. Mohammed BM, Monroe DM, Gailani D. Mouse models of hemostasis. *Platelets* 2020; 31: 417-22.
7. Greene TK, Schiviz A, Hoellriegl W, Poncz M, Muchitsch EM, Animal Models Subcommittee of the S, Standardization Committee Of The I. Towards a standardization of the murine tail bleeding model. *J Thromb Haemost* 2010; 8: 2820-2.
8. Liu Y, Jennings NL, Dart AM, Du XJ. Standardizing a simpler, more sensitive and accurate tail bleeding assay in mice. *World J Exp Med* 2012; 2: 30-6.
9. Schiviz A, Magirr D, Leidenmuhler P, Schuster M, Muchitsch EM, Hollriegl W, Subcommittee on Animal Models of the S, Standardization Committee of the International Society on T, Hemostasis. Influence of genetic background on bleeding phenotype in the tail-tip bleeding model and recommendations for standardization: communication from the SSC of the ISTH. *J Thromb Haemost* 2014; 12: 1940-2.
10. Johansen PB, Tranholm M, Haaning J, Knudsen T. Development of a tail vein transection bleeding model in fully anaesthetized haemophilia A mice - characterization of two novel FVIII molecules. *Haemophilia* 2016; 22: 625-31.
11. Carol Illa A, Baumgarten S, Danielsen D, Larsen K, Elm T, Johansen PB, Knudsen T, Lauritzen B, Tranholm M, Ley CD. Tail Vein Transection Bleeding Model in Fully Anesthetized Hemophilia A Mice. *J Vis Exp* 2021; (175).

12. Hubrecht RC, Carter E. The 3Rs and Humane Experimental Technique: Implementing Change. *Animals (Basel)* 2019; 9: 754.
13. Russel WMS, Burch RL. *The Principles of Humane Experimental Technique*. Methuen & Co Ltd; London, UK 1959.
14. Barbon E, Ayme G, Mohamadi A, Ottavi JF, Kawecki C, Casari C, Verhenne S, Marmier S, van Wittenberghe L, Charles S, Collaud F, Denis CV, Christophe OD, Mingozzi F, Lenting PJ. Single-domain antibodies targeting antithrombin reduce bleeding in hemophilic mice with or without inhibitors. *EMBO Mol Med* 2020; 12: e11298.
15. Stagaard R, Ovlisen GO, Klaebel JH, Danielsen D, Lund A, Elm T, Ley CD. In vivo effect of rFVIII and rFVIIa in hemophilia A rats evaluated by the Tail Vein Transection Bleeding Model. *J Thromb Haemost* 2023; 21: 1189-99.
16. Pastoft AE, Lykkesfeldt J, Ezban M, Tranholm M, Whinna HC, Lauritzen B. A sensitive venous bleeding model in haemophilia A mice: effects of two recombinant FVIII products (N8 and Advate((R))). *Haemophilia* 2012; 18: 782-8.
17. Monroe DM, Hoffman M. A mouse bleeding model to study oral anticoagulants. *Thromb Res* 2014; 133 Suppl 1: S6-8.
18. Sehgal A, Barros S, Ivanciu L, Cooley B, Qin J, Racie T, Hettinger J, Carioto M, Jiang Y, Brodsky J, Prabhala H, Zhang X, Attarwala H, Hutabarat R, Foster D, Milstein S, Charisse K, Kuchimanchi S, Maier MA, Nechev L, Kandasamy P, Kel'in AV, Nair JK, Rajeev KG, Manoharan M, Meyers R, Sorensen B, Simon AR, Dargaud Y, Negrier C, Camire RM, Akinc A. An RNAi therapeutic targeting antithrombin to rebalance the coagulation system and promote hemostasis in hemophilia. *Nat Med* 2015; 21: 492-7.
19. Vaezzadeh N, Ni R, Kim PY, Weitz JI, Gross PL. Comparison of the effect of coagulation and platelet function impairments on various mouse bleeding models. *Thromb Haemost* 2014; 112: 412-8.
20. Sadler JE. Biochemistry and genetics of von Willebrand factor. *Annu Rev Biochem* 1998; 67: 395-424.
21. Pendu R, Christophe OD, Denis CV. Mouse models of von Willebrand disease. *J Thromb Haemost* 2009; 7 Suppl 1: 61-4.
22. Denis C, Methia N, Frenette PS, Rayburn H, Ullman-Cullere M, Hynes RO, Wagner DD. A mouse model of severe von Willebrand disease: defects in hemostasis and thrombosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 9524-9.
23. Ware J, Russell S, Ruggeri ZM. Cloning of the murine platelet glycoprotein Ibalpha gene highlighting species-specific platelet adhesion. *Blood Cells Mol Dis* 1997; 23: 292-301.

24. Rouillet S, Luc N, Rayes J, Solarz J, Disharoon D, Ditto A, Gahagan E, Pawlowski C, Sefiane T, Adam F, Casari C, Christophe OD, Bruckman M, Lenting PJ, Sen Gupta A, Denis CV. Efficacy of platelet-inspired hemostatic nanoparticles on bleeding in von Willebrand disease murine models. *Blood* 2023; 141: 2891-900.
25. Barbon E, Kawecki C, Marmier S, Sakkal A, Collaud F, Charles S, Ronzitti G, Casari C, Christophe OD, Denis CV, Lenting PJ, Mingozzi F. Development of a dual hybrid AAV vector for endothelial-targeted expression of von Willebrand factor. *Gene Ther* 2023; 30: 245-54.
26. Portier I, Vanhoorelbeke K, Verhenne S, Pareyn I, Vandeputte N, Deckmyn H, Goldenberg DS, Samal HB, Singh M, Ivics Z, Izsvak Z, De Meyer SF. High and long-term von Willebrand factor expression after Sleeping Beauty transposon-mediated gene therapy in a mouse model of severe von Willebrand disease. *J Thromb Haemost* 2018; 16: 592-604.
27. Kawecki C, Lenting PJ, Denis CV. von Willebrand factor and inflammation. *J Thromb Haemost* 2017; 15: 1285-94.
28. Lagrange J, Worou ME, Michel JB, Raoul A, Didelot M, Muczynski V, Legendre P, Plenat F, Gauchotte G, Lourenco-Rodrigues MD, Christophe OD, Lenting PJ, Lacolley P, Denis CV, Regnault V. The VWF/LRP4/alphaVbeta3-axis represents a novel pathway regulating proliferation of human vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc Res* 2022; 118: 622-37.
29. Lenting PJ, Casari C, Christophe OD, Denis CV. von Willebrand factor: the old, the new and the unknown. *J Thromb Haemost* 2012; 10: 2428-37.
30. Mojzisch A, Brehm MA. The Manifold Cellular Functions of von Willebrand Factor. *Cells* 2021; 10: 2351.
31. Denis CV, Christophe OD, Oortwijn BD, Lenting PJ. Clearance of von Willebrand factor. *Thromb Haemost* 2008; 99: 271-8.
32. O'Sullivan JM, Ward S, Lavin M, O'Donnell JS. von Willebrand factor clearance - biological mechanisms and clinical significance. *Br J Haematol* 2018; 183: 185-95.
33. Suda T, Liu D. Hydrodynamic gene delivery: its principles and applications. *Mol Ther* 2007; 15: 2063-9.
34. Badirou I, Kurdi M, Legendre P, Rayes J, Bryckaert M, Casari C, Lenting PJ, Christophe OD, Denis CV. In vivo analysis of the role of O-glycosylations of von Willebrand factor. *PLoS One* 2012; 7: e37508.
35. Denis CV, Marx I, Badirou I, Pendu R, Christophe O. Mouse models to study von Willebrand factor structure-function relationships in vivo. *Hamostaseologie* 2009; 29: 17-20.

36. Marx I, Christophe OD, Lenting PJ, Rupin A, Vallez MO, Verbeuren TJ, Denis CV. Altered thrombus formation in von Willebrand factor-deficient mice expressing von Willebrand factor variants with defective binding to collagen or GPIIb/IIIa. *Blood* 2008; 112: 603-9.
37. Casari C, Lenting PJ, Christophe OD, Denis CV. Von Willebrand Factor Abnormalities Studied in the Mouse Model: What We Learned about VWF Functions. *Mediterr J Hematol Infect Dis* 2013; 5: e2013047.
38. Pruss CM, Golder M, Bryant A, Hegadorn CA, Burnett E, Lavery K, Sponagle K, Dhala A, Notley C, Haberichter S, Lillicrap D. Pathologic mechanisms of type 1 VWD mutations R1205H and Y1584C through in vitro and in vivo mouse models. *Blood* 2011; 117: 4358-66.
39. Pruss CM, Golder M, Bryant A, Hegadorn C, Haberichter S, Lillicrap D. Use of a mouse model to elucidate the phenotypic effects of the von Willebrand factor cleavage mutants, Y1605A/M1606A and R1597W. *J Thromb Haemost* 2012; 10: 940-50.
40. Swystun LL, Georgescu I, Mewburn J, Deforest M, Nesbitt K, Hebert K, Dwyer C, Brown C, Notley C, Lillicrap D. Abnormal von Willebrand factor secretion, factor VIII stabilization and thrombus dynamics in type 2N von Willebrand disease mice. *J Thromb Haemost* 2017; 15: 1607-19.
41. Campioni M, Legendre P, Loubiere C, Lunghi B, Pinotti M, Christophe OD, Lenting PJ, Denis CV, Bernardi F, Casari C. In vivo modulation of a dominant-negative variant in mouse models of von Willebrand disease type 2A. *J Thromb Haemost* 2021; 19: 139-46.
42. Federici AB, Canciani MT. Clinical and laboratory versus molecular markers for a correct classification of von Willebrand disease. *Haematologica* 2009; 94: 610-5.
43. Ruggeri ZM, Pareti FI, Mannucci PM, Ciavarella N, Zimmerman TS. Heightened interaction between platelets and factor VIII/von Willebrand factor in a new subtype of von Willebrand's disease. *N Engl J Med* 1980; 302: 1047-51.
44. Adam F, Casari C, Prevost N, Kauskot A, Loubiere C, Legendre P, Reperant C, Baruch D, Rosa JP, Bryckaert M, de Groot PG, Christophe OD, Lenting PJ, Denis CV. A genetically-engineered von Willebrand disease type 2B mouse model displays defects in hemostasis and inflammation. *Sci Rep* 2016; 6: 26306.
45. Golder M, Pruss CM, Hegadorn C, Mewburn J, Lavery K, Sponagle K, Lillicrap D. Mutation-specific hemostatic variability in mice expressing common type 2B von Willebrand disease substitutions. *Blood* 2010; 115: 4862-9.
46. Rayes J, Hollestelle MJ, Legendre P, Marx I, de Groot PG, Christophe OD, Lenting PJ, Denis CV. Mutation and ADAMTS13-dependent modulation of disease severity in a mouse model for von Willebrand disease type 2B. *Blood* 2010; 115: 4870-7.

47. Casari C, Berrou E, Lebret M, Adam F, Kauskot A, Bobe R, Desconclois C, Fressinaud E, Christophe OD, Lenting PJ, Rosa JP, Denis CV, Bryckaert M. von Willebrand factor mutation promotes thrombocytopathy by inhibiting integrin α IIb β 3. *J Clin Invest* 2013; 123: 5071-81.
48. Casari C, Paul DS, Susen S, Lavenu-Bombled C, Harroche A, Piatt R, Poe KO, Lee RH, Bryckaert M, Christophe OD, Lenting PJ, Denis CV, Bergmeier W. Protein kinase C signaling dysfunction in von Willebrand disease (p.V1316M) type 2B platelets. *Blood Adv* 2018; 2: 1417-28.
49. Casari C, Du V, Wu YP, Kauskot A, de Groot PG, Christophe OD, Denis CV, de Laat B, Lenting PJ. Accelerated uptake of VWF/platelet complexes in macrophages contributes to VWD type 2B-associated thrombocytopenia. *Blood* 2013; 122: 2893-902.
50. Kauskot A, Poirault-Chassac S, Adam F, Muczynski V, Ayme G, Casari C, Bordet JC, Soukaseum C, Rothschild C, Proulle V, Pietrzyk-Nivau A, Berrou E, Christophe OD, Rosa JP, Lenting PJ, Bryckaert M, Denis CV, Baruch D. LIM kinase/cofilin dysregulation promotes macrothrombocytopenia in severe von Willebrand disease-type 2B. *JCI Insight* 2016; 1: e88643.
51. Kanaji S, Morodomi Y, Weiler H, Zarpellon A, Montgomery RR, Ruggeri ZM, Kanaji T. The impact of aberrant von Willebrand factor-GPIIb/IIIa interaction on megakaryopoiesis and platelets in humanized type 2B von Willebrand disease model mouse. *Haematologica* 2022; 107: 2133-43.
52. Slobodianuk TL, Kochelek C, Foeckler J, Kalloway S, Weiler H, Flood VH. Defective collagen binding and increased bleeding in a murine model of von Willebrand disease affecting collagen IV binding. *J Thromb Haemost* 2019; 17: 63-71.
53. Matsushita T, Meyer D, Sadler JE. Localization of von willebrand factor-binding sites for platelet glycoprotein Ib and botrocetin by charged-to-alanine scanning mutagenesis. *J Biol Chem* 2000; 275: 11044-9.
54. Marx I, Lenting PJ, Adler T, Pendu R, Christophe OD, Denis CV. Correction of bleeding symptoms in von Willebrand factor-deficient mice by liver-expressed von Willebrand factor mutants. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008; 28: 419-24.
55. Sanda N, Suzuki N, Suzuki A, Kanematsu T, Kishimoto M, Hasuwa H, Takagi A, Kojima T, Matsushita T, Nakamura S. Vwf K1362A resulted in failure of protein synthesis in mice. *Int J Hematol* 2018; 107: 428-35.
56. Shi Q, Fahs SA, Mattson JG, Yu H, Perry CL, Morateck PA, Schroeder JA, Raptin J, Weiler H, Montgomery RR. A novel mouse model of type 2N VWD was developed by

CRISPR/Cas9 gene editing and recapitulates human type 2N VWD. *Blood Adv* 2022; 6: 2778-90.

57. Chen J, Tan K, Zhou H, Lo HF, Tronik-Le Roux D, Liddington RC, Diacovo TG. Modifying murine von Willebrand factor A1 domain for in vivo assessment of human platelet therapies. *Nat Biotechnol* 2008; 26: 114-9.

58. Magallon J, Chen J, Rabbani L, Dangas G, Yang J, Bussel J, Diacovo T. Humanized mouse model of thrombosis is predictive of the clinical efficacy of antiplatelet agents. *Circulation* 2011; 123: 319-26.

59. Navarrete AM, Casari C, Legendre P, Marx I, Hu JR, Lenting PJ, Christophe OD, Denis CV. A murine model to characterize the antithrombotic effect of molecules targeting human von Willebrand factor. *Blood* 2012; 120: 2723-32.

60. Kanaji S, Orje JN, Kanaji T, Kamikubo Y, Morodomi Y, Chen Y, Zarpellon A, Eberhardt J, Forli S, Fahs SA, Sood R, Haberichter SL, Montgomery RR, Ruggeri ZM. Humanized GPIIb/IIIa-von Willebrand factor interaction in the mouse. *Blood Adv* 2018; 2: 2522-32.

61. Lohmeier HK, Slobodianuk TL, Kanaji S, Haberichter SL, Montgomery RR, Flood VH. von Willebrand factor variant D1472H has no effect in mice with humanized VWF-platelet interactions. *Blood Adv* 2020; 4: 4065-8.

Table 1: Modèles de saignement chez la souris (d'après Vaezzadeh et al, [19]) avec en gris, les modèles les plus fréquemment utilisés et discutés dans le manuscrit

Modèle de blessure/localisation de la lésion	Lésion artérielle	Lésion veineuse	Lésion microvasculaire
"Tail clip"	Oui	Oui	Oui
Cuticule	Oui	Oui	Oui
Veine latérale de la queue	Non	Oui	Oui
Veine linguale	Non	Oui	Non
Veine saphène	Non	Oui	Non
Artère saphène	Oui	Non	Non
Rein	Non	Non	Oui

Table 2: Types et sous-types de maladie de Willebrand et mécanismes physiopathologiques sous-jacents

	Classification de la MW	MW	Normal
«Low»	Le VWF est fonctionnel, mais sa concentration est réduite (30-50%)	low 	
1	Le VWF est fonctionnel, mais en quantité insuffisante (5-30%)	type 1 	
3	Absence quasi-totale de VWF (<5%)	type 3 	
2A	Le VWF n'est pas multimérisé correctement (trop petit) en raison d'une synthèse anormale ou d'une dégradation augmentée (ou les deux)	type 2A 	
2B	Le VWF se lie spontanément aux plaquettes dans la circulation: effets sur la production, la clairance et la fonction plaquettaire	type 2B 	
2M	Le VWF a perdu la capacité de se lier aux plaquettes ou au collagène et ne peut donc plus assurer sa fonction normale	type 2M 	
2N	Le VWF ne se lie plus au facteur VIII: clairance accélérée du FVIII et symptômes proches de ceux de l'hémophilie A	type 2N 	

Table 3: Listes des différents modèles murins de MW et applications.

Modèle				Applications	Réf.
FW	Mutation	GPIb α	Type MW		
Murin	Délétion totale due au ciblage des exons 4-5	Mu	3	- Etude de la clairance du FW - Etudes du rôle du FW dans l'athérosclérose, la formation du thrombus, le purpura thrombotique thrombocytopénique, les métastases cancéreuses, l'angiogénèse, l'inflammation, les accidents vasculaires cérébraux, la néointima... - Création de modèles transitoires de MW - Modèle pour tester la thérapie génique dans la MW	[21, 25, 26, 29, 30]
Murin	p.R1326H	Mu	-	Ne se lie pas aux plaquettes murines mais uniquement aux plaquettes humaines: modèle pour tester des agents anti-plaquettaires humains	[57]
Murin	p.V1316M	Mu	2B	Effet de l'interaction spontanée FW-GPIb α sur le phénotype hémorragique, la fonction plaquettaire et la mégacaryopoïèse	[44, 48, 50]
Murin avec exon 28 humain	p.V1316M	Hu	2B	Effet de l'interaction spontanée FW-GPIb α sur la mégacaryopoïèse et test d'un anticorps inhibant cette interaction	[51]
Murin	p.R1399H	Mu	2M	Etude de l'effet d'une liaison anormale entre le FW et le collagène IV: phénotype hémorragique modeste	[52]
Murin	p.K1362A	Mu	2M	Etude du mécanisme physiopathologique: Absence d'expression du FW qui semble spécifique au modèle murin	[55]
Murin	p.G785E (<i>CRISPR/Cas9</i>)	Mu	2N	Etude du mécanisme physiopathologique: Phénotype hémorragique évalué dans plusieurs modèles de saignement	[56]
Murin avec exon 28 humain	Aucune mutation	Hu	-	Modèle humanisé pour l'interaction FW-GPIb α afin de tester l'inhibition pharmacologique de cette interaction	[60]
Murin avec exon 28 humain	p.D1724H	Hu	-	Etude du mécanisme physiopathologique: variant génétique identifié comme non pathogène	[61]

Humain	Aucune mutation	Hu	1	Expression réduite du FW (12-15%): modèle de type 1 de MW afin de tester de nouvelles approches thérapeutiques	Non publié
Murin	Multiplés <i>Injections hydrodynamiques</i>	Mu	Variés	- Modèles transitoires ayant permis d'identifier le rôle de résidus importants pour la fonction du FW ou divers mécanismes physiopathologiques - Modèle utilisé pour tester une approche de correction génétique ou d'ARN interférence	[34-36, 38-41, 45-47, 49, 54, 59]

FW : facteur von Willebrand, GP : glycoprotéine, Hu : humain, Mu : murin, MW : maladie de Willebrand

Figure 1: Modèles couramment utilisés pour évaluer le saignement chez la souris ainsi que paramètres mesurés

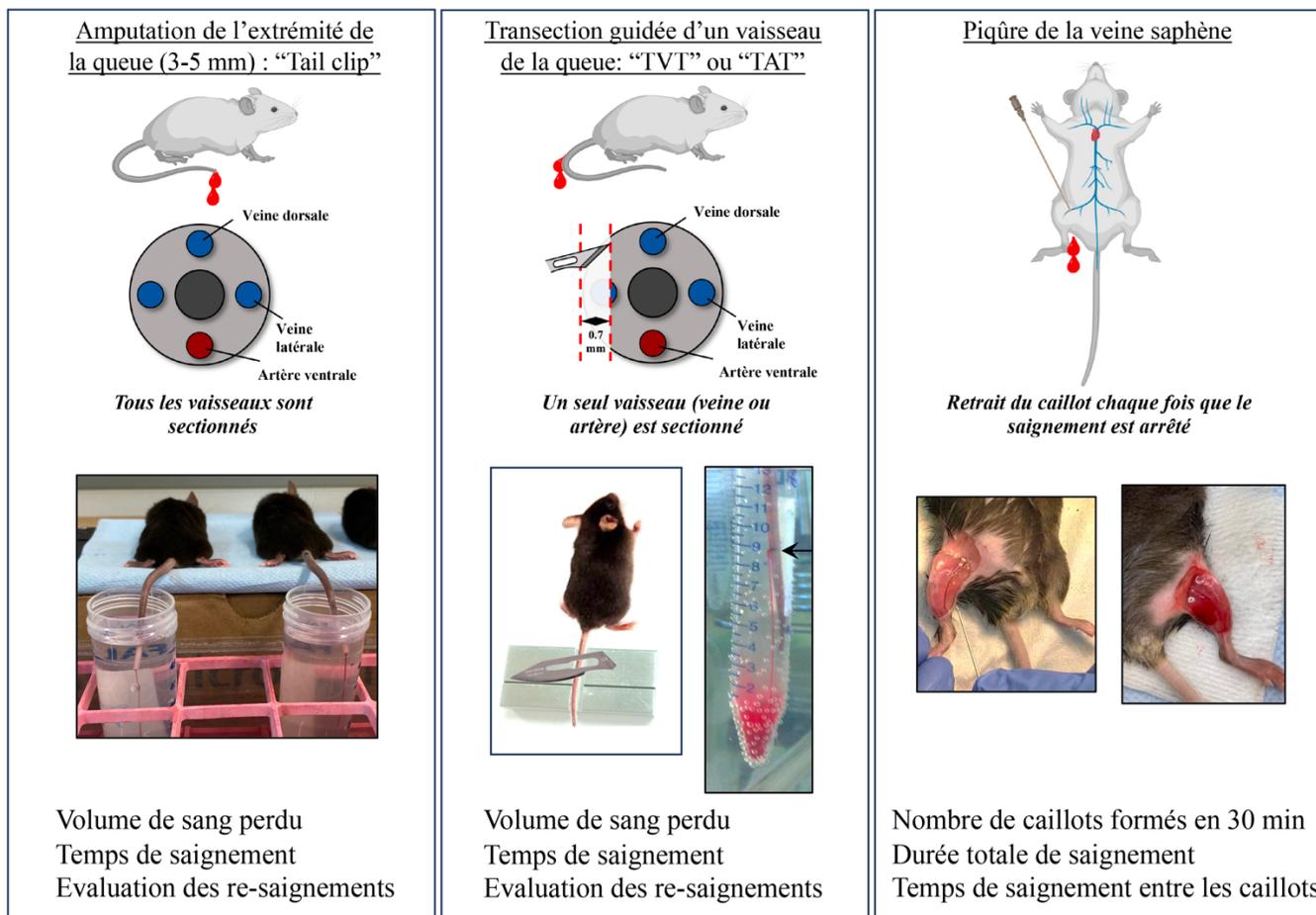
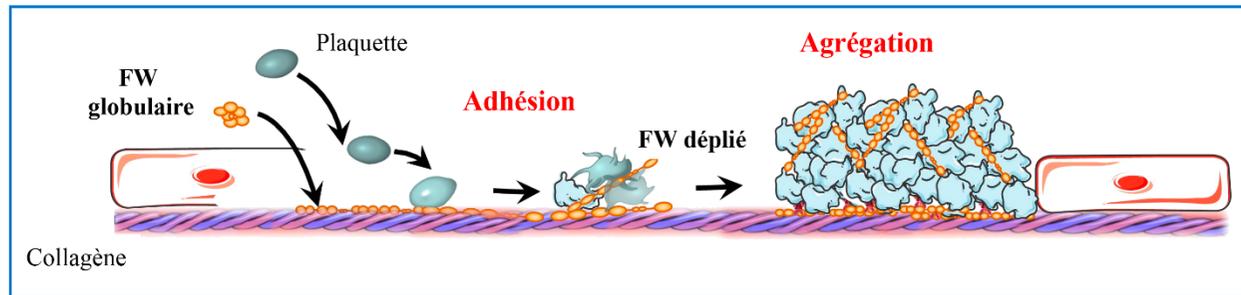
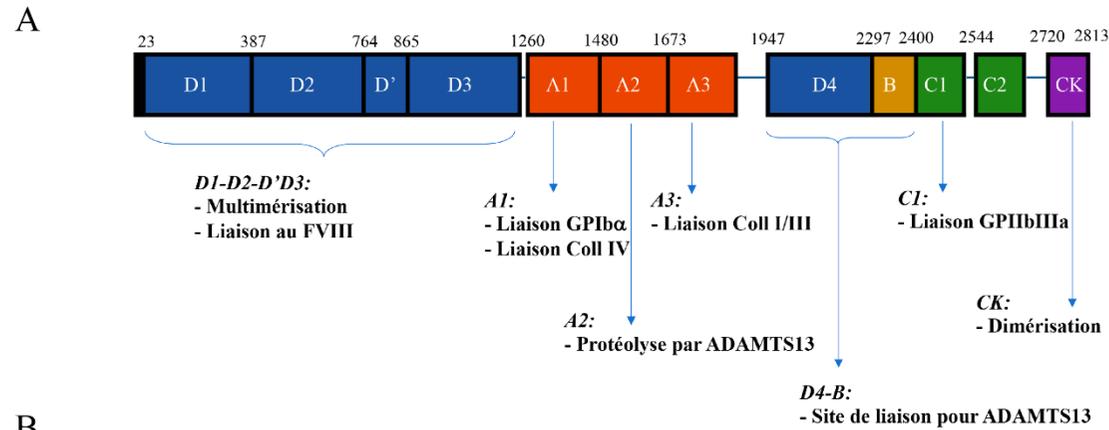


Figure 2: A: Structure du FW avec domaines de liaison FVIII: Facteur VIII; GPIb α : Glycoprotéine Ib α , Coll: collagène, GPIIb/IIIa: Glycoprotéine IIb/IIIa. B: Rôle du FW dans l'adhésion et l'agrégation plaquettaire lors d'une brèche vasculaire



Le FW plasmatique globulaire se lie et se déplie sur la surface de collagène sous-endothelial lors d'une brèche vasculaire

Les plaquettes adhèrent à ce FW déplié

Le FW participe à la croissance du thrombus