

# ETUDE MOLECULAIRE DU SYNDROME DE BERNARD SOULIER CHEZ DES FAMILLES TUNISIENNES NON APPARENTEES

B. HADJ KACEM<sup>1</sup>, I. BEN AMOR<sup>2</sup>, M. SMAOUI<sup>2</sup>, L. MAALEJ<sup>2</sup>, J. GARGOURI<sup>2</sup> et A. GARGOURI<sup>1</sup>

*1- Laboratoire de Valorisation de la Biomasse et Production de Protéines chez les Eucaryotes, Centre de Biotechnologie de Sfax, université de Sfax, BP "K" 3038, Sfax –Tunisia  
2- Laboratoire d'hématologie (99/UR/08-33), Faculté de Médecine de Sfax, Université de Sfax, Centre régionale de transfusion sanguine de Sfax-Tunisie*

## Résumé

Le syndrome de Bernard Soulier (BSS) est thrombopathie hémorragique héréditaire rare. Elle se transmet selon le mode autosomique récessif. Le patient présente des plaquettes morphologiquement géantes, une thrombopénie et un temps de saignement prolongé. Cette maladie est due à un défaut quantitatif ou qualitatif du complexe GPIb-IX-V. Sur le plan moléculaire, trois gènes sont candidats pour le BSS : GPIb $\alpha$ , GPIb $\beta$  et GPIX.

Dans ce travail, nous décrivons une mutation identifiée au niveau du gène GPIb $\beta$  chez plusieurs familles tunisiennes non apparentées. L'hérédité de cette mutation est conforme au mode autosomique récessif. Nous suggérons que cette mutation ait un effet fondateur dans la population tunisienne et qu'elle peut être très utile lors des confirmations de diagnostic de nouveaux cas cliniques.

**Mots clés :** Complexe GPIb-IX-V, GPIb $\beta$ , mutation, Syndrome de Bernard Soulier.

## Summary

Bernard Soulier syndrome (BSS) is a rare hereditary bleeding disorder. It is inherited in an autosomal recessive manner. The patient has giant platelets, thrombocytopenia and a prolonged bleeding time. This disease is caused by a quantitative or qualitative defect of GPIb-IX-V complex. GPIb $\alpha$ , GPIb $\beta$  and GPIX are three candidate genes for this syndrome.

In this work, we describe a mutation in the GPIb $\beta$  gene identified in several unrelated Tunisian families. The inheritance of this mutation is according to autosomal recessive form. We suggest that this mutation has a founder effect in the Tunisian population and can be very useful in the diagnostic confirmation of new clinical cases.

**Keywords :** Bernard Soulier syndrome, GPIb-IX-V complex, GPIb $\beta$ , mutation.

## INTRODUCTION

Le syndrome de Bernard Soulier (BSS) est une thrombopathie hémorragique liée à un déficit génétique, quantitatif (BSS classique) ou qualitatif (BSS non classique), en glycoprotéine (GP) Ib-IX-V, complexe glyco-protéique de la membrane plaquettaire qui joue un rôle essentiel dans l'hémostase primaire en tant que récepteur du facteur von Willebrand (VWF) [1,2,3,4]. Il en résulte un défaut d'adhésion plaquettaire au sous endothélium vasculaire à cause d'une diminution d'interaction avec le VWF [5]. C'est une pathologie très rare avec une prévalence estimée à 1/1000000 dans les populations d'Europe, d'Amérique du nord et du Japon [3,6]. Toutefois, cette prévalence serait sous-estimée à cause des diagnostics erronés et d'une couverture insuffisante.

Cliniquement, la maladie se manifeste par un syndrome hémorragique plus ou moins important débutant dès l'enfance précoce, parfois dès les premiers jours de vie [7]. Il est, essentiellement, muqueux fait d'épistaxis bilatérales et récidivantes, gingivorragies, ménorragie, hémorragies du post-partum, des saignements prolongés lors des plaies superficielles, un saignement excessif et prolongé après un acte vulnérant et, plus rarement, des hémorragies gastro-intestinales. Le purpura cutané (ecchymoses, pétéchies) est plus rare. La sévérité et la fréquence des saignements diffèrent d'un patient à l'autre [7].

Sur le plan biologique, le BSS se caractérise par des plaquettes géantes, un chiffre de plaquettes normal ou modérément abaissé et un temps de saignement allongé pouvant dépasser 20 min. L'étude de l'agrégation plaquettaire montre une réponse normale à des agonistes comme l'ADP et le collagène et une absence d'agglutination des plaquettes à la ristocétine qui est un processus dépendant de l'interaction du VWF avec la GP Ib-IX-V [3,8].

Le BSS se transmet, le plus souvent, selon un mode autosomique récessif, avec souvent une notion de consanguinité. Quelques cas de transmission autosomique dominante ont été décrits [9,10].

Sur le plan moléculaire, les défauts génétiques responsables du BSS ont été localisés sur les gènes des GPIIb $\alpha$ , GPIIb $\beta$  et GPIX situés, respectivement, sur les chromosomes 17 (17p12), 22 (22q11) et 3 (3q21) [3,5]. Les mutations identifiées s'élèvent à plus de 50 [7] et comprennent des mutations faux sens, non sens et des petites insertions ou délétions [7]. Les défauts du gène GPV ne sont pas associés

au BSS [11]. La plupart des mutations touchent un seul patient ou une seule famille à l'exception de la mutation Asn45Ser dans le gène GPIX qui a été rapportée dans plusieurs familles de diverses origines, due probablement à un effet fondateur [12].

Nous avons étudié, par biologie moléculaire, les gènes codants pour le complexe glycoprotéique Ib-IX-V dans des familles tunisiennes non apparentées atteintes par le BSS, afin d'identifier les mutations génétiques associées à cette pathologie.

## MATERIEL ET METHODES

### 1- Les différents cas cliniques :

#### Famille F1:

Patient (N.CH), âgé de 13 ans, originaire de Sfax, c'est le deuxième enfant d'une famille de cinq individus. Ces parents, consanguins de premier degré, et ces deux sœurs ne présentent aucun signe pathologique ni hémorragique. Ses antécédents étaient marqués par la survenue, dès les premiers mois de sa vie, d'un purpura, d'ecchymoses et des hémorragies buccales persistantes ayant nécessité des transfusions de concentrés globulaires. Le diagnostic de BSS a été retenu devant l'absence de pathologie de la coagulation, la thrombopénie et le profil d'agrégation plaquettaire caractérisé par une réponse normale à l'ADP et au collagène et l'absence d'agglutination à la ristocétine.

#### Famille F2 :

Patiente (Y.G), âgée de 7 ans, originaire de Sfax, issue d'une grossesse gémellaire précieuse après une stérilité primaire de dix ans. Le deuxième fœtus est décédé *in utero*. Ces parents étaient consanguins de 2<sup>ème</sup> degré et ne présentaient aucun antécédent hémorragique. La numération formule sanguine (NFS) pratiquée à la naissance, lors d'une hospitalisation en néonatalogie pour une détresse respiratoire d'origine infectieuse, objectivait une thrombopénie à 22 000/ml, vérifiée sur plusieurs NFS. Les tests d'agrégation plaquettaire montraient une réponse normale à l'ADP et au collagène et nulle à la ristocétine. Le FVW antigène était de 100 % et l'activité cofacteur à la ristocétine de 84 %. L'examen de la moelle montrait un aspect normal. Il n'y a pas de signes hémorragiques sérieux.

**Famille F3 :**

Patiente (M. F), âgée de 30 ans, originaire de Sfax, née de parents consanguin de premier degré et ne présentant aucun antécédent hémorragique. Le BSS était diagnostiquée, chez cette patiente, à l'âge de 10 ans à la suite d'un saignement anormal provoqué par un traumatisme crânien. La puberté était marquée par des règles abondantes. Plus tard, la patiente a donné naissance à deux enfants. Les deux grossesses ont été déroulées sans manifestations hémorragiques. L'accouchement a été fait après transfusion prophylactique de concentrés plaquettaires afin d'éviter toute complication. Les deux enfants sont sains.

**Famille F4 :**

Patient (A.G), âgé de 27 ans, originaire de Sfax, issu d'un mariage consanguin entre parents sains; il a deux sœurs saines. Il a présenté des séries d'épistaxis nécessitant parfois une hospitalisation. Le diagnostic de BSS a été confirmé par l'étude de l'agrégation plaquettaire et par cytométrie en flux.

**Famille F5 :**

Cette famille est originaire de Gafsa. Le mariage consanguin des parents a donné naissance à deux garçons sains et deux filles jumelles malades. Les deux patientes sont âgées de 13 ans. Elles souffrent de gingivorragie et présentent une thrombopénie variant entre 27000 et 30000 plaquettes/ml. Le test d'agrégation montre une réponse négative uniquement en présence de la ristocétine. Le diagnostic du BSS est confirmé par cytométrie en flux.

*2- Les prélèvements sanguins :*

Les échantillons sanguins des différents membres de chaque famille ont été prélevés sur EDTA.

*3- Amplification par PCR et séquençage de l'ADN:*

L'ADN génomique a été extrait à partir de 300 µl de sang à l'aide du kit Wizard® Genomic DNA purification kit (Promega). Les gènes GPIbα, GPIbβ, et GPIX ont été amplifiés par PCR en utilisant différents couples d'amorces (voir tableau).

Les produits de PCR ont été migrés sur gel d'agarose et purifiés en utilisant le kit Wizard SV Gel and PCR Clean-up system (Promega).

Les fragments ainsi obtenus ont été séquencés grâce à un séquenceur automatique (Applied Biosystem model ABI PRISM 3100 AVANT DNA sequencer) et en utilisant le kit de séquençage (Big Dye Terminator V 3.1 cycle sequencing kit).

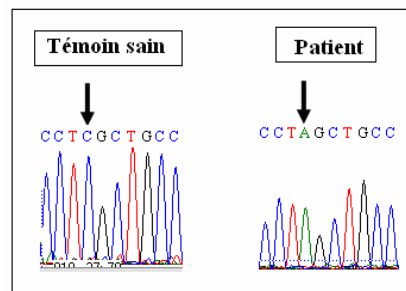
*4- Analyse par RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphisme) :*

Des aliquotes des fragments amplifiés par PCR grâce au couple (7847-7848) ont été incubées avec l'enzyme de restriction MnlI (Qbiogene). Les produits de digestion ont été analysés par électrophorèse sur gel d'acrylamide 10% et visualisés sous lumière UV après coloration au Bromure d'éthidium.

**RESULTATS**

**Identification d'une mutation dans le gène GPIbβ :**

Pour le patient (N.CH) de la famille F1, le séquençage des produits de PCR amplifiés avec les couples 9621-9626 et 3854-3855 spécifiques, respectivement, aux gènes GPIbα et GPIX, a révélé des séquences indemnes de toute mutation. Par ailleurs, le séquençage du produit de PCR amplifié avec le couple 7847-7848 a montré la présence d'une mutation à la position 143 du gène GPIbβ, en comptant à partir du codon d'initiation ATG [13]. Ce résultat a été vérifié sur les deux brins et dans deux produits de PCR différents. Cette mutation change une cytosine par une adénine (figure 1).



**Figure1 : Identification de mutation dans le gène GPIbβ du patient.**

Le séquençage du gène GPIbβ montre la présence d'une mutation chez le patient de la famille F1 qui change la cytosine 143 par une adénine.

Ceci convertit le codon TCG spécifiant la sérine 23 en un codon Stop prématuré entraînant ainsi un arrêt de la traduction de la protéine.

La mutation Ser23Stop a été révélée chez le patient à l'état homozygote. Le séquençage du gène GPIIb $\beta$  chez ses parents et ses sœurs (tous indemnes) a montré qu'ils sont tous hétérozygotes à la position 143 de ce gène.

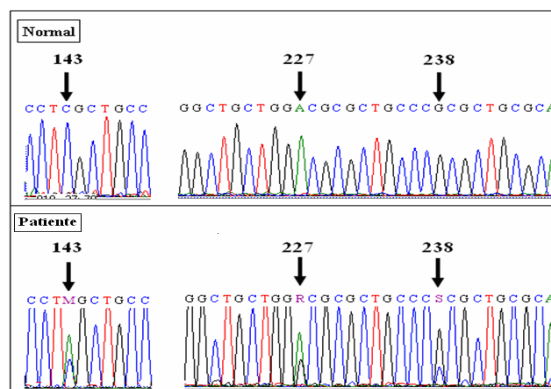
### Présence de la même mutation chez plusieurs familles tunisiennes non apparentées :

Sur la base des résultats observés chez la famille F1, nous avons commencé par la recherche de la mutation Ser23Stop au niveau du gène GPIIb $\beta$  chez les autres familles à explorer.

Une analyse approfondie de la mutation Ser23Stop a montré qu'elle abolit un site de restriction reconnu par l'enzyme *MnII*. Par conséquent, nous avons adopté la technique de PCR-RFLP lors de l'exploration des autres familles étant donné qu'elle est plus rapide et moins coûteuse que le séquençage.

La PCR-RFLP réalisée pour la patiente de la famille F2 et ses parents a montré la présence de la mutation Ser23Stop au niveau du gène GPIIb $\beta$ . La patiente était homozygote pour cette mutation et ses parents étaient hétérozygotes. Ce résultat a été confirmé par le séquençage.

Quand à la famille F3 et devant le refus des parents de se faire prélever, notre étude a porté uniquement sur la patiente. L'analyse par RFLP du produit de PCR chez cette dernière a montré un profil hétérozygote pour la mutation Ser23Stop. Ce résultat était inattendu vu la récessivité du syndrome. Afin de vérifier le résultat, nous avons séquencé le produit de PCR déjà utilisé lors de l'analyse par RFLP. Effectivement, nous avons confirmé la présence de la mutation Ser23Stop à l'état hétérozygote chez cette patiente. En plus, nous avons révélé la présence de deux autres mutations faux-sens situées dans le gène GPIIb $\beta$  : la première change une adénine par une guanine à la position 227, ce qui convertit l'acide aspartique 51 en glycine ; la deuxième change une guanine par une cytosine à la position 238, ce qui transforme l'alanine 55 en proline. Ces deux mutations étaient présentes à l'état hétérozygote (figure 2).



**Figure 2 : Séquençage du gène GPIIb $\beta$  chez la patiente de la famille F3.**

Le séquençage de produits de PCR du gène GPIIb $\beta$  de la patiente montre une hétérozygotie composée pour trois mutations : (C 143 A), (A 227 G) et (G 238 C).

Il est à noter que nous avons aussi séquencé la phase de lecture ouverte des gènes GPIIb $\alpha$  et GPIIX pour les patients des familles F1, F2 et F3 afin de nous assurer que la mutation Ser23Stop identifiée au niveau du gène GPIIb $\beta$  est responsable, à elle seule, de l'atteinte par la maladie. Ce qui fût le cas.

Concernant les familles F4 et F5, nous avons rencontré des difficultés lors de l'amplification par PCR du gène GPIIb $\beta$ . En attendant la résolution du problème, nous avons amplifié les gènes GPIIb $\alpha$  et GPIIX uniquement chez les patients. Le séquençage des produits de PCR a montré l'absence de mutation au niveau de ces deux gènes.

**Tableau :**

La numérotation des nucléotides des gènes GPIb $\alpha$ , GPIb $\beta$  et GPIX est respectivement selon leur séquence publiée par GenBank M22403, NC 000022 et NC-000003

<b>Nom</b>	<b>Séquence</b>	<b>Localisation</b>
3854	5'TTGGTGGAGTCTGGGGACCT 3'	1578-1559 du GPIX
3855	5'CTTGCCGTCCCTGAGGATCG 3'	899-918 du GPIX
3850	5'TTACTGCGGCGCTTCCCTTG 3'	289-308 du GPIb $\beta$
7847	5'GTAAGCCGGGCTGCCGTCTT 3'	2-21 du GPIb $\beta$
7848	5'CGTGTTGCCAGCGCCGGTTCT 3'	970-949 du GPIb $\beta$
7849	5'CGCGTCCAGCAGCCCCGGCGGCAG 3'	532-509 du GPIb $\beta$
9621	5'ACAGGAGGTGTGGATGCTGTTTCT3'	2947-2970 du GPIb $\alpha$
9617	5'CAAGCTGGAGAAGCTCAGTCTGGCT3'	3560-3584 du GPIb $\alpha$
9618	5'AGGACTGTGGTCAAGTTCCCCACC3'	3992-4016 du GPIb $\alpha$
9619	5'AGTGATACGGGTTTTGTGGTAGTT3'	4450-4426 du GPIb $\alpha$
9626	5'CACAGGCTCTTCTCTCAAGGTCC3'	4987-4964 du GPIb $\alpha$

**DISCUSSION**

L'étude du BSS tire son importance du rôle essentiel joué par le complexe GP Ib-IX-V dans l'adhésion des plaquettes au sous-endothélium des zones endommagées. C'est grâce aux différentes mutations identifiées chez des patients d'origines diverses et aux travaux d'expression hétérologue que les chercheurs ont pu identifier le rôle de chaque domaine des protéines formant le complexe GPIb-IX-V [5,7].

Le BSS a été relativement mieux étudié chez les populations européennes, japonaises et nord-américaines [7]. Cependant, les travaux de recherche n'ont pas visé les populations africaines et arabes ; d'où vient l'idée de notre travail.

Notre étude a débuté avec la famille F1 formée de cinq membres: parents cousins germains et trois enfants, dont un fils malade. Grâce au séquençage, nous avons révélé la présence d'une mutation dans le gène GPIb $\beta$  qui change la serine 23 en un codant Stop prématuré. Cette mutation a été présente à l'état homozygote chez le patient, et à l'état hétérozygote chez les parents et les deux sœurs.

Ces résultats sont en accord avec le mode de transmission autosomique récessif du syndrome. Le mariage consanguin de premier degré a alors accentué le risque d'apparition de la maladie [14].

Dans la littérature, la plupart des mutations identifiées sur le gène GPIb $\beta$  et impliquées dans le BSS sont situées dans le domaine extracellulaire [5]. La mutation Ser23Stop identifiées dans notre étude est, elle aussi, située dans ce domaine. Cette mutation a été identifiée chez deux autres familles tunisiennes non apparentées (F2 et F3). L'hérédité de cette mutation chez F2 est conforme au mode autosomique récessif. Il s'agit donc de la même mutation identifiée chez la famille F1.

Concernant la famille F3, la patiente est dite « hétérozygote composée » pour cette même mutation (C 143 A) et deux autres nouvelles substitutions au niveau du même gène GPIb $\beta$  : (A 227 G) et (G 238 C) convertissant, respectivement, l'acide aspartique 51 en glycine et l'alanine 55 en proline.

Dans la littérature, l'hétérozygotie composée a été déjà décrite chez les patients atteints de BSS. De façon générale, elle est récurrente chez les patients atteints de BSS puisqu'environ 20 % des mutations décrites pour ce syndrome est sous cette forme [7]. Cependant, elle a été moins identifiée au niveau du gène GPIb $\beta$ . En effet, deux cas uniquement ont été antérieurement décrits: le premier a été observé chez un patient japonais atteint de BSS ayant un

taux plaquettaire normal et un saignement modéré. Il était hétérozygote pour deux mutations touchant les résidus 88 et 108 de la protéine GPIIb $\beta$  [15]. Le deuxième cas a été aussi décrit chez un patient japonais présentant deux mutations au niveau de GPIIb $\beta$  (Cys122Ser et 1096delG), tous les deux hétérozygotes [16].

Le cas de la patiente de la famille F3 est le troisième (pour le gène GPIIb $\beta$ ) si on s'intéresse à l'hétérozygotie du BSS de façon générale, mais c'est le premier cas d'hétérozygotie impliquant trois mutations différentes au niveau d'un même gène [17].

Il serait intéressant d'isoler chaque mutation hétérozygote dans un système cellulaire en culture afin de voir l'effet de chaque mutation à part. L'hypothèse serait que chaque mutation isolée n'aurait pas ou peu d'effet (ce qui revient à l'assimiler au cas des parents), reflétant ainsi une pénétrance incomplète.

Malgré sa rareté, le BSS a été bien étudié dans certaines populations. Jusqu'à nos jours, on compte une cinquantaine de mutations [7]. La plupart de ces mutations sont uniques: identifiées chez un patient ou une seule famille. Les mutations fondatrices sont rarement décrites pour cette maladie. En effet, la mutation Ala156Val du gène GPIIb $\alpha$  est fréquente dans la population Italienne [10]. La mutation Asn45Ser du gène GPIIX est considérée comme la mutation la plus répandue. Elle a été décrite chez plusieurs patients de différentes nationalités [18].

Etant donné que la majorité des mutations décrites dans le BSS sont uniques et que nous avons retrouvé la même mutation Ser23Stop chez trois familles tunisiennes non apparentées, nous avons suggéré l'idée de mutation fondatrice. Cette hypothèse pourrait être accentuée d'avantage si on trouve la même mutation Ser23Stop chez les deux autres familles F4 et F5 et c'est assez probable puisqu'on sait déjà que les gènes GPIIb $\alpha$  et GPIIX chez les patients de ces deux familles ne contiennent pas de mutation.

L'intérêt de l'identification d'une mutation fondatrice vient du fait qu'elle peut aider les médecins à éviter des diagnostics erronés. En effet, Sachs *et al* ont étudié des patients allemands, non apparentés, avec des thrombopénies et des histoires de saignements modérés. Trois patients avaient été diagnostiqués pour un purpura thrombocytopenique auto-immun noté (ITP) et ont été traités avec des stéroïdes. Ces trois patients ne montraient aucune réponse au traitement. Le séquençage des gènes GPIIb $\alpha$ , GPIIb $\beta$  et GPIIX, chez ces derniers, a montré

la présence de la mutation Asn45Ser du gène GPIIX à l'état homozygote. Cette mutation a été déjà décrite dans la littérature dans plus de dix familles, d'origines différentes, atteintes par le syndrome de Bernard Soulier. Ce défaut génétique est considéré comme le plus décrit dans la population européenne (nord et centre). Afin d'éviter les erreurs de diagnostic et la confusion entre l'ITP et le BSS, Sachs *et al* proposent que le génotypage de la mutation Asn45Ser pourrait aider dans le diagnostic différentiel [19].

Du moment où Asn45Ser a été identifié chez environ dix patients dans la population européenne de 400 millions habitants et que nous avons identifié la mutation Ser23Stop chez trois patients de deux gouvernorats tunisiens (moins de un millions d'habitants), nous évoquons l'idée de mutation fondatrice et nous suggérons qu'elle pourrait aider dans le diagnostic.

## CONCLUSION

La détermination d'une nouvelle mutation chez des familles tunisiennes atteintes par le BSS et non apparentées est d'une importance capitale. En effet, la mutation Ser23Stop identifiée au niveau du gène GPIIb $\beta$ , dont nous suggérons fortement qu'elle ait un effet fondateur dans la population tunisienne, peut être très utile lors du diagnostic des nouveaux cas cliniques d'autant plus qu'elle est identifiable par une simple PCR-RFLP.

## REFERENCES

1. Kunishima S, Matsushita T, Ito T, Kamiya T, Saito H. Novel nonsense mutation in the platelet glycoprotein Ib beta gene associated with Bernard-Soulier syndrome. *Am J Hematol* 2002; 71(4): 279-284.
2. Suzuki K, Hayashi T, Yahagi A, Akiba J, Tajima K, Satoh S *et al*. Novel point mutation in the leucine-rich motif of the platelet glycoprotein IX associated with Bernard-Soulier syndrome. *Br J Haematol* 1997; 99(4): 794-800.
3. López JA, Andrews RK, Afshar-Kharghan V, Berndt MC. Bernard-Soulier Syndrome. *Blood* 1998; 91: 4397-4418.
4. Kahn ML, Diacovo TG, Bainton DF, Lanza F, Trejo J, Coughlin SR. Glycoprotein V-deficient platelets have undiminished thrombin responsiveness and do not exhibit a Bernard-Soulier phenotype. *Blood* 1999; 94: 4112-4121.
5. Lanza F. Bernard-Soulier syndrome (Hemorrhagic thrombocytodystrophy). *Orphanet Journal of Rare Diseases* 2006;1:46.
6. Uff S, Clemetson JM, Harrison T, Clemetson KJ, Emsley J. Crystal Structure of the Platelet Glycoprotein Ib N-terminal Domain Reveals an Unmasking Mechanism for Receptor Activation. *J Biol Chem* 2002; 277(38): 35657-35663.
7. Hadjkacem B, Ben Amor I, Smaoui M, Maalel L, Gargouri J, Gargouri A. Bernard Soulier Syndrome: A Rare Bleeding

Disorder with a Wide Range of Genetic Defects. Journal of coagulation disorders 2010 (sous presse).

8. Trzeciak MC, Bordet JC, Dechavanne M. Exploration de l'hémostase primaire. Edit. Sampol J, Arnoux D et Boutière B. Manuel d'hémostase Elsevier. Collection option/Bio, 1995:109-146.
9. Miller JL, Lyle VA, Cunningham D. Mutation of Leucine 57 to phenylalanine in a platelet glycoprotein Ib leucine tandem repeat occurring patients with an autosomal dominant variant of Bernard-Soulier disease. Blood 1992; 79: 439-446.
10. Savoia A, Balduini CL, Savino M, Noris P, Del Vecchio M, Perrotta S et al. Autosomal dominant macrothrombocytopenia in Italy is most frequently a type of heterozygous Bernard-Soulier syndrome. Blood 2001; 97(5): 1330-1335.
11. Moran N, Morateck PA, Deering A, Ryan M, Montgomery RR, Fitzgerald DJ et al. Surface expression of GPIb alpha is dependent on GPIb beta: evidence from a novel mutation causing Bernard-Soulier syndrome. Blood 2000; 96:532-539.
12. Kroll H, Michaelides K, Tuddenham EG, Vanhoorelbeke K, Ward CM. A common ancestral glycoprotein (GP) 9 1828A>G (Asn45Ser) gene mutation occurring in European families from Australia and Northern Europe with Bernard-Soulier Syndrome (BSS). Thromb Haemost 2005; 94:599-605.
13. Lopez JA, Chung DW, Fujikawa K, Hagen FS, Davie EW, Roth GJ. The  $\alpha$  and  $\beta$  chains of human platelet glycoprotein Ib are both transmembrane proteins containing a leucine-rich amino acid sequence. Proc Natl Acad Sci USA 1988; 85:2135-2139
14. Hadjkacem B, Elleuch H, Gargouri J, Gargouri A. Bernard Soulier syndrome: novel nonsense mutation in GPIbbeta gene affecting GPIb-IX complex expression. Ann Hematol 2009;88(5):465-472.
15. Kunishima S, Lopez JA, Kobayashi S, Imai N, Kamiya T, Saito H et al. Missence mutation of the glycoproteine (GP)Ib gene impairing the GPIb disulfide linkage in a family with giant platelet disorder. Blood 1997; 89(7): 2404-2412.
16. Kunishima S, Yamazaki T, Matsushita T, Sako M, Hamaguchi M, Saito H. Variant Bernard-Soulier syndrome caused by compound heterozygous mutations in the GPIb beta gene. Platelets 2004; 15:374-375.
17. Hadjkacem B, Elleuch H, Trigui R, Gargouri J, Gargouri A. The same genetic defect in three Tunisian families with Bernard Soulier syndrome: a probable founder stop mutation in GPIbbeta. Ann Hematol 2010; 89:75-81.
18. Liang HP, Morel-Kopp MC, Clemetson JM, Clemetson KJ, Kekomaki R, Kroll et al. A common ancestral glycoprotein (GP) 9 1828A-G (Asn45Ser) gene mutation occurring in European families from Australia and Northern Europe with Bernard-Soulier Syndrome (BSS). Thromb Haemost 2005;94:599-605.
19. Sachs UJ, Kroll H, Matzdorff AC, Berghofer H, Lopez JA, Santoso S. Bernard-Soulier syndrome due to the homozygous Asn-45Ser mutation in GPIX: an unexpected, frequent finding in Germany. Br J Haematol 2003;123(1):127-131.