

ANNÉE 2020

N°

THÈSE
pour le
DIPLÔME D'ÉTAT
DE DOCTEUR EN PHARMACIE

par

Fatéma DIB

Née le 4 Août 1994, à Nantes (44)

Présentée et soutenue publiquement le 30 Novembre 2020

**Thrombopénies constitutionnelles et variants hétérozygotes des gènes
GP1BA, GP1BB, GP9, ITGA2B et ITGB3 : revue de la littérature**

Président : Monsieur le Professeur Jean-Marie BARD

Directeur: Monsieur le Docteur Marc FOUASSIER

Remerciements

A M. le Docteur Marc FOUASSIER, pour ta disponibilité, pour la confiance que tu m'as accordée pour mener à bien ce travail. Je te remercie pour les connaissances et compétences que tu m'as transmises en hémostase, toujours avec bienveillance.

A M. le Professeur Jean-Marie BARD, je vous remercie d'avoir accepté la présidence du jury.

A Mme le Professeur Marie-Christine BÉNÉ, pour votre accueil au sein du laboratoire d'hématologie, et pour votre aide au long de mon parcours d'internat.

A Mme le Docteur Marion EVEILLARD, pour m'avoir transmis l'intérêt pour l'hématologie dès mes premières années d'études.

A M. le Docteur Benoît GUILLET, pour l'intérêt que vous portez à ce travail.

A mes parents, pour vos sacrifices, votre immense soutien tout au long de ces années d'études, pour m'avoir inculqué les valeurs du travail et de la persévérance, ces quelques lignes sont bien modestes pour exprimer toute l'admiration que je vous porte.

A Yamna, pour ton aide et tes conseils, tu seras toujours un exemple pour moi.

A Abderahmane, Hiba et Elbatoul, pour votre soutien, pour vos blagues et vos éclats de rire, pour toute la joie que vous m'apportez chaque jour.

A mes amies, Soumaya E., Soumaya H., Saoussane, Lina, Sihame, Ihcène, Nabila, Yasmine, Suela, Kahina, Yasmina, Asmaa, Noémie, Capucine, Léa, Sofia, Delphine, Mathilde, et toutes celles que je n'ai pas pu citer, pour votre soutien pendant les épreuves, ces années d'études passées à vos côtés m'ont laissé de beaux souvenirs.

A mes co-internes, nantais et angevins, pour l'entraide et la solidarité que nous avons partagées au fil des semestres.

A Aïssam, pour ton aide, tes encouragements, ta patience pendant cette période si particulière, merci d'être à mes côtés.

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ABREVIATIONS	6
LISTE DES FIGURES.....	7
LISTE DES TABLEAUX	8
LISTE DES ANNEXES	9
Introduction.....	10
I. Physiologie de l'hémostase	10
A) Hémostase primaire	10
1. Endothélium	11
2. Facteur Willebrand	11
3. Plaquettes.....	11
B) Coagulation.....	13
1. Facteurs de la coagulation.....	13
2. Cascade de la coagulation	14
3. Anticoagulants naturellement produits par l'organisme	16
C) Fibrinolyse	17
II. Les plaquettes	18
A) Mégacaryopoïèse et production des plaquettes	18
B) Structure globale	20
1. Zone périphérique	20
2. Cytoplasme	21
3. Organites	21
4. Systèmes membranaires	22
C) Granules plaquettaires	23
1. Contenu des granules.....	23
2. Mécanismes de la sécrétion des granules.....	24
3. Fonctions de la sécrétion.....	24
D) Glycoprotéines de surface.....	25
1. Complexe GpIb-IX-V	26
2. Gp VI	27
3. Intégrine α IIb β 3.....	27

E) Voies d'activation des plaquettes	28
1. Thrombine	29
2. ADP	29
III. Les glycoprotéines plaquettaires et leurs pathologies.....	29
A) Complexe GpIb-IX-V	30
1. Structure détaillée	30
2. Maladie de Bernard-Soulier	31
3. Variants connus des gènes <i>GP1BA</i> , <i>GP1BB</i> et <i>GP9</i>	33
4. Variants hétérozygotes.....	35
B) Intégrine α IIb β 3.....	51
1. Structure détaillée	51
2. Thrombasthénie de Glanzmann	55
3. Variants hétérozygotes.....	57
Discussion	68
Perspectives.....	72
Bibliographie.....	80

LISTE DES ABREVIATIONS

CIVD : coagulation intravasculaire disséminée

CMF : cytométrie en flux

GPs : glycoprotéines plaquettaires

GT : Thrombasthénie de Glanzmann

kDa : kiloDalton

LRR : Leucine-Rich Repeats

MKC : Mégacaryocytes

MTP : Macrothrombopénie

NGS : Next Generation Sequencing

PAI-1 : Plasminogen Activator Inhibitor

Pb : Paires de bases

PCa : Protéine C activée

PDF : Produits de Dégradation du fibrinogène et de la Fibrine

PZI : Protein Z dependant protease inhibitor

RIPA : Ristocétine Induced Platelet Agregation

TAFI : Thrombin Activatable Fibrinolysis Inhibitor

TFPI : Tissue factor pathway inhibitor

tPA : tissue Plasminogen Activator

TPO : Thrombopoïétine

VPM : Volume Plaquettaire Moyen

vWF : von Willebrand Factor

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1 : REPRESENTATION SIMPLIFIEE DE LA CASCADE DE LA COAGULATION	15
FIGURE 2 : LE SYSTEME DE LA FIBRINOLYSE.....	17
FIGURE 3 : MEGACARYOPOÏESE ET PRODUCTION DES PLAQUETTES	19
FIGURE 4 : ULTRASTRUCTURE PLAQUETTAIRE.....	20
FIGURE 5 : STRUCTURE DU COMPLEXE GPIB-IX-V.....	26
FIGURE 6 : STRUCTURE DE LA GP VI.....	27
FIGURE 7 : STRUCTURE ET ACTIVATION DE L'INTEGRINE AIIBB3.....	28
FIGURE 8 : STRUCTURE DE CHAQUE SOUS-UNITE DU COMPLEXE GPIB-IX-V	30
FIGURE 9 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA GPIBA ET LOCALISATION DES VARIANTS HETEROZYGOTES.....	43
FIGURE 10 : LOCALISATION DES VARIANTS HETEROZYGOTES IDENTIFIES DE <i>GP1BB</i> RESPONSABLES DE MTP ET DES VARIANTS RESPONSABLES DE BSS CLASSIQUE.....	47
FIGURE 11 : STRUCTURE PRIMAIRE DE AIIBB3.....	51
FIGURE 12 : REPRESENTATION DES DIFFERENTS DOMAINES DE AIIB ET DE B3	51
FIGURE 13 : CONFORMATIONS DES INTEGRINES.....	54
FIGURE 14 : MECANISME DE LA MTP INDUITE PAR LA SUBSTITUTION P.THR720DEL	65

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1 : CONCENTRATIONS PLASMATIQUES ET DEMI-VIES DES PRINCIPAUX FACTEURS DE LA COAGULATION.....	14
TABLEAU 2 : CONTENU DES GRANULES ALPHA	23
TABLEAU 3 : CONTENU DES GRANULES DENSES.....	24
TABLEAU 4 : DESCRIPTION ET CARACTERISTIQUES DES VARIANTS HETEROZYGOTES DE <i>GP1BA</i>	49
TABLEAU 5 : DESCRIPTION ET CARACTERISTIQUES DES VARIANTS HETEROZYGOTES DE <i>GP1BB</i>	50
TABLEAU 6 : DESCRIPTION ET CARACTERISTIQUES DES VARIANTS HETEROZYGOTES D' <i>ITGA2B</i>	66
TABLEAU 7 : DESCRIPTION ET CARACTERISTIQUES DES VARIANTS HETEROZYGOTES D' <i>ITGB3</i>	67

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1 : liste des variants décrits pour GP1BA, GP1BB, GP9, d'après la Leiden Open Variation Database.....	73
Annexe 2 : Score hémorragique ISTH-BAT.....	79

Introduction

Les thrombopénies constitutionnelles sont des pathologies héréditaires rares, dont le diagnostic peut parfois être difficile. Il repose notamment sur des analyses de génétique. De nouvelles mutations sont décrites régulièrement et viennent compléter les données existantes sur cette entité de pathologies hémorragiques héréditaires.

L'objectif de ce travail est de faire un état des lieux des connaissances sur les thrombopénies constitutionnelles liées à des mutations hétérozygotes sur les gènes des glycoprotéines plaquettaires : *GP1BA*, *GP1BB*, *GP9*, *ITGA2B* et *ITGB3*.

I. Physiologie de l'hémostase

L'hémostase désigne l'ensemble des mécanismes permettant l'arrêt du saignement, et aboutit à la formation d'un thrombus localisé à l'endroit de la brèche vasculaire. Elle repose sur un équilibre délicat entre facteurs pro-coagulants et anticoagulants. Elle se déroule en trois phases :

- L'hémostase primaire : formation du clou plaquettaire, ou thrombus blanc,
- La coagulation : renforcement et formation du thrombus rouge,
- La fibrinolyse : limitation du caillot à l'endroit de la blessure vasculaire.

A) Hémostase primaire

La première étape de l'hémostase met en jeu principalement l'endothélium vasculaire, le facteur von Willebrand (VWF) et les plaquettes.

1. Endothélium

Il agit comme une barrière physique, séparant les composants hémostatiques circulants dans le sang et le sous-endothélium qui renferme des molécules procoagulantes. Les cellules endothéliales modulent également le tonus vasculaire et la perméabilité, et produisent des inhibiteurs de l'agrégation plaquettaire (tels que le monoxyde d'azote (NO), la prostacycline) et des anticoagulants (thrombomoduline, héparane sulfate)(1)

2. Facteur Willebrand

Le facteur von Willebrand est une glycoprotéine présente sous forme circulante dans le plasma et également au niveau de la matrice du sous-endothélium (2). Il est produit par l'endothélium et les mégacaryocytes, et stocké dans les granules α plaquettaires et les corps de Weibel Palades dans les cellules endothéliales (2,3). Il est constitué de plusieurs multimères de taille variable, liés entre eux par des ponts disulfure. Au repos il circule sous forme repliée; il se déploie sous l'effet des forces de cisaillement du flux vasculaire, ce qui lui permet de faire la liaison entre les plaquettes et le sous-endothélium. Sa clearance est assurée par l'enzyme ADAMTS13, celle-ci permet la régulation de son activité proagrégante en clivant les multimères de haut poids moléculaire (2). Enfin le facteur Willebrand a également un rôle important de protection du facteur VIII dans la circulation sanguine, en empêchant sa dégradation (3).

3. Plaquettes

Les plaquettes sont des cellules discoïdes anucléées, et sont produites par les mégacaryocytes. Elles renferment notamment des granules qui ont un rôle primordial dans le déroulement de l'hémostase. La membrane plaquettaire est essentielle également puisqu'elle offre un support pour les réactions d'hémostase primaire et de coagulation. Leur numération dans le sang périphérique est normalement comprise entre 150 et 450 G/L, et on voit apparaître des altérations de l'hémostase généralement en dessous du seuil de 80 G/L.(1) La structure détaillée des plaquettes sera traitée dans le chapitre qui y est consacré (cf II.)

L'hémostase primaire repose sur des interactions dynamiques entre endothélium, protéines plasmatiques et plaquettes, et se déroule en plusieurs étapes : adhésion, activation et agrégation.

- Adhésion

Dans le compartiment vasculaire, le flux de sang est laminaire, ce qui crée des forces de cisaillement – *shear stress* – au niveau des parois de l'endothélium. Physiologiquement l'endothélium intact empêche toute interaction entre le facteur Willebrand sous-endothélial et les plaquettes.

Cependant lors d'une lésion vasculaire et sous l'effet du *shear stress*, cela entraîne à la fois l'exposition du vWF sous-endothélial, et un changement de conformation dévoilant les sites de liaisons aux glycoprotéines de surface plaquettaires, notamment la GpIb α . Ainsi le vWF assure un premier contact entre les plaquettes et le sous-endothélium, dit *rolling*, mais cette liaison est de faible affinité et nécessite d'être renforcée. S'ensuivent alors des liaisons entre le collagène tissulaire et les glycoprotéines plaquettaires (GpIa-IIa principalement, et GpIV), ce qui permet une stabilisation de l'interaction entre les plaquettes et le sous-endothélium. Cette étape va marquer le début de l'activation plaquettaire.

- Activation

L'activation est provoquée par la liaison d'agonistes à leurs récepteurs à la surface des plaquettes (thrombine, thromboxane A₂, ADP, collagène) ce qui induit une transduction de signaux intracellulaires. Lors de l'activation on observe donc :

- Un changement structurel des plaquettes avec formation de pseudopodes,
- Une élévation du calcium intracytoplasmique,
- La sécrétion du contenu des granules plaquettaires, qui est calcium-dépendante,
- Un réarrangement des phospholipides de membrane plaquettaire – *flip-flop* – afin d'exposer à la surface les phospholipides chargés négativement, en particulier la phosphatidylsérine. Ceci va former une surface procoagulante

qui favorise l'assemblage des complexes enzymes – cofacteurs de la coagulation.

- Un changement de conformation de la GpIIb-IIIa (intégrine $\alpha\text{IIb}\beta 3$), glycoprotéine majeure de l'agrégation plaquettaire.

- Agrégation

La GpIIb-IIIa dans sa conformation ouverte se lie au fibrinogène, qui va assurer l'intermédiaire entre deux plaquettes. Ainsi d'autres plaquettes adhèrent aux plaquettes qui sont déjà fixées au sous-endothélium. Les plaquettes nouvellement recrutées s'activent à leur tour, et sécrètent le contenu de leurs granules.

Ceci aboutit à la formation du clou plaquettaire, qui sera consolidé en parallèle par le processus de coagulation.

B) Coagulation

La coagulation est constituée d'un engrenage complexe de réactions, et résulte en la conversion du fibrinogène soluble en brins de fibrine insoluble. Elle est médiée par l'action d'une série de sérine protéases et de leurs cofacteurs interagissant sur une surface phospholipidique (membrane plaquettaire, endothélium endommagé) pour former un caillot de fibrine stable.(1)

1. Facteurs de la coagulation

La plupart des facteurs de la coagulation sont synthétisés par le foie et peuvent exercer un rôle pro-coagulant ou anti-coagulant (Tableau 1) (4)

Clotting factor	Mean plasma concentration (nM) [1]	Biological half-life [9,10]
Fibrinogen	7600	2–4 days
FII	1400	3 days
FVII	10	3–6 h
FX	170	40 h
FIX	90	18 h
FVIII	0.8	8–12 h
FV	20	36 h
FXI	30	80 h
FXII	380	50–70 h
Plasma Kallikrein	490	35 h
AT III	2300	
Protein C	60	
Protein S	300	

Tableau 1 : Concentrations plasmatiques et demi-vies des principaux facteurs de la coagulation, d'après Winter et al (4).

Certains de ces facteurs doivent subir des modifications post traductionnelles afin de devenir fonctionnels, c'est le cas notamment des facteurs vitamine K dépendants (facteurs II, VII, IX et X). La γ -carboxylation des résidus acide glutamique de ces facteurs – réaction ayant pour cofacteur la vitamine K – les rend aptes ensuite à intégrer la cascade de la coagulation. De ce fait toute modification du métabolisme de la vitamine K a pour conséquence de rompre l'équilibre de la coagulation, et peut engendrer des complications hémorragiques.

Le fibrinogène est une protéine essentielle de la coagulation, produit par le foie il est le précurseur de la fibrine qui assure la stabilité du thrombus (3). Il joue un rôle majeur également dans plusieurs processus physiopathologiques dans l'organisme, notamment l'inflammation, l'athérosclérose, la thrombose (5).

2. Cascade de la coagulation

L'ancien concept de la cascade de la coagulation distingue deux voies : la voie extrinsèque (initiée par le facteur tissulaire) et la voie intrinsèque (activée par les facteurs de la phase contact), les deux convergeant vers la voie finale commune (Figure 1 : Représentation simplifiée de la cascade de la coagulation, d'après Figure 1). Ce concept est pratique pour comprendre les

tests d'exploration de la coagulation *in vitro*, dans un but diagnostique, mais il est inadapté *in vivo* car il omet, entre autres, le rôle central des surfaces cellulaires.

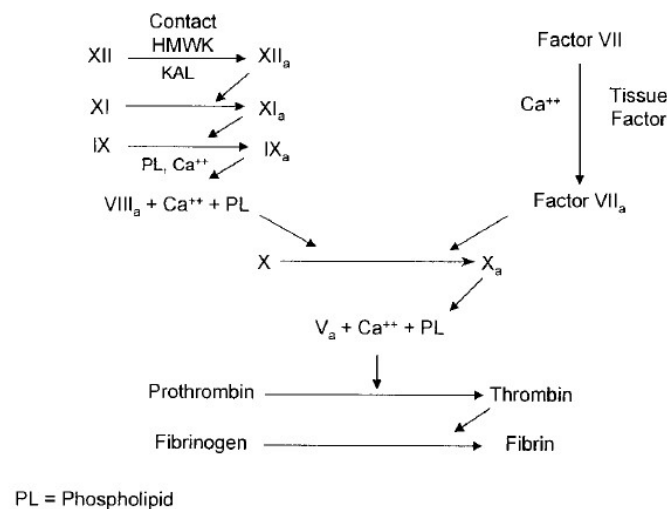


Figure 1 : Représentation simplifiée de la cascade de la coagulation, d'après Triplett DA (6)

Dans le concept actuel de la coagulation, la voie intrinsèque n'est plus considérée comme une voie parallèle mais en fait augmente la génération de thrombine initiée par la voie extrinsèque(6). Le déroulement de la coagulation se fait en plusieurs étapes :

- Initiation :

La brèche vasculaire engendre l'exposition du facteur tissulaire, il est le point de départ de la réaction de coagulation. Il est exprimé constitutivement à la surface des fibroblastes, et à la surface des cellules lorsqu'elles sont endommagées ou stimulées.(1) Il se lie au facteur VIIa, formant un complexe qui va permettre l'activation du facteur IX en IXa et du facteur X en Xa.

- Propagation :

Le facteur Xa s'associe au Va pour former le complexe prothrombinase, et ainsi permettre la transformation de la prothrombine en thrombine. La génération de thrombine à ce stade est insuffisante pour assurer l'hémostase, en effet elle peut être inhibée par le TFPI (Tissue Factor Pathway Inhibitor) qui va inactiver le complexe facteur tissulaire –VIIa.

- Amplification :

La thrombine exerce un rétrocontrôle positif sur sa propre production via plusieurs boucles d'amplification. Elle va activer les facteurs V et VIII. Le facteur VIIIa s'associe au IXa pour

former le complexe Tenase, qui transforme le facteur X en Xa. Le Xa associé au Va et aux phospholipides de membrane plaquettaire – reliés grâce aux ions Ca^{2+} – forment le complexe prothrombinase qui va déclencher la génération de thrombine en continu et en quantité très importante, cette étape est aussi appelée « *thrombin burst* ».(1)

La thrombine a plusieurs actions :

- Hydrolyse du fibrinogène soluble en fibrine insoluble
 - Activation du facteur XIII en XIIIa, qui a pour rôle de créer des liaisons covalentes entre les monomères de fibrine.
 - Feedback positif par activation des facteurs XI, V et VIII.
- Stabilisation

Le facteur XIIIa lie de façon covalente les polymères de fibrine, et la thrombine active le TAFI (Thrombin Activatable Fibrinolysis Inhibitor) qui va protéger le caillot de la fibrinolyse.

L'ensemble de ces mécanismes repose sur un équilibre entre processus hémorragiques et thrombotiques. Afin de maintenir cet équilibre il existe plusieurs facteurs anticoagulants qui sont produits physiologiquement par l'organisme.

3. Anticoagulants naturellement produits par l'organisme

- Antithrombine : elle appartient à la famille des sérines protéases et est le principal inhibiteur de la thrombine. Elle se lie et inactive la thrombine, et les facteurs IXa, Xa, XIa et XIIa.(3,7) Son activité enzymatique est augmentée en présence d'héparine.
- TFPI : il agit sur la voie extrinsèque en inhibant le complexe facteur tissulaire – VIIa.
- Protéine C : activée par la thrombine en PCa, qui va ensuite inhiber les facteurs Va et VIIIa en présence de protéine S et de phospholipides.
- PZI (protein Z dependant protease inhibitor) : son rôle physiologique est discuté, il inhiberait le facteur Xa en présence de protéine Z et de calcium.(8)

- Thrombomoduline : récepteur transmembranaire sur les cellules endothéliales, il a pour rôle d'empêcher la formation d'un caillot sur l'endothélium intact en se liant à la thrombine (1,3,7).

C) Fibrinolyse

Il s'agit d'un système parallèle permettant de limiter la taille du caillot, et de préparer la réparation tissulaire. Elle est assurée par la plasmine, qui est produite à partir du plasminogène après clivage par le tPA (tissue Plasminogen Activator) et l'uPA (urokinase Plasminogen Activator). La plasmine va ensuite dégrader à la fois le fibrinogène et la fibrine, et dissoudre le caillot de fibrine (Figure 2). L'activité fibrinolytique peut être mesurée in vitro par les PDF (Produits de Dégradation du fibrinogène et de la Fibrine), et par les D-dimères qui sont des marqueurs spécifiques de fibrinolyse.

Une fibrinolyse excessive conduit à une consommation du fibrinogène et à un risque hémorragique. Il existe donc des moyens physiologiques de limitation de l'activité fibrinolytique :

- PAI-1 (Plasminogen Activator Inhibitor) : il est le principal inhibiteur physiologique de la fibrinolyse, il inactive le tPA et l'uPA de façon irréversible.
- TAFI : il est activé par la thrombine, et va diminuer l'affinité du plasminogène pour la fibrine.
- Les inhibiteurs de plasmine : l' α_2 -antiplasmine et l' α_2 -macroglobuline.(7)

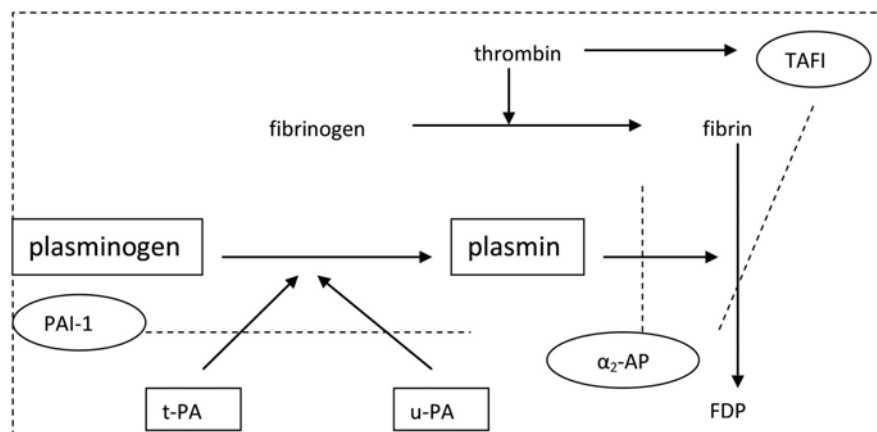


Figure 2 : le système de la fibrinolyse, d'après Ejiofor et al.(7)

Ainsi les mécanismes de l'hémostase reposent sur un équilibre finement régulé, et l'absence ou le dysfonctionnement de l'un des acteurs peut être à l'origine soit d'une pathologie hémorragique soit d'une maladie thromboembolique.

II. Les plaquettes

Ce sont les plus petites cellules sanguines, elles jouent un rôle non seulement dans l'hémostase et la thrombose mais aussi dans d'autres processus physiopathologiques tels que l'inflammation, l'athérogénèse, les défenses antimicrobiennes, la croissance tumorale et la formation de métastases.(9)

A) Mégacaryopoïèse et production des plaquettes

Les mégacaryocytes sont les précurseurs des plaquettes, ils sont retrouvés au niveau de la moelle osseuse, et chez le fœtus ils sont aussi présents dans le foie et la rate (10).

La production des plaquettes peut être divisée en 2 phases:

- La mégacaryopoïèse, une première phase où ont lieu la maturation et le développement des mégacaryocytes. Cette phase dure plusieurs jours (10). Les mégacaryocytes deviennent polyploïdes via le processus d'endomitose, c'est-à-dire une réplication d'ADN sans division cellulaire, et ce phénomène est régulé par la TPO (thrombopoïétine), facteur de croissance plaquettaire.

La polyplœidisation aurait pour but de permettre aux mégacaryocytes de produire de grandes quantités d'ARNm et de protéines pour les fournir aux plaquettes, ainsi que des lipides pour permettre la formation du système membranaire interne (IMS), un complexe de citernes et de tubules en continuum avec la membrane plasmique plaquettaire, et à l'origine de la membrane des proplaquettes et des plaquettes (10).

- La seconde phase, de production et relargage des plaquettes dans la circulation, est relativement rapide, elle dure quelques heures. Les mégacaryocytes matures vont donner des extensions cytoplasmiques appelées proplaquettes au niveau des vaisseaux sinusoides de la moelle osseuse. Les proplaquettes se scindent pour donner les préplaquettes, qui subissent ensuite une fission pour générer les plaquettes, de forme discoïde, et les libérer dans la circulation (Figure 3) (10).

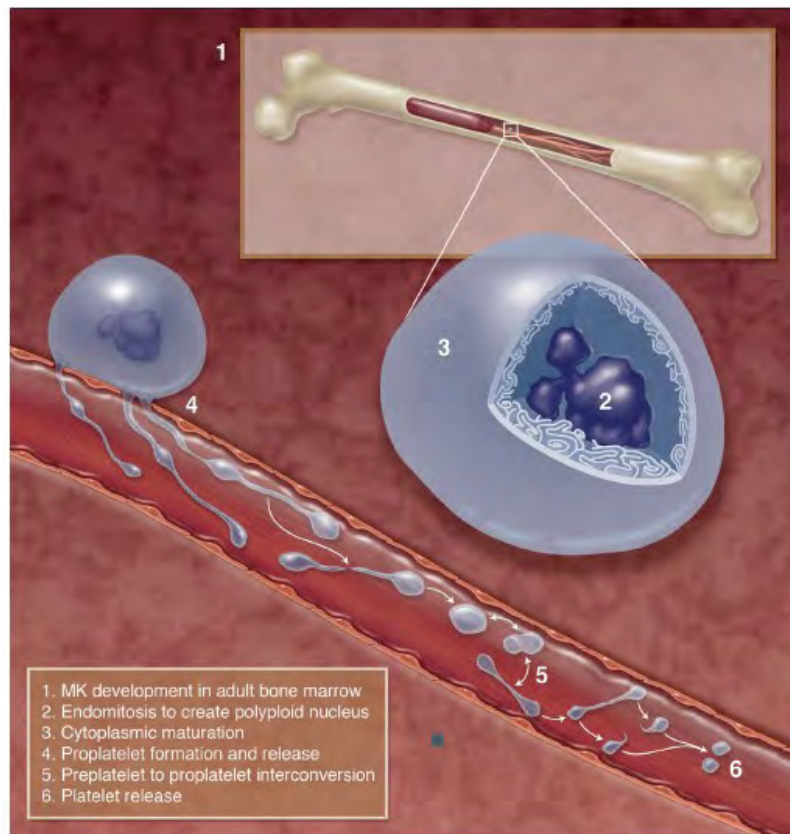


Figure 3 : Mégacaryopoïèse et production des plaquettes, d'après Machlus et al. (10)

Un facteur majeur intervenant pour la production des plaquettes est le cytosquelette, en effet le remodelage des filaments d'actine va permettre la formation des extensions cytoplasmiques au sein des mégacaryocytes – qui par la suite vont donner les précurseurs des plaquettes. La durée de vie d'une plaquette est de 7 à 10 jours en moyenne (10).

B) Structure globale

Les plaquettes ont un diamètre moyen de 2 à 5 μm , et un volume moyen d'environ 6-10 fL. Leur structure peut être décomposée de la façon suivante : zone périphérique – cytoplasme – organites – systèmes membranaires (Figure 4).

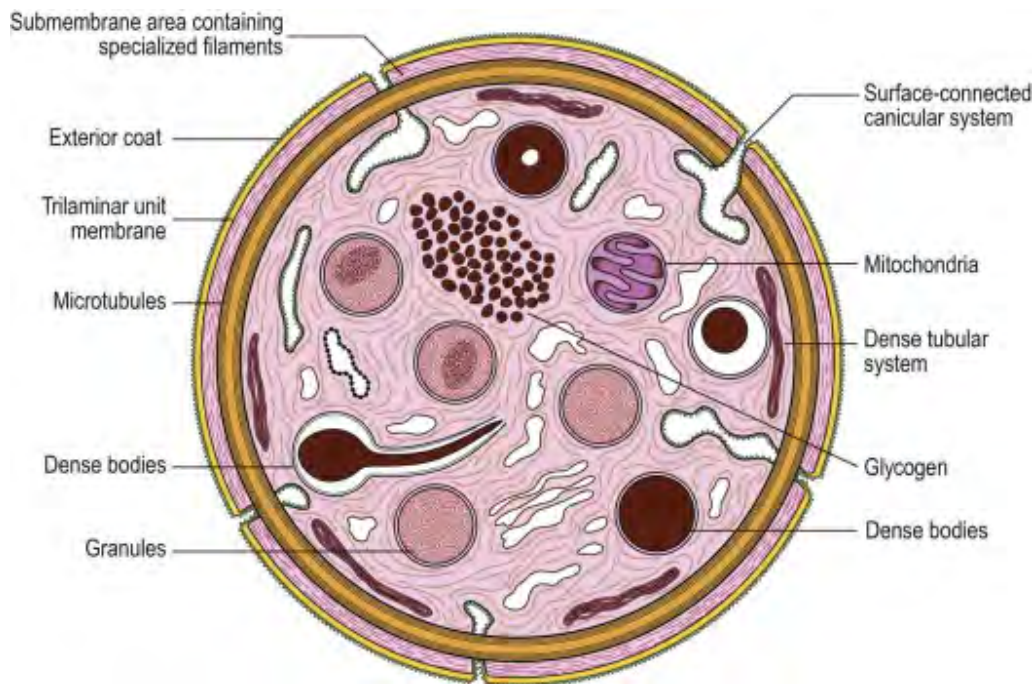


Figure 4 : Ultrastructure plaquettaire, d'après White (11)

1. Zone périphérique

Il s'agit de la membrane plaquettaire, elle comprend des ouvertures pour le système canaliculaire ouvert, et se compose des éléments suivants :

- Glycocalyx : il comprend des glycoprotéines indispensables à l'interaction entre plaquettes et structures sous-endothéliales au sein du vaisseau endommagé. On y retrouve notamment le complexe GpIb-IX-V et l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta 3$ qui sont les acteurs majeurs des processus d'activation – adhésion – agrégation plaquettaire.
- Bicouche lipidique : elle est incompressible et non étirable. Elle joue un rôle important pour la coagulation car elle contient du facteur tissulaire, qui est exposé à la surface sous sa forme inactive dans les plaquettes au repos. Lors de l'activation

plaquettaire, des phospholipides chargés négativement (en particulier la phosphatidylsérine) vont se retrouver exposés. Puis dans un deuxième temps les plaquettes vont relarguer des microparticules qui vont participer à la coagulation.

- Zone sous-membranaire : elle contient les systèmes de filaments d'actine (cytosquelette contractile) qui sont nécessaires au changement de forme de la plaquette lors de son activation, et nécessaires à la translocation de récepteurs et particules à la surface plaquettaire(9). Elle contient aussi les domaines cytoplasmiques de tous les récepteurs transmembranaires, qui régulent la signalisation nécessaire à l'activation plaquettaire.

2. Cytoplasme

Cette matrice transparente et visqueuse contient les microfilaments et les microtubules, les vésicules, les organites. Les microtubules sont organisés de façon circonférentielle formant un système de soutien pour le cytosquelette contractile membranaire. Les microtubules seraient nécessaires pour le maintien de la forme discoïde des plaquettes (9). Lors de l'activation plaquettaire le système du cytosquelette d'actine se contracte, et les microtubules amènent les granules alpha et les granules denses à la surface, ce qui aboutit à la sécrétion de leur contenu via le système canaliculaire ouvert.

3. Organites

On retrouve trois types majeurs d'organites sécrétoires : les granules alpha, les granules denses et les lysosomes. On retrouve également des mitochondries qui vont assurer le métabolisme énergétique.

- Granules α : ils sont de forme ronde à ovale, et au nombre de 50 à 80 par plaquette humaine. Au repos les granules α sont séparés les uns des autres par le cytosquelette d'actine. Ils contiennent à la fois des protéines qui ont été synthétisées par le mégacaryocyte (facteur V, thrombospondine, P-sélectine, VWF) et des protéines extracellulaires qui ont été ensuite internalisées par les plaquettes (fibrinogène).(9)

- Granules denses : on en décompte 3 à 8 par plaquette, ils sont plus petits que les granules α , et présentent une grande variabilité morphologique. Ils apparaissent opaques en microscopie électronique – d'où leur appellation – et contiennent de l'ATP, de l'ADP, du pyrophosphate, de la sérotonine, du calcium et du magnésium(9).
- Lysosomes : ils contiennent des hydrolases, leur rôle exact est inconnu.
- Mitochondries : elles subviennent aux besoins énergétiques des plaquettes, sont pourvoyeuses de calcium. Cependant la source majeure de calcium serait celui du système tubulaire dense et le calcium extracellulaire(12).

4. Systèmes membranaires

Les systèmes membranaires dans les plaquettes humaines contiennent les appareils de Golgi, le système canaliculaire ouvert (connecté à la surface membranaire), le système tubulaire dense et le réticulum endoplasmique granuleux.

- Système canaliculaire ouvert : c'est une partie de la membrane plaquettaire qui s'étend vers l'intérieur et forme une structure tubulaire, qui a plusieurs fonctions majeures :
 - Transport de composés plasmatiques vers les granules α (par exemple le fibrinogène)
 - Les chaînes du système canaliculaire ouvert peuvent s'étendre vers l'extérieur et donc fournir les parties de membrane nécessaires à l'expansion plaquettaire avec la formation des pseudopodes, ce qui permet une augmentation de la surface plaquettaire (9).
- Système tubulaire dense : il s'agit en fait d'un reliquat du réticulum endoplasmique lisse du mégacaryocyte (9), constitué de canaux dispersés dans le cytoplasme, qui contiennent une substance amorphe qui les fait apparaître opaques en microscopie électronique.

C) Granules plaquettaires

1. Contenu des granules

Les granules α contiennent des protéines transmembranaires et des protéines solubles, qui sont impliquées dans divers processus : adhésion cellulaire, coagulation, inflammation, croissance cellulaire et défenses contre les infections (Tableau 2). Lors de l'activation plaquettaire avec la sécrétion des granules, les protéines transmembranaires sont exprimées à la surface de la plaquette, tandis que les protéines solubles sont relarguées dans le compartiment extracellulaire. La plupart des protéines transmembranaires sont déjà exprimées en surface des plaquettes au repos, mais lors de l'activation leur expression est augmentée grâce à la sécrétion des granules. C'est le cas notamment des protéines impliquées dans l'adhésion et l'agrégation plaquettaire (GPIb-IX-V ; GpVI, FcR, intégrine α IIb β 3)(9). Cependant certaines protéines granulaires ne sont exprimées qu'à la surface des plaquettes activées, telle que la P-sélectine (13). Plus de 300 protéines solubles sont relarguées lors de la sécrétion des granules α .

Protéines transmembranaires	α IIb β 3, GPIb-IX-V, GPVI, P-sélectine
Facteurs pro et anticoagulants	Facteurs V, IX, XIII, antithrombine, protéine S, TFPI, plasminogène, α 2-macroglobuline
Protéines d'adhésion	Fibrinogène, VWF, thrombospondine
Chémokines	CXCL1 (GRO- α), CXCL4 (PF4), CXCL5 (ENA-78), CXCL8 (IL8), CCL2 (MCP-1), CCL3 (MIP-1 α), CCL5(RANTES)
Facteurs de croissance	Epidermal growth factor, hepatocyte growth factor, insulin-like growth factor, transforming growth factor β
Facteurs pro et antiangiogéniques	Vascular endothelium growth factor, fibroblast growth factor, platelet-derived growth factor, angiostatine, endostatine
Protéines microbicides	Thymosine- β 4, thrombocidines 1 et 2
Médiateurs de l'immunité	Précurseurs des fractions C3 et C4 du complément, Immunoglobulines

Tableau 2 : Contenu des granules α , d'après Flaumenhaft(14)

Les granules denses contiennent de hautes concentrations en ATP, ADP, calcium, potassium, des amines vasoactives telles que la sérotonine et l'histamine, du pyrophosphate (Tableau 3).

Cations	Calcium, magnésium, potassium
Phosphates	Pyrophosphate, polyphosphate
Amines bioactives	Sérotonine, histamine
Nucléotides	ADP, ATP, UTP, GTP

Tableau 3 : Contenu des granules denses, d'après Flaumenhaft(14)

2. Mécanismes de la sécrétion des granules

On observe tout d'abord une confluence des granules entre eux, puis une fusion avec le système canaliculaire ouvert. Ceci entraîne le relargage de leur contenu dans les canaux puis finalement dans le milieu extracellulaire. Un autre mécanisme de la sécrétion est la fusion directe des granules avec la membrane plaquettaire.

La capacité de la membrane à pouvoir fusionner est influencée par sa composition en phospholipides. Le cytosquelette joue aussi un rôle dans la sécrétion des granules, au repos les filaments d'actine inhibent la sécrétion des granules α et granules denses, mais à l'inverse lorsque la plaquette est activée le cytosquelette va avoir une action favorisante, et c'est la vague calcique qui va déclencher la sécrétion des granules (9).

3. Fonctions de la sécrétion

La sécrétion des granules plaquettaires est impliquée dans l'hémostase, la thrombose, l'inflammation, l'athérogénèse, les défenses anti-infectieuses et l'oncogénèse.

La sécrétion des granules α favorise l'adhésion plaquettaire, les interactions entre les plaquettes et le sous-endothélium et les interactions des plaquettes entre elles, via le relargage de fibrinogène et de VWF, et l'expression membranaire de la GpVI, du complexe GpIb-IX-V et de l'intégrine $\alpha IIb\beta 3$. Elle est aussi impliquée dans la coagulation, via le relargage de facteur V et IX. Elle participe au maintien de l'équilibre de l'hémostase, en

sécrétant des protéines qui limitent la coagulation : protéine S, TFPI(9). Leur rôle est primordial dans l'hémostase, ceci est confirmé par la tendance aux saignements que l'on peut observer chez les patients porteurs du syndrome des plaquettes grises, qui est caractérisé par un défaut de formation des granules α (15).

Les granules denses sont une source primaire d'ADP, puissant agoniste des plaquettes; de sérotonine, qui favorise l'agrégation plaquettaire et le tonus vasculaire; et enfin de calcium qui est le déclencheur de la coagulation (9).

Les deux types de granules sont impliqués dans l'inflammation, les granules α fournissent des récepteurs de membrane plaquettaires qui permettent les interactions avec les leucocytes et les cellules endothéliales, et le recrutement cellulaire. Elles apportent également des facteurs pro-inflammatoires et immunomodulateurs, aussi elles jouent un rôle dans l'athérosclérose du fait de leur action pro-inflammatoire(9). Les granules denses initient la génération de bradykinine qui augmente la perméabilité vasculaire et la formation d'œdèmes.

Pour ce qui concerne leur fonction dans les défenses antimicrobiennes, les granules α sécrètent des chimiokines (CXCL4, CCL5, CXCL7) ainsi que des protéines du complément(14).

Enfin les granules α sécrètent des facteurs proangiogéniques (14) : VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), PDGF (Platelet-Derived Growth Factor), FGF (Fibroblast Growth Factor), Insulin-like Growth Factor qui sont impliqués dans les mécanismes de croissance tumorale, la formation des métastases, la cicatrisation.

D) Glycoprotéines de surface

Les glycoprotéines de surface plaquettaires sont de nombreux types, mais les plus importantes sont le complexe GpIb-IX-V, la GpVI et l'intégrine α IIb β 3, qui sont les acteurs majeurs de l'adhésion plaquettaire, l'activation et l'agrégation.

1. Complexe GpIb-IX-V

Ce complexe est constitué de quatre sous-unités : GpIb α , GpIb β , GpIX et GpV assemblées selon un ratio (2:4:2:1) respectivement. La GpIb α est liée à deux sous-unités GpIb β par un pont disulfure ; la GpIX et la GpV sont associées au complexe par le biais de liaisons non covalentes (16). Chaque sous-unité comporte différents domaines riches en leucine (LRR), une partie transmembranaire et un domaine cytoplasmique (Figure 5).

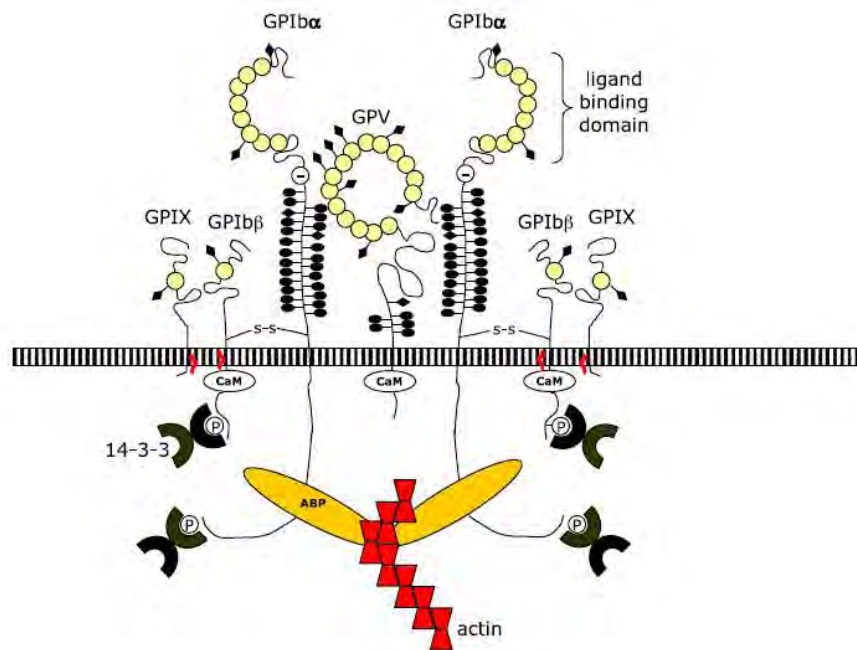


Figure 5 : Structure du complexe GpIb-IX-V, d'après Canobbio et al.(17)

Ce complexe a plusieurs fonctions :

- Il permet l'adhésion des plaquettes au sous-endothélium du vaisseau endommagé. Ses ligands sont en premier lieu le VWF, mais on retrouve également la thrombospondine et la P-sélectine(9). Il peut se lier également aux intégrines à la surface des leucocytes, de ce fait il joue un rôle non seulement dans la thrombose mais aussi dans l'inflammation (16).
- Il intervient dans la voie intrinsèque de la coagulation, en se fixant à certains facteurs de la coagulation : thrombine, facteur XI, KHPM(9,16).
- Lors de la liaison du VWF, il va générer un signal qui aboutit à l'activation et au changement de conformation de l'intégrine α IIb β 3 (9).

- Il participe au maintien de la forme plaquettaire en reliant la membrane au cytosquelette, le domaine intracytoplasmique de la GpIb α étant relié au réseau de filaments d'actine (16).

2. Gp VI

La GpVI appartient à la superfamille des immunoglobulines, on en retrouve environ 3700 par plaquette. Elle est constituée de deux domaines extracellulaires D1 et D2 connectés par une liaison peptidique, et liés au domaine transmembranaire via une chaîne glycosylée. Elle forme un complexe avec le récepteur de la fraction constante des Immunoglobulines (FcR γ), via des liaisons non covalentes (Figure 6). Elle existe sous forme de monomères ou de dimères, sachant que les dimères ont une affinité beaucoup plus importante pour le collagène, et que la liaison au collagène entraîne la dimérisation des autres GpVI (9).

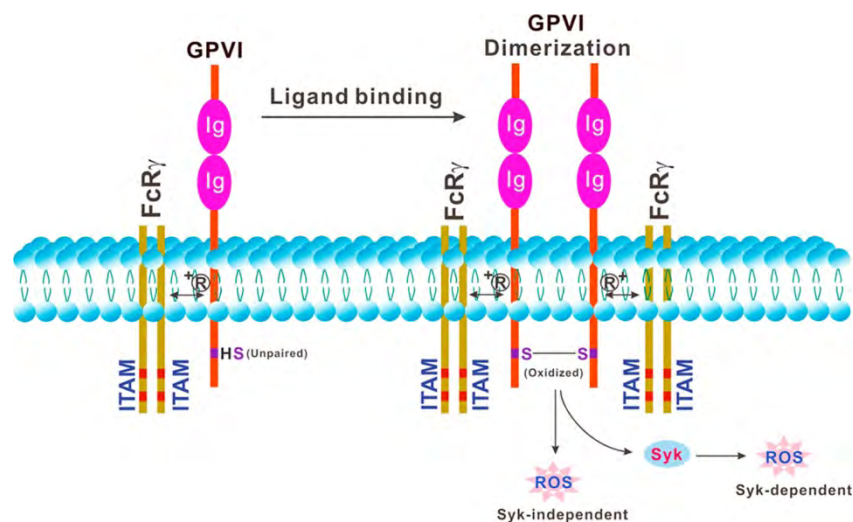


Figure 6 : Structure de la Gp VI, d'après Qiao et al.(18)

La fixation au collagène engendre des signaux intracellulaires, ce qui entraîne l'activation de $\alpha 2\beta 1$ et $\alpha IIb\beta 3$, et la dimérisation des GpVI, renforçant et stabilisant l'adhésion plaquettaire (9).

3. Intégrine $\alpha IIb\beta 3$

Cette glycoprotéine (aussi appelée la GpIIb-IIIa) appartient à la famille des intégrines, elle est présente à la surface des plaquettes, des mégacaryocytes, des mastocytes, des basophiles et de certaines cellules tumorales(9). On en retrouve 80 000 à 100 000 par plaquette, et elle est

présente aussi dans les granules α (14). Il s'agit d'un hétérodimère constitué de deux sous-unités : α IIb et β 3. Chacune de ces sous-unités est constituée d'une chaîne glycosylée, et comprend un long domaine extracellulaire, un segment transmembranaire, et une courte queue cytoplasmique (Figure 7).

Au repos l'intégrine a une faible affinité pour le fibrinogène, mais lors de l'activation plaquettaire, elle change de conformation et se transforme en récepteur de forte affinité, afin de permettre l'agrégation plaquettaire.

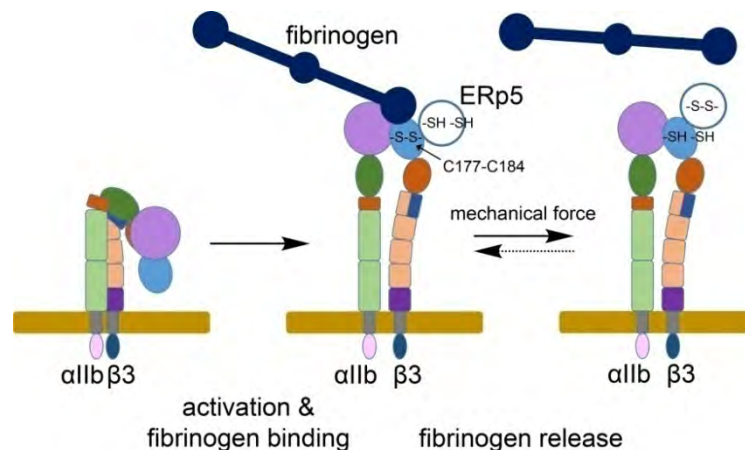


Figure 7 : structure et activation de l'intégrine α IIb β 3 d'après Passam et al.(19)

Lors de l'activation plaquettaire la liaison de plusieurs agonistes à leurs récepteurs à la surface des plaquettes entraîne la transduction de signaux intracellulaires. Ces signaux *inside-out* résultent en la transformation du domaine extracellulaire de l'intégrine α IIb β 3 en un récepteur de haute affinité pour le fibrinogène, ainsi que pour le VWF. Ceci rend possible les interactions plaquette-plaquette et donc l'agrégation plaquettaire. Aussi la liaison à d'autres ligands (vitronectine, fibronectine, thrombospondine-1) médie l'adhésion des plaquettes au sous-endothélium(9).

E) Voies d'activation des plaquettes

Il en existe plusieurs, mais les acteurs majeurs de l'activation plaquettaire sont la thrombine et l'ADP.

1. Thrombine

La thrombine est le plus puissant agoniste plaquettaire, et active les plaquettes via des récepteurs dits PAR (Protease-Activated Receptors). Ce sont des récepteurs couplés à une protéine G, comprenant sept domaines transmembranaires, ils sont au nombre de quatre (PAR-1, PAR-2, PAR-3 et PAR-4). Les principaux sont PAR-1 et PAR-4 ; PAR-2 n'est pas exprimé par les plaquettes, et PAR-3 agit comme cofacteur de la thrombine pour l'activation de PAR-4 (9). Le récepteur PAR-1 est sensible à de faibles concentrations de thrombine, tandis que PAR-4 agit uniquement en présence de fortes concentrations de thrombine.

2. ADP

Il agit comme agoniste de deux récepteurs couplés à une protéine G : P2Y₁ et P2Y₁₂ (protéines à sept domaines transmembranaires). L'activation de P2Y₁ est responsable du changement de forme des plaquettes, et la stimulation de P2Y₁₂ permet une amplification et une stabilisation de l'agrégation plaquettaire, qui devient alors irréversible. Il existe une interaction complexe entre P2Y₁ et P2Y₁₂, et la co-activation des deux récepteurs est nécessaire pour une agrégation complète (9).

III. Les glycoprotéines plaquettaires et leurs pathologies

Les glycoprotéines de surface plaquettaire jouent un rôle pivot dans l'hémostase primaire, et un déficit qualitatif ou quantitatif de ces glycoprotéines est à risque de provoquer une pathologie hémorragique. L'étude de la structure de ces glycoprotéines et des gènes qui les codent, a permis de mieux comprendre la physiopathologie des thrombopathies héréditaires, et également de les diagnostiquer plus aisément.

A) Complexe GpIb-IX-V

1. Structure détaillée

Le complexe GpIb-IX-V est composé de quatre sous unités transmembranaires : la GpIb α et la GpIb β qui sont liées via un pont disulfure, et la GpIX et la GpV qui sont liées de façon non covalente. Chaque sous unité appartient à la superfamille des protéines à domaine riche en leucine (LRR)(Figure 8).

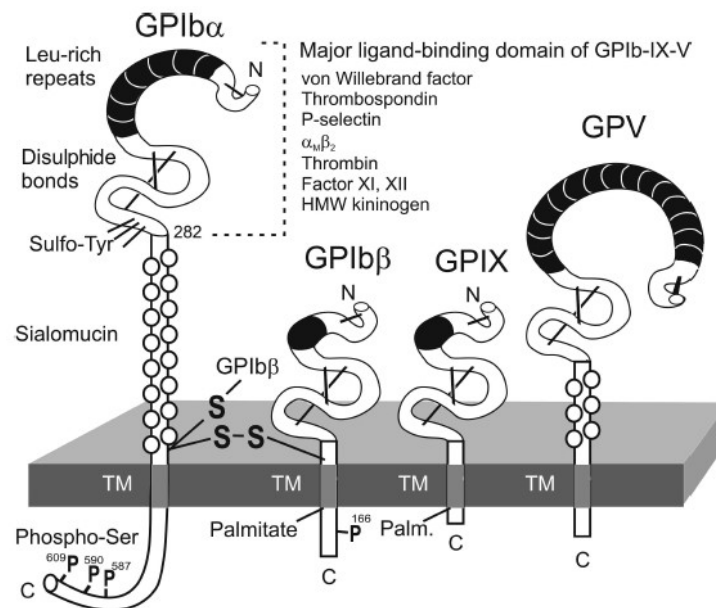


Figure 8 : structure de chaque sous-unité du complexe GpIb-IX-V, d'après Berndt(16)

La GpIb α , codée par le gène *GP1BA* (situé sur le chromosome 17p13.2), est constituée de 610 acides aminés, et a un poids moléculaire de 135 kDa ; son extrémité N-terminale est extracellulaire tandis que son extrémité C-terminale est cytoplasmique. Le domaine N-terminal (résidus 1 à 282) comprend huit domaines LRR disposés en tandem, où se trouvent les sites de liaisons aux ligands (17,20).

La portion comprenant les résidus 283 à 302 est riche en acides aminés chargés négativement ; cette région intervient dans les interactions avec les ligands extracellulaires. Entre les résidus 303 et 485 se trouve un domaine de type macroglycopeptide fortement glycosylé, connu pour être extrêmement polymorphe. Les résidus 486 à 514 constituent un unique segment transmembranaire, et enfin les résidus 515 à 610 forment la queue cytoplasmique, qui contient les domaines de liaison pour les protéines intracellulaires (17).

Une des régions principales de la GpIb α est celle comprenant le tandem de LRR au niveau N-terminal : l'intégrité de cette région est essentielle à la fonction du complexe GpIb-IX-V. En particulier les LRR 2 et 3 sont critiques pour la liaison du vWF et l'adhésion plaquettaire(17).

La GpIb β se compose de 181 acides aminés et a un poids moléculaire de 25 kDa, elle est codée par le gène *GP1BB* (chromosome 22q11.21)(20). Elle comprend un seul LRR sur sa partie N-terminale (résidus 1 à 118), une partie transmembranaire (résidus 123 à 147) et une queue cytoplasmique (résidus 148 à 181)(21). Elle assure une liaison covalente avec la GpIb α via un pont disulfure, ainsi que des interactions non covalentes avec la GpIX via les résidus 15 et 32(17).

La GpIX est constituée de 160 acides aminés comprenant un seul domaine LRR, avec un poids moléculaire de 22 kDa et est codée par le gène *GP9* (chromosome 3q21.3)(17,20).

La GpV, codée par le gène *GP5* (chromosome 3q29)(20), comprend 544 acides aminés pour un poids moléculaire de 82 kDa. Elle est structurée avec un domaine extracellulaire formé de 15 domaines LRR, un seul segment transmembranaire et une queue cytoplasmique. La GpV est reliée au complexe via une interaction directe avec la GpIb α . Elle joue un rôle en renforçant l'interaction du complexe avec le vWF en cas d'importantes forces de cisaillement. Elle lie également le collagène, et possède un site de liaison de haute affinité pour la thrombine(17).

2. Maladie de Bernard-Soulier

Le syndrome de Bernard-Soulier est une pathologie héréditaire, de transmission habituellement autosomique récessive, qui fut décrit pour la première fois en 1948, par deux hématologistes : Jean Bernard et Jean-Pierre Soulier (22). Il est caractérisé par une tendance hémorragique, des plaquettes géantes et une thrombopénie (16,23).

Cette pathologie résulte d'un déficit qualitatif ou quantitatif du complexe GpIb-IX-V, secondaire à des mutations retrouvées sur les gènes *GP1BA*, *GP1BB*, *GP9* mais jamais, à ce jour, sur le gène *GP5*.

Cliniquement, les symptômes apparaissent rapidement après la naissance ou au cours de la petite enfance, on retrouve essentiellement des saignements cutanéomuqueux.

Ils peuvent se manifester par un purpura, des épistaxis, des gingivorragies, des ménorragies, et plus rarement des saignements gastro-intestinaux, une hématurie. Parfois des épisodes d'hémorragies sévères peuvent survenir lors de traumatismes ou de chirurgies (amygdalectomie, appendicectomie, extraction dentaire). Il existe une grande variabilité inter-individuelle concernant la sévérité des saignements (23).

Cette pathologie fait partie du groupe hétérogène des thrombopénies constitutionnelles, qui sont très rares et donc parfois difficilement évoquées. Des analyses d'hémostase spécialisées sont nécessaires pour confirmer le diagnostic. En effet, du fait de sa rareté et comme souvent dans le cadre des thrombopénies constitutionnelles, le diagnostic de purpura thrombopénique immunologique est souvent évoqué en premier lieu (16,20), entraînant parfois un traitement inapproprié par corticoïdes voire splénectomie.

En premier lieu il convient de réaliser une numération formule sanguine avec examen du frottis sanguin. En ce qui concerne le syndrome de Bernard-Soulier, un caractère constant est la macrothrombopénie, les plaquettes sont de grande taille, voire géantes (pouvant dépasser la taille d'une hématie sur le frottis sanguin) et leur nombre est généralement compris entre 20 et 100 G/L. Un comptage manuel est préférable car les plaquettes peuvent être confondues avec des hématies ou des leucocytes par les automates de numération(23).

Dans un second temps viennent les analyses spécialisées avec l'étude de l'agrégation plaquettaire, en utilisant différents agonistes. L'anomalie distinctive est un déficit isolé de l'agrégation plaquettaire à la ristocétine, tandis que l'agrégation avec d'autres agonistes tels que l'ADP ou le collagène est normale. Une agrégation diminuée en présence de thrombine peut être observée. Un tel profil d'agrégation plaquettaire peut aussi être retrouvé en cas de maladie de Willebrand sévère et il est indispensable d'éliminer ce diagnostic par des dosages spécifiques.

L'étude de l'expression des glycoprotéines à la surface plaquettaire par cytométrie en flux va confirmer le diagnostic, en objectivant une diminution voire une absence d'expression du complexe GpIb-IX-V (CD42)(23). Enfin, la recherche d'anomalies génétiques par séquençage des gènes *GP1BA*, *GP1BB* et *GP9* permet de préciser le variant de séquence en cause.

La physiopathologie de la maladie de Bernard Soulier peut être expliquée par le rôle du complexe GpIb-IX-V dans l'hémostase primaire. En effet un déficit quantitatif ou qualitatif de ce complexe va entraîner un défaut d'adhésion et d'activation plaquettaire. Par ailleurs le complexe GpIb-IX-V a également un rôle de maintien de la forme de la plaquette, assuré par la liaison de la GpIb α à la filamine A, protéine du cytosquelette plaquettaire. Dans la maladie de Bernard-Soulier l'absence d'interaction entre le complexe GpIb-IX-V et le cytosquelette est responsable de la taille anormalement grande des plaquettes (16,24). L'ensemble de ces anomalies permet d'expliquer, au moins en partie, la survenue et la persistance des saignements(16).

La prise en charge de la maladie de Bernard-Soulier repose essentiellement sur la prévention. Il est recommandé au patient d'éviter les situations à risque de traumatismes, les médicaments anti-plaquettaires tels que l'aspirine, et l'usage de contraception chez les jeunes femmes à partir de la puberté en cas de ménorragies. Le traitement et la prophylaxie des saignements péri-opératoires reposent en général sur la transfusion de concentrés plaquettaires.

Le diagnostic anténatal est possible en théorie mais non justifié car le syndrome de Bernard-Soulier donne rarement lieu à des saignements engageant le pronostic vital. Avec une prévention efficace, une qualité de vie quasiment normale peut être assurée. De plus les ponctions de sang de cordon et les ponctions amniotiques étant à fort risque de provoquer un avortement prématuré(23), le rapport bénéfice/risque n'est pas en faveur d'un dépistage anténatal.

3. Variants connus des gènes *GP1BA*, *GP1BB* et *GP9*

Les anomalies génétiques retrouvées sur les gènes *GP1BA*, *GP1BB* et *GP9* des patients atteints du Syndrome de Bernard-Soulier peuvent être de 3 types :

- Mutations faux-sens (ou courtes délétions sans décalage du cadre de lecture) qui donnent un complexe anormal, instable, non fonctionnel et dont l'expression est fortement diminuée,
- Mutations non-sens faisant apparaître un codon stop, et donnant des sous-unités raccourcies auxquelles il manque souvent le segment transmembranaire,

- Insertions/ délétions avec décalage du cadre de lecture donnant une nouvelle séquence polypeptidique et souvent un codon stop prématuré(23).

Récemment, une étude internationale a permis de mettre en place une base de données répertoriant les anomalies génétiques dans la maladie de Bernard-Soulier : l'International Consortium for the Study of Bernard-Soulier Syndrome. Cette étude menée par l'équipe de Savoia et al.(20) a consisté en un génotypage de 132 familles, ainsi que le recueil de données pour 79 familles qui étaient décrites dans la littérature. Ceci a permis de reporter 112 variants sur l'ensemble des 3 gènes, dont 22 nouvelles altérations. Toutes les données ont été déposées sur la base de données LOVD (Leiden Open Variation Database)(25–27).

Les investigateurs ont procédé au recueil de données chez les patients inclus dans l'étude: sexe, âge au diagnostic, histoire clinique, numération plaquettaire et mesure de leur taille moyenne, résultats des tests RIPA, et immunophénotypage plaquettaire. Il en ressort que presque 50% des patients de l'étude avaient été diagnostiqués à tort comme ayant un PTI, avec en conséquence un traitement inapproprié par corticoïdes, immunoglobulines polyvalentes par voie IV, voire une splénectomie (20). La symptomatologie hémorragique (évaluée par le score de l'OMS) retrouve une tendance à des saignements sévères plus particulièrement pour le groupe des patients *GP1BB* mutés (20). Aucune corrélation n'a été mise en évidence entre la sévérité de la thrombopénie et la mutation identifiée, de même pour la sévérité de la symptomatologie hémorragique.

Il a été décrit au total 45 variants du gène *GP1BA*, 39 variants du gène *GP1BB* et 28 variants du gène *GP9* (25–27). L'ensemble de ces mutations figure dans un tableau en Annexe 1.

Pour ce qui est du syndrome de Bernard-Soulier dans sa forme classique – biallélique – il a été relevé les observations suivantes :

- Les mutations non-sens et avec décalage du cadre de lecture au niveau du domaine transmembranaire vont générer des sous-unités instables qui ne peuvent pas s'assembler avec les autres sous-unités. D'autres mutations donnent lieu à une progression anormale des protéines lors de la sécrétion des granules plaquettaires. Celles situées au niveau du peptide signal donnent une conformation anormale, et

donc une mauvaise translocation des sous-unités à travers le reticulum endoplasmique ou un mauvais clivage du peptide signal, ce qui empêche l'externalisation à la membrane.

- Certaines microdélétions ou mutations affectant la transcription touchent le site de liaison de GATA-1 (facteur de transcription) et empêchent l'activité du promoteur de *GP1BB*.
- Enfin l'effet des mutations faux-sens est plus difficile à prévoir : parfois elles aboutissent à la formation d'un complexe qui est stable mais retenu dans le reticulum endoplasmique ce qui empêche son expression à la surface plaquettaire, et parfois elles donnent des mutants stables et exprimés à la surface plaquettaire mais qui sont incapables de lier le vWF.

Cette étude a permis également de mettre en évidence des mutations à l'origine d'une forme de syndrome de Bernard-Soulier dite monoallélique, secondaire à la présence de variants pathologiques de *GP1BA* ou *GP1BB* présents à l'état hétérozygote.

4. Variants hétérozygotes

La maladie de Bernard-Soulier est classiquement de transmission autosomique récessive, ainsi seuls les patients porteurs de ces mutations à l'état homozygote ou double hétérozygote vont être atteints. Cependant dans la littérature on relève que certains variants sont responsables d'un phénotype atténué de la maladie lorsqu'ils sont présents à l'état hétérozygote, on parle alors de syndrome de Bernard-Soulier monoallélique, de transmission autosomique dominante. Cette forme de la pathologie est d'autant plus difficile à diagnostiquer que les patients sont peu symptomatiques, les paramètres biologiques sont variables, et le mode de transmission autosomique dominant n'oriente pas vers un syndrome de Bernard-Soulier en première intention. Ainsi, il est nécessaire d'attirer l'attention sur la présence de ces variants, ce afin d'éviter l'errance diagnostique. De plus la découverte de nouveaux variants devient de plus en plus fréquente avec l'avènement des techniques de biologie moléculaire, notamment l'usage du séquençage nouvelle génération (NGS).

A ce jour ont été décrits :

- 7 variants de *GP1BA* responsables d'un BSS monoallélique : **p.(Asn57His)**(28), **p.(Tyr70Asp)**(29), **p.(Leu73Phe)**(30), **p.(Ala172Val)**(31,32), **p.(Asp150Ser)**(33), **p.(Val31Leu)**(34), **p.(Leu59Arg)**(35);
- 11 variants de *GP1BB* responsables d'un BSS monoallélique : **p.(Arg42Cys)**(36), **p.(Met1*)**(21), **p.(Leu16Pro)**(21,37), **p.(Gly43Trp)**, **p.(Trp46*)**, **p.(Thr68Met)**, **p.(Pro79_Leu81del)**(21), **p.(Tyr113Cys)**(21,38,39), **p.(Leu132Gln)**, **p.(Ala150Arg_fs*43)**(21), **p.(Leu60Pro)**(40).

a. Variants hétérozygotes de GP1BA

Le premier variant responsable de macrothrombopénie à l'état hétérozygote a été décrit par Miller et al. en 1992 (30). Cette équipe rapporte le cas d'une substitution hétérozygote sur un résidu Leucine d'un domaine de LRR en tandem de Gplb α , la substitution **p.(Leu73Phe)**. Les individus affectés présentaient une tendance hémorragique modérée, une thrombopénie, un volume plaquettaire augmenté. L'agrégation plaquettaire à la ristocétine était diminuée ce qui supposait une structure altérée du complexe glycoprotéique. L'équipe en a déduit que les domaines LRR pouvaient avoir un rôle important, et que la perturbation d'un LRR sur Gplb α pourrait altérer l'interaction avec d'autres composants du complexe et/ou la liaison du vWF.

Un autre variant, le variant responsable de la substitution **p.(Ala172Val)** a été décrit par Savoia et al. en Italie en 2001(31). Cette étude a recruté 12 familles présentant une macrothrombopénie transmise selon un mode autosomique dominant, avec une symptomatologie hémorragique modérée, une thrombopénie découverte fortuitement, et chez qui les investigateurs ont réalisé un screening de mutations et une étude des glycoprotéines plaquettaires par cytométrie en flux. Tous les patients avaient des plaquettes de taille augmentée, 29 patients sur 34 présentaient une thrombopénie (<150 G/L), et une enquête réalisée au sein de chaque famille a montré que la maladie était transmise selon un mode autosomique dominant. 22 patients avaient une symptomatologie hémorragique modérée, avec des épisodes fréquents d'épistaxis, gingivorragies, ménorragies, des

ecchymoses faciles, ou un saignement prolongé post chirurgie dentaire. 6 patients ont eu un myélogramme qui a montré un nombre normal de mégacaryocytes. Le gène *GP1BA* a été séquencé chez 2 individus de 2 familles, et a permis d'identifier une transition **c.515 C>T** chez les 2 patients. Ce variant, le variant Bolzano avait déjà été décrit dans le syndrome de Bernard-Soulier sous forme biallélique par Ware et al.(41) en 1993 et est responsable d'une substitution **p.(Ala172Val)**. Ainsi Savoia et al. ont mis en évidence que cette mutation faux-sens sur *GP1BA* est responsable de la maladie chez 6 familles (sur 12). L'immunophénotypage plaquettaire en présence de deux différents anticorps anti-GpIb α (SZ2 et MB45) a montré un signal de fluorescence diminué chez les patients porteurs de la mutation. La liaison de SZ2 était plus diminuée que celle de MB45 chez les patients porteurs du variant Bolzano. SZ2 est un anticorps conformation-dépendant, il est dirigé contre un épitope N-terminal non reconnu si la protéine change de conformation. En revanche l'anticorps MB45 est moins sensible aux changements de conformation dus aux variants et est plus représentatif de la densité en glycoprotéines à la surface plaquettaire, même si ces dernières sont altérées. Devant ces résultats il est très probable que les plaquettes de ces patients présentent un déficit à la fois qualitatif et quantitatif en protéine GpIb α : elle est moins exprimée et est incapable de lier le vWF du fait d'un changement de conformation.

En 2012 Norris et al.(32)ont publié une étude prospective concernant ce variant, avec identification de 42 nouvelles familles et 103 cas de thrombopénie induite par le variant Bolzano à l'état hétérozygote. Cette étude a comporté une étude du polymorphisme du gène de la β 1 tubuline (*TUBB1*), une évaluation des signes hémorragiques par le score de l'OMS, une mesure des diamètres plaquettaires par microscopie optique sur frottis sanguins (le diamètre plaquettaire moyen a été évalué sur une mesure de 200 plaquettes) une étude des glycoprotéines par CMF et un dosage de la thrombopoïétine (TPO). Ces paramètres ont été comparés à ceux d'une population de témoins sains. Un screening de 216 patients présentant une macrothrombopénie autosomique dominante a été réalisé, ce qui a permis d'identifier 42 propositus porteurs de la mutation Bolzano et une enquête familiale a permis de retrouver 61 individus supplémentaires. Tous avaient une numération plaquettaire diminuée, et à l'inverse elle était normale chez tous leurs proches qui ne portaient pas la mutation. En ce qui concerne l'aspect clinique, seuls 41,7% des patients présentaient des hémorragies récurrentes, spontanées. Les symptômes les plus fréquemment retrouvés

étaient les épistaxis, gingivorragies, ménorragies et ecchymoses faciles. Aucun patient n'a présenté de saignement anormal après une chirurgie ou une extraction dentaire. Aucune corrélation entre la tendance hémorragique et les paramètres biologiques étudiés n'a été mise en évidence. Quant à la numération plaquettaire, tous les sujets avec la mutation présentaient une thrombopénie, qui était en général modérée (en moyenne 81 G/L) et seuls 18 patients avaient des plaquettes <50 G/L. Cependant, il se peut que ces chiffres soient sous-estimés car la méthode de comptage utilisée (impédancemétrie) ne parvient pas toujours à reconnaître les macroplaquettes en pouvant compter celles-ci comme des hématies. Le diamètre plaquettaire moyen était de 50% supérieur à celui de contrôles sains, et le volume plaquettaire moyen était supérieur de 83% à celui des contrôles sains. L'étude fonctionnelle des plaquettes a montré que l'agrégation à l'ADP et au collagène était normale pour 23 patients évalués, et diminuée chez cinq patients en présence de ristocétine 1,5mg/mL. Un immunophénotypage plaquettaire a été réalisé chez 37 patients et a mis en évidence une expression significativement réduite du complexe GpIb-IX-V et une discrète augmentation de l'expression de GpIIb-IIIa par rapport au contrôle normal. Le taux de TPO a été mesuré chez 46 patients et il était globalement plus élevé que celui de sujets sains, mais similaire à celui mesuré chez des patients atteints de PTI.

Il existe donc une grande hétérogénéité entre les patients quant au degré de thrombopénie, de macrocytose plaquettaire et de sévérité de l'atteinte hémorragique. Il a été suggéré que le polymorphisme du gène *TUBB1* pouvait expliquer cette variabilité chez ces patients Bolzano, cependant les analyses de génotypage de *TUBB1* n'ont pas identifié de corrélation entre le génotype et le phénotype. Cette hétérogénéité pourrait être liée à d'autres facteurs génétiques inconnus ou à des facteurs environnementaux.

Les auteurs se sont aussi intéressés aux différences entre la forme classique de BSS et cette forme due à une mutation monoallélique. Le phénotype est concordant : les patients Bolzano présentent une thrombopénie, un diamètre plaquettaire élevé, une diminution de l'expression de la GpIb α et de l'agrégation plaquettaire à la ristocétine. De plus la tendance hémorragique et les symptômes étaient disproportionnés par rapport au degré de thrombopénie (plus importants que ce qui serait attendu pour des valeurs de thrombopénie modérée isolée), ce qui suggère que les symptômes sont expliqués en partie par la dysfonction plaquettaire. Les auteurs proposent de stratifier les phénotypes en syndrome de

Bernard-Soulier « monoallélique dominant », pour les différencier des conducteurs de la maladie (porteurs hétérozygotes) qui sont asymptomatiques, et des patients qui ont la forme biallélique qui est beaucoup plus sévère.

Enfin les auteurs mentionnent que 13 patients ont été diagnostiqués à tort avec un PTI dont 5 qui ont été traités par des corticoïdes, des Immunoglobulines IV et/ou une splénectomie, ce qui illustre la difficulté diagnostique de ces formes atypiques de BSS.

En 2006 Kunishima et al.(29) ont décrit la mutation **c.160T>G p.(Tyr70Asp)** sur *GP1BA*. Il s'agit d'un article rapportant le cas d'une jeune femme de 20 ans, adressée pour exploration d'une thrombopénie isolée diagnostiquée à tort comme atteinte d'un PTI, sans complications hémorragiques notables. Du point de vue biologique, on retrouvait une cytologie médullaire sans anomalie et notamment, des mégacaryocytes qualitativement et quantitativement normaux. La thrombopénie était modérée (70 à 123 G/L), et l'examen du frottis sanguin décelait des plaquettes géantes à un taux de 32,3%, alors qu'il est de 2,3% chez des témoins normaux. Il n'y avait pas d'inclusions dans les leucocytes; l'agrégation en présence d'ADP et de collagène était normale, et discrètement diminuée en présence de ristocétine 1,5 mg/mL. Il n'y avait pas d'autres anomalies hématologiques observées. Enfin, un traitement par corticoïdes s'était avéré inefficace.

A l'immunophénotypage des plaquettes de la patiente index le signal des anticorps anti-complexe Gplb-IX-V était diminué, avec un déficit plus important de la Gplb α . La quantification densitométrique par Immunoblot a montré une densité diminuée de la Gplb α , estimée à 52% du contrôle normal. Afin de poursuivre les investigations, des cellules embryonnaires de rein humain 293T ont été mises en culture, et transfectées avec des vecteurs contenant un ADNc de la Gplb α sauvage ou mutante. Ensuite elles ont été analysées par CMF et Immunoblot, et on retrouvait à chaque fois un taux d'expression de la Gplb α mutante très réduit par rapport à celui de la Gplb α wild-type.

L'identification de la mutation a retrouvé une substitution **c.160T>G** de *GP1BA*. La patiente et sa mère étaient hétérozygotes pour cette substitution, et celle-ci était absente dans 50 ADN de contrôle. Cette mutation hétérozygote sur *GP1BA* entraîne une substitution **p.(Tyr70Asp)** sur le second domaine LRR. Les motifs LRR sont importants pour la stabilité de chaque sous-unité et l'assemblage correct du complexe, et sont aussi essentiels pour la

liaison du vWF. Les mutations qui engendrent une perte de fonction de la Gplb α sont localisées au niveau des feuillets β au sein du domaine LRR, ce qui est le cas du variant présent puisque l'acide aminé 70 est situé dans la région charnière entre la face concave et la face convexe du feuillet β .

Par la suite, en 2008, Vettore et al.(28) ont décrit un variant supplémentaire dans le syndrome de Bernard-Soulier hétérozygote, avec un mode de transmission autosomique dominant, responsable de la substitution **p.(Asn57His)**. L'étude porte sur une cohorte de 17 patients (issus de 2 familles non liées), avec des antécédents de thrombopénie modérée depuis la naissance (70-100 G/L) avec 20-30% de plaquettes géantes. Il n'y avait pas d'antécédents de saignements sévères, seulement des épistaxis occasionnels et des saignements prolongés après une chirurgie majeure. La RIPA était légèrement diminuée à la concentration de 1,2mg/mL de ristocétine. Un immunophénotypage utilisant plusieurs anticorps montrait une expression normale ou diminuée de Gplb α en fonction de l'anticorps utilisé ; de plus l'analyse par Western Blot de lysats plaquettaires montrait une augmentation de la fraction de Gplb α dénaturée chez les sujets affectés. Le séquençage du gène *GP1BA* retrouvait une transition A>C au nucléotide 169, résultant en la substitution **p.(Asn57His)** et localisée à la sixième position du premier domaine LRR. Ce résidu est très conservé dans les LRR et chez différentes espèces, ce qui suggère que l'intégrité de la structure protéique à ce niveau est très importante. D'une façon générale, les résidus asparagines sont très conservés car elles forment des liaisons hydrogène au sein de ce domaine LRR, ce qui permet de stabiliser la structure en solénoïde incurvé du site de liaison au vWF. En effet le résidu Asparagine 57 permet 3 liaisons hydrogènes avec la «colonne vertébrale» de la Gplb α via les résidus cystéine 17 (C17), Arginine 20 (R20) et leucine 22 (L22). De ce fait une substitution par une histidine en position 57 déstabilise fortement la conformation de la protéine. La modélisation moléculaire suggère donc que le remplacement du résidu Asn57 par une histidine perturbe fortement la structure protéique qui est directement impliquée dans la liaison au vWF. Il y a perte de deux liaisons hydrogène sur les trois, en sachant que le résidu H53 – proche du résidu substitué – est directement impliqué dans la liaison au VWF. Ceci pourrait donc expliquer la légère diminution de l'agrégation en présence de ristocétine.

Suite au développement des techniques de séquençage, plusieurs nouveaux variants ont été découverts plus récemment.

En 2016 Ali et al.(34) décrivait le premier variant de syndrome de Bernard-Soulier monoallélique en Inde. Il rapportait le cas d'une femme de 25 ans présentant des épisodes fréquents de saignements à type de ménorragies, et qui a présenté durant l'enfance des épistaxis et des ecchymoses. La numération plaquettaire retrouvait une thrombopénie à 75 G/L avec un volume plaquettaire moyen (VPM) augmenté à 16 fL, et des plaquettes géantes. L'enquête familiale rapporte le décès de sa sœur à l'âge de 4 ans d'une épistaxis sévère, des épistaxis chez son père dans l'enfance, tandis que sa mère et son frère étaient asymptomatiques. Le bilan de coagulation, l'étude des fonctions plaquettaires en présence de différents agonistes (ADP, ristocétine, collagène, acide arachidonique) et l'étude des récepteurs plaquettaires par CMF sont revenus normaux (expression de la Gplb : 77%, GpIIb-IIIa : 65%, GpIX : 79% du témoin normal). Un screening des gènes *ABCG5*, *ABCG8*, *TUBB1*, *MYH9*, *GP1BA*, *GP1BB* et *GP9* a été réalisé, et a révélé une mutation hétérozygote **c.91 G>T p.(Val31Leu)** dans le gène *GP1BA*, retrouvée chez le cas index et son père uniquement, et qui est absente chez la population de contrôles sains. Une analyse *in silico* de l'effet de la mutation a suggéré un effet délétère sur la fonction de la protéine et sa stabilité.

L'étude de Ghalloussi et al.(33) en 2017 a décrit une famille en France avec une nouvelle mutation de *GP1BA* localisée sur le cinquième domaine LRR. Le cas index présentait une thrombopénie mineure (89 G/L) avec de grandes plaquettes (VPM à 13,1 fL) sans signes hémorragiques. L'agrégation était normale en présence d'ADP et de collagène, mais retrouvait une discrète diminution en présence de ristocétine à la concentration de 1,25mg/mL. De la même façon, l'expression du complexe Gplb-IX-V à la surface des plaquettes était aussi discrètement diminuée. La sœur du patient index présentait des saignements plus prononcés : ménorragies, épistaxis, saignements post-opératoires sans nécessité de transfusion. A l'analyse du frottis sanguin les deux patients avaient des macroplaquettes à un taux de 17%, mais pas de plaquettes géantes. L'enquête familiale montrait une transmission autosomique dominante. Le myélogramme retrouvait des petits mégacaryocytes avec un cytoplasme réduit et vacuolé.

Les auteurs ont réalisé une culture de mégacaryocytes *in vitro*, à partir de cellules souches périphériques CD34+ du patient en présence de facteurs de croissance et de TPO. Puis ils ont réalisé un immunophénotypage qui objectivait un pourcentage réduit de mégacaryocytes matures (CD41+CD42+) par rapport au contrôle normal, tandis que la ploïdie était conservée.

Le séquençage par technique de Sanger a permis la découverte d'une nouvelle substitution d'un nucléotide sur *GP1BA*, à l'origine d'une substitution **p.(Asn150Ser)**. Dans un deuxième temps, les investigateurs ont réalisé un séquençage des gènes *GP1BA*, *GP1BB* et *GP9* chez tous leurs patients présentant une macrothrombopénie modérée et ont retrouvé une seule famille porteuse de la substitution **p.(Asn150Ser)**.

Enfin en 2018 l'équipe de Trizuljak et al.(35) a rapporté une nouvelle mutation du gène *GP1BA* chez une famille avec une macrothrombopénie autosomique dominante. Les patients présentaient une symptomatologie hémorragique modérée : épistaxis, saignements après de petits traumatismes, sans saignement majeur rapporté. Un séquençage du génome entier a été réalisé chez 7 membres de cette famille et a révélé une substitution hétérozygote sur *GP1BA* (exon 2 **c.176 T>G**) codant une substitution **p.(Leu59Arg)** dans le domaine N-terminal de GpIb α . L'immunophénotypage plaquettaire était normal. Une analyse *in silico* de la structure cristallisée du domaine N-terminal de GpIb α a été effectuée, afin de déterminer l'impact structural du variant **p.(Leu59Arg)**. Celle-ci a révélé une perte de contact des chaînes latérales, due à un changement des propriétés physico-chimiques (volume, charge, polarité) de la glycoprotéine. La Leucine 59 est entièrement enfouie au sein de la structure protéique, et son remplacement par l'Arginine, qui est un acide aminé chargé, polaire et plus volumineux, perturbe cette structure. Afin d'étudier l'impact fonctionnel, des tests d'agrégation plaquettaire et un dosage de l'activité cofacteur de la ristocétine du vWF ont été réalisés chez 2 patients. Le dosage du vWF était dans les valeurs normales, et on observait chez un des patients une hypoagrégation en présence d'épinéphrine, d'ADP et de collagène tandis que l'étude des fonctions plaquettaire était normale chez l'autre patient.

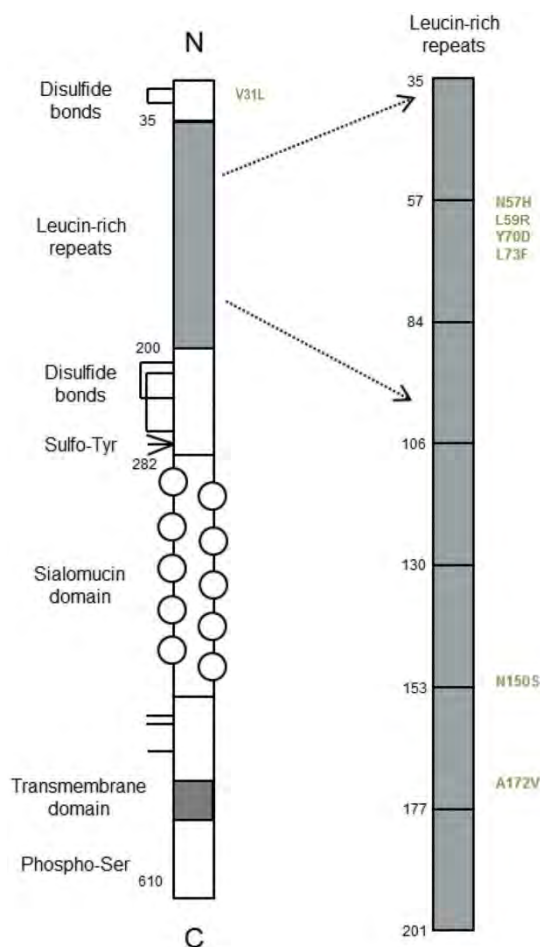


Figure 9 : représentation schématique de la GpIbα et localisation des variants hétérozygotes, d'après Trizuljak et al.(35) L'ensemble des variants hétérozygotes responsables de macrothrombopénie autosomique dominante décrits pour *GP1BA* sont répertoriés ci-dessus.

b. Variants hétérozygotes de GP1BB

Des variants hétérozygotes ont été découverts également sur *GP1BB*, notamment le variant **p.(Tyr113Cys)** décrit par Kurokawa et al.(39) en 2001 à propos de l'étude de deux familles : une première famille avec une fille atteinte de syndrome de Bernard-Soulier homozygote pour la substitution **p.(Tyr113Cys)**, et ses deux parents qui sont hétérozygotes. Chez ces derniers on ne retrouvait pas de notion de consanguinité, pas d'histoire de saignements, leurs numérations plaquettaires étaient normales mais on notait la présence de macroplaquettes, et l'agrégation en présence de ristocétine était normale. La seconde famille comptait cinq membres hétérozygotes pour la substitution **p.(Tyr113Cys)**, qui présentaient une macrothrombopénie avec une agrégation plaquettaire normale. Les

analyses génétiques ont retrouvé une substitution d'un nucléotide sur *GP1BB* **c.991 A>G** qui donne lieu au remplacement de la tyrosine au résidu 113 par une cystéine.

Des cellules 293T ont été transfectées avec le variant **p.(Tyr113Cys)**, et ont été ensuite analysées en cytométrie en flux : on ne retrouvait pas d'expression de GpIX, et l'expression de GpIb α était diminuée par rapport au contrôle normal. Une solubilisation de ces cellules a été effectuée avec analyse par immunoblot : la GpIb β était drastiquement diminuée chez les cellules transfectées avec la GpIb β mutante Tyr113Cys. Cela semble signifier que la substitution **p.(Tyr113Cys)** a pour effet de moduler l'expression en surface des complexes GpIb/IX, et également l'expression de la GpIb α . Il a été démontré que la présence de GpIb β et de GpIX est nécessaire pour la formation et l'adressage correct de GpIb α à la membrane plasmique (42), ce qui explique que l'instabilité de cette GpIb β mutante a des répercussions sur l'ensemble des sous-unités du complexe. Sur le plan moléculaire, la tyrosine en position 113 sur GpIb β est un résidu hydrophobe localisé sur une région unique adjacente au domaine LRR en C-terminal. Le domaine extracellulaire de GpIb β contient neuf cystéines, l'une réalise le pont disulfure qui relie la GpIb β avec la GpIb α , et les autres forment des ponts disulfure intracaténaux. Il est probable que la transition **p.(Tyr113Cys)** ajoute un groupement thiol supplémentaire ou potentiellement un nouveau pont disulfure, qui mène à la perturbation de la structure du complexe. Tous les résultats suggèrent que cette substitution **p.(Tyr113Cys)** affecte la structure du complexe GpIb-IX-V en exerçant un effet dominant négatif.

La même année Kunishima et al.(36) ont décrit une nouvelle mutation non-sens sur *GP1BB* associée avec une macrothrombopénie, chez une femme de 37 ans adressée pour thrombopénie. Elle ne présentait pas de saignements spontanés, sa numération plaquettaire était modérément diminuée (87-105 G/L), et le frottis sanguin retrouvait des plaquettes géantes avec un aspect normal des leucocytes. L'agrégation était normale en présence d'ADP, de collagène et d'épinéphrine, ainsi qu'en présence de ristocétine à la concentration de 1,3 mg/mL. Le taux de vWF (antigène et activité cofacteur de la ristocétine) était normal. A l'immunophénotypage plaquettaire le niveau d'expression du complexe GpIb-IX-V était modérément réduit. Un séquençage direct montrait une substitution nucléotidique **c.777C>T** qui résultait en une substitution **p.(Arg42Cys)**, la patiente étant hétérozygote pour cette mutation. Cette substitution n'était pas retrouvée dans l'ADN de 100 individus contrôles ce

qui suggère que cette mutation n'est pas un polymorphisme de *GP1BB*. De plus le séquençage de toute la région codante de *GP1BA* et de *GP9* n'a retrouvé aucune autre mutation. Les auteurs ont aussi réalisé une transfection de cellules avec le variant muté de *GP1BB* et des analyses par CMF et par immunoblot: il n'y avait pas de détection en surface de la GpIb β mutée, et l'absence de GpIb β empêche l'expression en surface des deux autres sous-unités du complexe. Au niveau moléculaire cette substitution engendre probablement une modification des ponts disulfures intracaténaire ; en effet les cystéines font partie des résidus très conservés dans les protéines à domaine LRR et sont importantes pour la conformation et la structure tertiaire de ces protéines, par conséquent l'introduction d'un résidu cystéine mènerait à une conformation anormale de la GpIb β . Ainsi, cette étude semble aussi montrer qu'une anomalie de *GP1BB* engendre des répercussions sur l'ensemble du complexe et est responsable du phénotype observé chez la patiente.

Une majorité des variants hétérozygotes de *GP1BB* responsables de macrothrombopénie ont été découverts et rapportés récemment, dans l'étude de Sivapalaratnam et al.(21) en 2018. Cette étude a consisté en une analyse de données issues du séquençage du génome de plus de 1000 patients, et l'identification d'une association statistiquement significative entre rares variants monoalléliques de *GP1BB* et macrothrombopénie. Les patients étaient répartis en trois groupes : une collection « discovery » et deux collections de validation (contrôles positifs et négatifs). La collection « discovery » regroupait des cas de patients avec une pathologie hémorragique ou plaquettaire héréditaire d'étiologie moléculaire indéterminée ainsi que leurs proches. Les investigateurs ont utilisé des analyses de bioinformatique et des modèles de régression pour identifier une association statistique entre la présence d'un variant et la macrothrombopénie. Par ailleurs il a été réalisé chez 27 patients un séquençage par technique de Sanger, un immunophénotypage plaquettaire et une étude des fonctions plaquettaires par agrégométrie.

Cette étude a retrouvé une association statistique forte entre rares variants monoalléliques de *GP1BB* et macrothrombopénie. Elle a aussi permis l'identification de 9 variants de *GP1BB* : un qui touche la méthionine du codon start **p.(Met1*)** ; un qui donne un codon stop prématuré au résidu 46 **p.(Trp46*)**, 5 variants faux-sens **p.(Leu16Pro)**, **p.(Gly43Trp)**, **p.(Thr68Met)**, **p.(Tyr113Cys)**, et **p.(Leu132Gln)**, une délétion de trois acides aminés

p.(Pro79_Leu81del), et un décalage du cadre de lecture au résidu A150 qui donne un codon stop prématuré 43 résidus plus loin **p.(Ala150Arg_fs*43)**. Cinq de ces variants ont déjà été décrits à l'état homozygote dans le syndrome de Bernard-Soulier.

En ce qui concerne les analyses biologiques, la numération plaquettaire était comprise entre 47 et 172 G/L avec une moyenne de 107,9, et le VPM était de 10,7 à 14,3fL avec une moyenne à 12,74 fL (bornes normales de 7-11 fL). L'examen des frottis sanguins a montré une anisocytose plaquettaire, avec un contingent de plaquettes de taille anormalement augmentée. L'analyse par microscopie électronique a révélé une surface plaquettaire augmentée, comprise entre celle des contrôles normaux et celle de patients atteints de maladie de Bernard-Soulier. Des signes hémorragiques ont été retrouvés chez 9/23 femmes mais chez aucun homme, ce qui suggère que la prédisposition aux saignements est peu augmentée chez ces patients par rapport à la population générale. Il y avait une diminution d'au moins 30% de l'expression de la GpIbα en CMF par rapport aux contrôles sains.

Ferrari et al.(40) a décrit en 2019 une nouvelle mutation de *GP1BB* donnant lieu à une thrombopénie modérée, avec présence de grandes plaquettes et des symptômes hémorragiques mineurs. Cette altération a été retrouvée chez deux familles ainsi qu'un cas isolé. En ce qui concerne la première famille, le propositus présentait une thrombopénie modérée (135 G/L) avec un VPM augmenté à 20 fL. Sur le plan clinique elle avait seulement de rares épistaxis ; son père et ses frères présentaient également une thrombopénie modérée sans saignements. La seconde famille inclut une femme avec une thrombopénie à 70 G/L et un VPM de 20 fL. Elle avait accouché sans nécessité de transfusion, son enfant a présenté une thrombopénie à la naissance et la mutation a été retrouvée chez lui également. Enfin la dernière patiente décrite avec cette mutation est une femme de 40 ans avec une thrombopénie à 118 G/L et un VPM à 12 fL, ne présentant aucun saignement anormal. Le séquençage a permis la découverte d'une nouvelle mutation **c.179 T>C** dans l'exon 2 de *GP1BB*, ce qui donne une substitution **p.(Leu60Pro)**, et une analyse par logiciel bioinformatique a montré la potentielle pathogénicité de ce variant.

Enfin en 2019 notre équipe (37) a rapporté un autre cas de la mutation **p.(Leu16Pro)**, chez une famille présentant une macrothrombopénie constitutionnelle. Il s'agit d'un père de 44 ans avec plusieurs symptômes hémorragiques : ecchymoses fréquentes, hématomes,

épistaxis récurrentes, gingivorragies quotidiennes et un hématome post chirurgie de hernie inguinale (score ISTH-BAT de 11, cf Annexe 2). Son fils de 16 ans présentait également une thrombopénie avec un score ISTH-BAT de 2. Sur le plan biologique les deux patients avaient une thrombopénie modérée, un VPM augmenté, un bilan de coagulation normal avec, notamment, un taux normal de facteur Willebrand et une discrète diminution de l'agrégation en présence de ristocétine à la concentration de 1.2 mg/ml. L'immunophénotypage des plaquettes par CMF quantitative retrouvait une expression des complexes Gplb-IX-V de 62% du contrôle normal chez le père et 41% chez le fils. L'analyse de *GP1BB* par NGS a identifié la mutation hétérozygote **c.47T>C** responsable d'une mutation faux-sens **p.(Leu16Pro)**, et confirmée par séquençage de Sanger. Cette variation de séquence est située au niveau du locus du peptide signal sur *GP1BB*. L'expression de Gplb β à la surface plaquettaire nécessite le clivage de ce peptide signal. Aussi deux hypothèses peuvent expliquer les conséquences de la substitution **p.(Leu16Pro)** : soit il n'y a plus d'expression du complexe Gplb-IX-V à la surface plaquettaire en raison de la présence d'un peptide signal modifié ; soit l'absence de clivage du peptide signal (du fait de la mutation) entraînerait une perte de fonction du complexe et donc un déficit qualitatif.

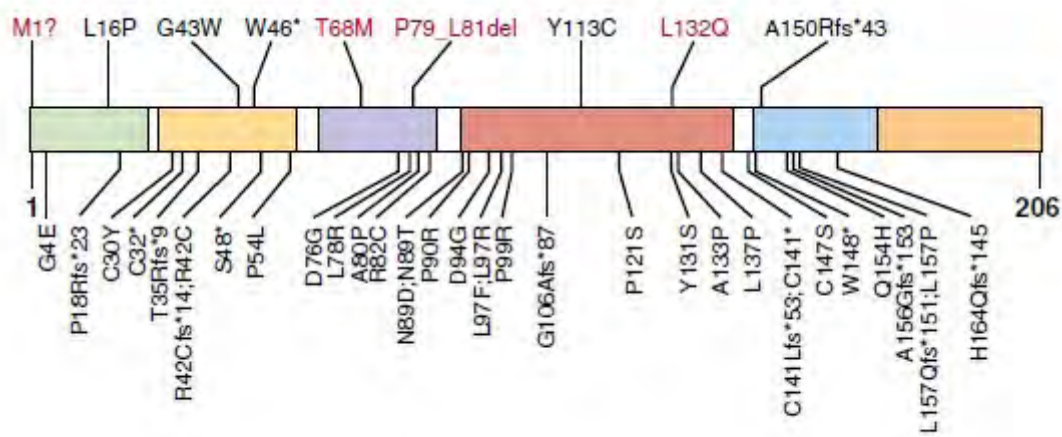


Figure 10 : localisation des variants hétérozygotes identifiés de *GP1BB* responsables de MTP (haut) et des variants responsables de BSS classique (bas), d'après Sivapalaratnam et al.(21) Les mutations hétérozygotes sont réparties au sein des différents domaines de la Gplb β de gauche à droite : peptide signal (résidus 1-25), LRR N-terminal (résidus 27-55), LRR (résidus 60-83), LRR C-terminal (résidus 89-143), domaine transmembranaire (résidus 148-172), domaine cytoplasmique (résidus 173-206).

En résumé l'ensemble des variants hétérozygotes décrits de *GP1BA* et *GP1BB* ainsi que leurs caractéristiques biologiques et cliniques sont résumées dans les tableaux suivants (Tableau 4, Tableau 5).

Publication	Variant	Clinique / saignements	Numération plaquettaire	Expression des GPs en CMF	Agrégation plaquettaire	Hypothèses physiopathologiques
Miller et al. (1993)	p.(Leu73Phe)	Modérés	Thrombopénie et VPM ↑	NR	↓ristocétine	Perturbation des domaines LRR sur Gplb α : altération du complexe et diminution de la liaison du VWF
Savoia et al. (2001) Norris et al. (2012)	p.(Ala172Val)	Saignements cutanéomuqueux, post chirurgie 13 diagnostics de PTI	Variable, thrombopénies en majorité, moyenne = 81 G/L, macro plaquettes chez tous les patients	↓Gplb α ↓↓liaison S22 et ↓liaison MB45	Normale à l'ADP et au collagène ↓ristocétine	Modification de conformation du complexe, déficit qualitatif et quantitatif en Gplb-IX-V
Kunishima et al. (2006)	p.(Tyr70Asp)	Pas de saignements Diagnostic de PTI	70-123 G/L avec 32% de plaquettes géantes	↓ complexe Gplb-IX-V	Normale à l'ADP et au collagène Légère ↓ ristocétine 1,5 mg/mL	Touche un feuillet β sur le 2 ^{ème} LRR de Gplb α Diminution de l'affinité pour le VWF et de la stabilité de la sous-unité Gplb α
Vettore et al. (2008)	p.(Asn57His)	Epistaxis occasionnels Saignements prolongés post chirurgie	70-100 G/L 20 à 30% de plaquettes géantes	Expression de Gplb α N ou ↓	Légère ↓ ristocétine 1,2 mg/mL	Touche le 1 ^{er} LRR : suppression de liaisons H sur le site de fixation du VWF
Ali et al. (2015)	p.(Val31Leu)	Ménorragies, épistaxis et ecchymoses	75 G/L VPM = 16 fL Plaquettes géantes	Non différente du contrôle normal	Normale à l'ADP, collagène et ristocétine	Effet délétère de la mutation sur la fonction et la stabilité de la Gplb α
Ghalloussi et al. (2017)	p.(Asn150Ser)	Aucun saignement	89 G/L VPM= 13fL 17% de macro plaquettes	Discrète ↓ complexe Gplb-IX-V	Normale à l'ADP et au collagène ↓ ristocétine 1,25 mg/mL	Impact sur la maturation des mégacaryocytes
Trizuljak et al. (2018)	p.(Leu59Arg)	Modérés, cutanéomuqueux	MTP	Normale	<u>Chez 1 patient (sur les 2) :</u> ↓ADP, ↓collagène et ↓ristocétine	Remplacement d'un AA neutre par un AA chargé → perturbations physicochimiques, modification de la structure du complexe Gplb-IX-V

Tableau 4 : description et caractéristiques des variants hétérozygotes de GP1BA

Publication	Variant	Clinique/ saignements	Numération plaquettaire	Expression des GPs en CMF	Agrégation plaquettaire	Hypothèses physiopathologiques
Kurokawa et al. (2001)	p.(Tyr113Cys)	Aucun saignement	MTP	Expression de Gplb-IX-V intermédiaire entre BSS homozygote et contrôle normal (pas de chiffres)	Normale à la ristocétine	<u>Transfection de cellules 293T :</u> ↓ Gplbβ impacte la coexpression des autres sous-unités du complexe <u>Modélisation 3D :</u> création d'un nouveau pont disulfure ou d'un groupement thiol → effet dominant négatif
Kunishima et al. (2001)	p.(Arg42Cys)	Pas de saignements spontanés	87-105 G/L Plaquettes géantes	↓ modérée complexe Gplb-IX-V	Normale à l'ADP, collagène, épinéphrine et ristocétine	Modification des ponts disulfure au sein du domaine LRR, conformation anormale de la Gplbβ et impact sur l'ensemble du complexe
Sivapalaratnam et al. (2018)		Signes hémorragiques chez 9/23 femmes, pas chez hommes de la cohorte	47 à 172 G/L VPM de 10,7 à 14,3 fL	↓ Gplbα d'au moins 30% par rapport à la normale	NR	Association statistiquement significative entre rares variants de <i>GP1BB</i> et macrothrombopénie
Babuty et al. (2019)	p.(Leu16Pro)	Cutanéo- muqueux fréquents, saignement prolongé post chirurgie	MTP	↓ complexe Gplb-IX-V	Légère ↓ ristocétine 1,2 mg/mL	Mutation touche le peptide signal Déficit quantitatif Déficit qualitatif (non clivage du peptide signal)
Ferrari et al. (2019)	p.(Leu60Pro)	Rares épistaxis	100-135 G/L VPM= 20 fL	Normale	NR	<u>Analyses bioinformatiques :</u> variant pathogène Rôle important du domaine LRR de Gplbβ

Tableau 5 : description et caractéristiques des variants hétérozygotes de *GP1BB*

A ce jour aucun variant responsable de BSS monoallélique n'a été mis en évidence sur le gène GP9.

B) Intégrine $\alpha\text{IIb}\beta 3$

L'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta 3$ est la glycoprotéine de surface plaquettaire majeure, à raison de 80 000 à 100 000 exemplaires par plaquette. Elle est également présente à l'intérieur des granules α , mais aussi sur la membrane cellulaire des mégacaryocytes, des mastocytes, des basophiles et de certaines cellules tumorales (43).

1. Structure détaillée

Cet hétérodimère est constitué de deux sous-unités: αIIb et $\beta 3$, qui s'associent de façon non covalente, et chacune des sous-unités comprend une grande région extracellulaire, un segment transmembranaire et une courte queue cytoplasmique (Figure 11).

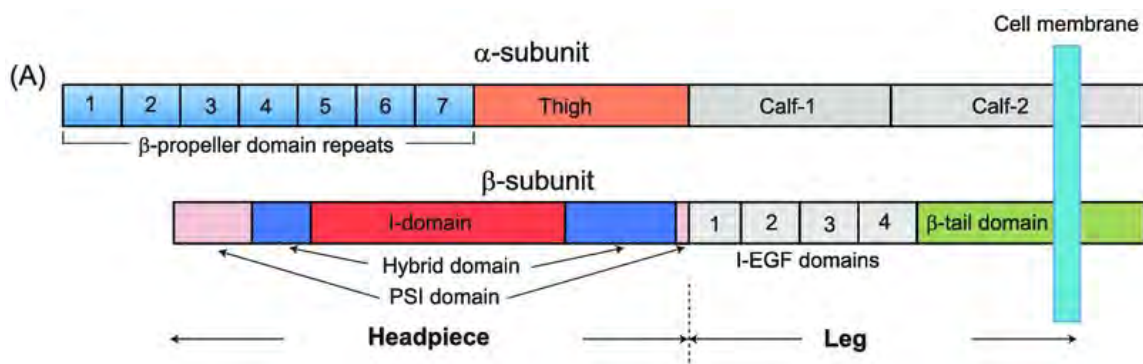


Figure 11 : Structure primaire de $\alpha\text{IIb}\beta 3$, d'après Yuki et al.(44)

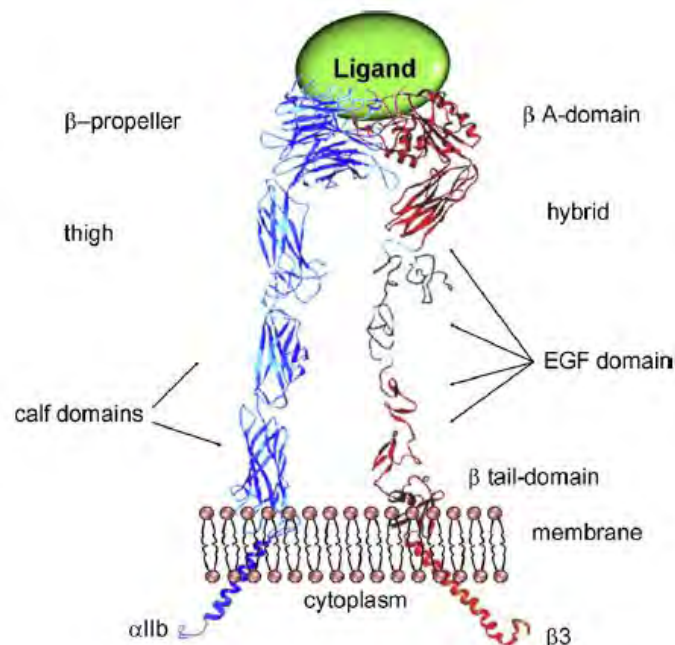


Figure 12 : Représentation des différents domaines de αIIb et de $\beta 3$, d'après Bledzka et al.(43)

a. Domaine extracellulaire :

Avec un total de 1008 acides aminés, la structure de la sous-unité α IIb associe une chaîne légère et une chaîne lourde reliées par un pont disulfure. Du côté N-terminal sa partie extracellulaire comprend tout d'abord un domaine dit β -propeller, avec des séries d'acides aminés qui se distribuent en sept lames. Entre ces lames se trouvent quatre sites de liaison d'ions métalliques, permettant d'apporter une stabilité et renforcer la structure entre chaque domaine de la sous-unité. Ensuite viennent les domaines thigh, calf-1 et calf-2, essentiellement constitués de feuillets β (Figure 12). Il existe un point de flexion, un « coude » entre thigh et calf-1, fortement acide et contenant un ion calcium. La grande interface hydrophobe entre calf-1 et calf-2 confère de la rigidité à la partie proximale de α IIb (43).

La sous-unité β 3 comporte en tout 762 acides aminés. A l'extrémité N-terminale se trouve le domaine A, formé de six feuillets β encerclés de huit hélices α , et qui contient 3 sites de liaison aux ions métalliques :

- MIDAS (Metal-Ion Dependent Adhesion Site): formé des résidus Asp119, Ser121, Ser123, Glu220, et Asp251
- ADMIDAS : adjacent au MIDAS, constitué par Ser123, Asp126, Asp127, Asp251.
- SyMBS (Synergistic Metal ion Binding Site) : formé par Asp158, Asn215, Asp217, Pro219, Glu220.

Ensuite on retrouve le domaine hybride, qui a plusieurs points de contact avec le domaine A, puis un domaine PSI puis quatre domaines EGF, qui sont riches en cystéines, et forment des structures circulaires reliées par des ponts disulfure. Enfin le domaine le plus proche de la surface membranaire est le domaine B tail (« queue B »), qui est structuré en feuillets β . Il existe là aussi des points de flexion entre les domaines domaine hybride, EGF et PSI (Figure 12)(43).

La présence d'un coude entre ces deux entités permet une transition du récepteur de la flexion à l'extension, et cette transition entre différentes formes est importante pour l'activation du récepteur (43).

La principale zone de contact entre les deux sous-unités associe la β -hélice d' α IIb et le domaine A de β 3. Il existe également d'autres zones de contact au niveau de la « tige », entre les différents domaines de chaque sous-unité.

b. Domaine transmembranaire :

Le domaine transmembranaire de l'intégrine α IIb β 3 est globalement formé des deux hélices de chaque sous-unité formant un hétérodimère. Au sein du segment transmembranaire de la sous-unité α IIb se trouve une séquence hautement conservée dans les intégrines chez l'homme, la séquence **GFFKR**, qui influence l'interaction entre les deux hélices transmembranaires de chaque sous-unité ainsi que la conformation des domaines extracellulaires (43). Elle serait un site de fixation pour de multiples régulateurs de la fonction de l'intégrine α IIb β 3 ; ainsi si cette séquence est séquestrée dans la membrane, ces interactions ne pourront pas se produire (45).

c. Domaine intracytoplasmique :

La séquence intracytoplasmique de α IIb, caractérisée par résonance magnétique nucléaire, est composée de vingt acides aminés disposés en une hélice α , qui est stabilisée grâce à des interactions électrostatiques de type pont salin avec son extrémité C-terminale. Il existe un site de liaison du calcium en C-terminal, constitué des résidus Arg997, Glu1001, Asp1003, et Asp1004 et qui aide à stabiliser la structure (43).

La partie cytosolique de la sous-unité β 3 compte en tout 47 acides aminés avec une longue hélice α , et deux séquences de type NXXY (Asp-X-X-Tyr) qui prennent une forme incurvée et lui confèrent de la flexibilité (43).

Les domaines cytosoliques proximaux de α IIb et de β 3 interagissent entre eux via différentes interactions : interactions électrostatiques, liaisons hydrophobes (impliquant des résidus Val, Leu, Ileu, Phe) et ponts salins (notamment avec des acides aminés chargés : Arg, Asp, Glu) (43).

d. Liaison des ligands

L'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta 3$ est susceptible de lier différents ligands : fibrinogène, fibronectine, vitronectine, thrombospondine-1 et vWF. L'intégrine reconnaît une séquence peptidique simple, la séquence RGD (Arg-Gly-Asp) au sein de ces ligands (43) ; cette séquence est notamment présente au sein du fibrinogène et du facteur VWF, cependant ces deux molécules interagissent par l'intermédiaire de différents sites sur le récepteur.

Il existe néanmoins une séquence préférentielle au sein du fibrinogène : la séquence KQAGDV (Lys-Gln-Ala-Gly-Asp-Val), qui est le site primaire de liaison à $\alpha\text{IIb}\beta 3$.

D'après plusieurs structures de cristallisation, le principal site d'interaction avec les ligands est situé entre la β -hélice de αIIb et le domaine A de $\beta 3$. Les sites de liaison aux ions métalliques (MIDAS, ADMIDAS et SiMBS) sont essentiels à la liaison du fibrinogène et du vWF à $\alpha\text{IIb}\beta 3$ (43), et donc à l'agrégation plaquettaire. De plus ces sites subissent d'importants mouvements lors des transitions entre la conformation active et la conformation inactive de l'intégrine. Suite à la fixation des ligands, tous ces changements génèrent un signal intracellulaire, dit signal *outside-in*.

Le coude (« genu »), point de flexion de l'intégrine, lui permet d'adopter différentes conformations, en flexion et en extension. Lors de l'activation, il fonctionne comme un interrupteur, permettant que la tête de l'intégrine s'écarte de la membrane cellulaire et devienne accessible à ses différents ligands.

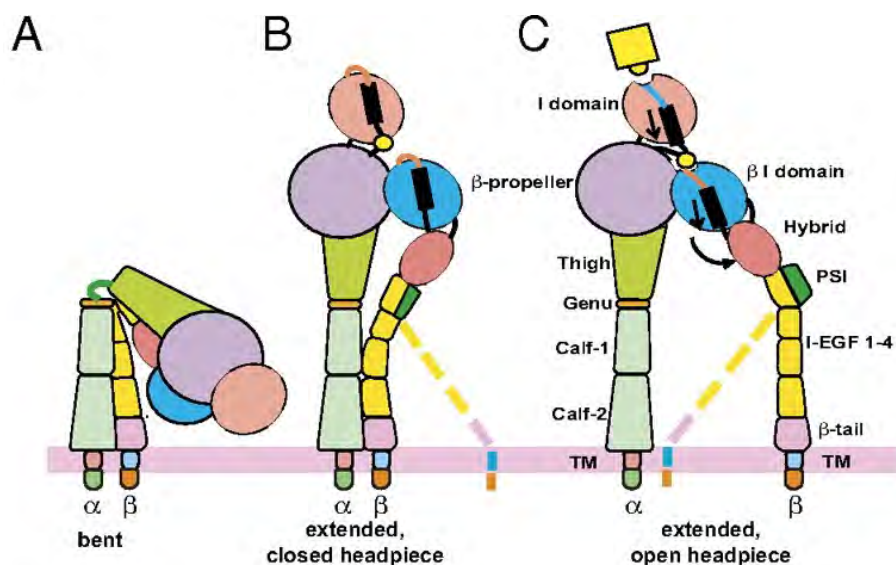


Figure 13 : Conformations des intégrines, d'après Chen et al. (46)

Il existe en fait trois états d'activation de $\alpha\text{IIb}\beta 3$ (Figure 13) : deux conformations extrêmes (fermé A/ouvert C) et une conformation intermédiaire B (où l'intégrine est en extension mais sans que sa tête ne soit accessible aux ligands). La conformation fermée correspond à un état de repos, l'intégrine présente une faible affinité pour les ligands. Lorsqu'elle passe en conformation étendue mais avec sa tête refermée elle aura une affinité intermédiaire; et enfin en conformation ouverte (la tête est ouverte et accessible), elle présente une haute affinité pour les ligands. Ces états existent en même temps sous forme d'équilibre, et les ligands ont une plus grande probabilité de se lier aux intégrines lorsqu'elles sont sous leur conformation ouverte. La liaison des ligands en conformation fermée peut arriver, mais à plus faible fréquence (43).

Les gènes codant pour chacune des sous-unités de l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta 3$ sont *ITGA2B* et *ITGB3*, ils sont constitués de 30 et 15 exons respectivement et leurs loci sont adjacents et situés tous les deux sur le chromosome 17q21 (47). Des mutations touchant ces gènes sont à l'origine d'une thrombopathie majeure : la thrombasthénie de Glanzmann (47–49).

2. Thrombasthénie de Glanzmann

La thrombasthénie de glanzmann (GT) est une maladie héréditaire rare à transmission autosomique récessive, elle est caractérisée par la survenue de saignements cutanéo-muqueux spontanés (purpura, pétéchies et ecchymoses faciles), de saignements importants suite à un traumatisme mineur. Les signes hémorragiques sont de fréquence et d'intensité variables(49) .

Sur le plan physiopathologique, il existe une anomalie de l'agrégation plaquettaire après activation par un inducteur. Ceci est dû à des mutations entraînant un déficit qualitatif ou quantitatif en intégrine $\alpha\text{IIb}\beta 3$ à la surface des plaquettes (49). Les mutations peuvent toucher chacun des 2 gènes *ITGA2B* ou *ITGB3*, mais la grande variabilité interindividuelle de la sévérité des saignements n'est pas totalement expliquée à ce jour.

Concernant les paramètres biologiques la numération plaquettaire est le plus souvent normale. Les tests fonctionnels plaquettaires vont rapidement confirmer le diagnostic de GT en montrant une absence d'agrégation plaquettaire en présence de tous les agonistes (ADP, collagène, thrombine, acide arachidonique) tandis que l'agglutination en présence de

ristocétine est maintenue. L'analyse de l'expression des glycoprotéines de surface plaquettaire par cytométrie en flux confirme le déficit en intégrine $\alpha\text{IIb}\beta 3$. Il existe des formes qualitatives dans lesquelles l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta 3$ est exprimée à taux normal mais n'est pas fonctionnelle. Le diagnostic peut alors être établi en étudiant la fixation de PAC-1, un anticorps monoclonal spécifique de la forme activée de $\alpha\text{IIb}\beta 3$, ou la fixation du fibrinogène couplé à un fluorochrome(49).

La classification des patients atteints de thrombasthénie de Glanzmann repose sur le taux d'expression de l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta 3$ à la surface des plaquettes, ainsi on distingue plusieurs groupes :

- Type I avec <5% d' $\alpha\text{IIb}\beta 3$ résiduelle,
- Type II si $\alpha\text{IIb}\beta 3$ comprise entre 5 et 20% (48).

Outre la CMF, l'analyse génétique est la clé du diagnostic de thrombasthénie de Glanzmann. Les variants de séquence peuvent avoir différentes conséquences : bloquer la biosynthèse de l'une ou l'autre des sous-unités de $\alpha\text{IIb}\beta 3$, empêcher l'assemblage du complexe protéique, ou encore interférer avec le trafic intracellulaire de l'intégrine lors de son acheminement à la membrane plasmique (49).

Il s'agit souvent de mutations privées, propres à chaque famille ou à une communauté donnée, mis à part certains variants qui sont plus fréquemment retrouvés car situés au niveau de « hotspots »; notamment la région codant le domaine β -Propeller de la sous unité αIIb , qui est très pourvoyeuse de mutations. La thrombasthénie de Glanzmann a une répartition géographique globale, et est plus fréquemment retrouvée au sein de certaines ethnies : par exemple au Moyen-Orient, ainsi que chez la communauté nomade des Tziganes en France. Du fait de son mode de transmission autosomique récessif elle est associée à la notion de consanguinité. Presque 200 mutations de *ITGA2B*, *ITGB3* ont été rapportées dans la thrombasthénie de Glanzmann (50).

Les patients dits « variants » sont ceux ayant un phénotype clinique de GT mais dont les plaquettes expriment $\alpha\text{IIb}\beta 3$ à un taux > 20%, donc à des taux qui, normalement, devraient permettre l'agrégation plaquettaire (48,49). Ils sont caractérisés par l'inaptitude des

plaquettes à lier le fibrinogène ou à lier les anticorps marqueurs d'activation (notamment PAC-1).

Certains variants d'*ITGA2B*/*ITGB3* se présentent avec une macrothrombopénie, qui n'est normalement pas rencontrée dans la thrombasthénie de Glanzmann, où la numération et la taille plaquettaire sont le plus souvent normales. Plusieurs études décrivent ces mutations dans la littérature, avec notamment des expériences de lignées cellulaires transfectées avec le variant d'intérêt afin d'en déterminer les conséquences physiopathologiques. Il en ressort que les mécanismes induisant ces formes de macrothrombopénie (MTP) sont une up-régulation de l'activation de $\alpha\text{IIb}\beta_3$, une inhibition de la transduction des signaux intracellulaires et un impact sur la mégacaryopoïèse, d'où la répercussion sur la morphologie et le nombre des plaquettes (51,52).

3. Variants hétérozygotes

Des mutations rares sur *ITGA2B* ou *ITGB3* ont été associées avec une altération de la production des plaquettes et un phénotype qui se distingue de celui de la thrombasthénie de Glanzmann (53).

Les variants hétérozygotes des gènes codant pour l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta_3$ à l'origine de cette forme de MTP décrits à ce jour sont au nombre de neuf:

- quatre variants d'*ITGA2B*, donnant les altérations suivantes: **p.(Arg995Gln)** (45,54), **p.(Arg995Trp)** (55); **p.(Gly991Cys)** (52); **p.(Phe993del)** (52);
- cinq variants d'*ITGB3*, à l'origine des altérations: **p.(Asp621_Glu660del)** (56); **p.(Asp723His)** (57); **p.(Leu718Pro)** (58,59), **p.(Leu718 del)** (60); **p.(Thr720del)** (61)

a. Mutations hétérozygotes d'ITGA2B

En premier lieu Hardisty et al. (54) ont décrit le cas d'un patient avec une forme atypique de thrombopathie: il s'agit d'un jeune homme qui présentait des épisodes de saignements depuis l'enfance, à type d'épistaxis, gingivorragies, pétéchies, parfois des hématomes et méléna. Il avait par ailleurs présenté un saignement prolongé post extraction dentaire. Ses

numérations plaquettaires étaient comprises entre 100 et 160 G/L, avec un VPM à 10.3 fL et une anisocytose plaquettaire. Le taux d'expression de l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta 3$ à la surface plaquettaire était diminué, à raison de 15% du contrôle normal. On observait également un déficit de l'agrégation plaquettaire en présence d'ADP et de collagène; au total le tableau faisait évoquer un phénotype « thrombasthenia-like ». Les auteurs soulignent que ce phénotype différait de la thrombasthénie de Glanzmann car l'atteinte était moins sévère. Par la suite Peyruchaud et al. (45) ont réalisé des études de lignées cellulaires transfectées avec le gène muté et a montré que l'expression de l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta 3$ à la surface des cellules portant le variant muté était deux fois plus faible que dans le cas du variant sauvage, ce qui confirme que cette mutation engendre un déficit d'expression de l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta 3$ à la surface des plaquettes. Par ailleurs les auteurs ont aussi étudié de la liaison de PAC-1 – marqueur d'activation de l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta 3$ – à la surface de cellules transfectées avec le variant muté et ont montré qu'il n'y avait pas ou peu de liaison, ce qui traduit un défaut d'activation de l'intégrine et un défaut de liaison au fibrinogène. Le séquençage chez le patient index a mis en évidence une mutation ponctuelle hétérozygote, une transition c. 3078 G>A sur *ITGA2B*, donnant une substitution **p.(Arg995Gln)** dans le domaine cytoplasmique de αIIb . Une hypothèse pouvant expliquer l'effet de cette mutation est que la glutamine, résidu non chargé, modifie l'interaction qui a normalement lieu entre les parties cytoplasmiques de αIIb et $\beta 3$ – un pont salin impliquant les résidus Arg995 sur αIIb et Asp723 sur $\beta 3$. Les auteurs soulignent donc l'importance de conserver l'intégrité du pont salin et de la séquence GFFKR de αIIb pour la fonction et l'expression de l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta 3$ à la surface des plaquettes.

Kunishima et al. (55) ont étudié une cohorte de 27 patients présentant une macrothrombopénie, chez qui a été réalisée une série d'analyses (morphologie des paquettes, CMF et séquençage) ainsi que des études de cellules transfectées avec le variant en cause. Les patients présentaient une thrombopénie modérée avec des plaquettes de taille augmentée, et les études familiales ont révélé un mode de transmission autosomique dominant. La symptomatologie hémorragique était mineure ou absente, l'agrégation plaquettaire était diminuée à l'ADP et au collagène, et on observait également une diminution d'expression de $\alpha\text{IIb}\beta 3$ en surface de 50-70% du contrôle normal : ainsi ces

patients présentaient un phénotype clinique et des paramètres biologiques distincts de ceux de la thrombasthénie de Glanzmann. Un séquençage des gènes *ITGA2B* et *ITGB3* a été réalisé chez ces patients et a retrouvé une nouvelle mutation hétérozygote, une transition 3077 C>T sur *ITGA2B* donnant la substitution **p.(Arg995Trp)**. L'étude des intégrines plaquettaires par cytométrie en flux a montré une liaison spontanée de PAC-1 dans les plaquettes au repos, et l'étude des cellules 293T transfectées a montré que cette mutation aboutit à une intégrine $\alpha\text{IIb}\beta 3$ présentant une conformation activée de façon constitutive. Enfin le variant muté a été exprimé dans des cellules CHO transfectées, et dans des mégacaryocytes, et il a été constaté une formation de protrusions cytoplasmiques anormales ce qui engendre une anomalie de la formation des proplaquettes, précurseurs des plaquettes. L'hypothèse émise ici est donc que l'intégrine mutée se présente en conformation spontanément activée, ce qui serait à l'origine d'un dysfonctionnement de la mégacaryopoïèse avec une formation anormale des proplaquettes, et aboutirait *in fine* à une macrothrombopénie.

Kahiwagi et al. (52) ont décrit plusieurs altérations de *ITGA2B* à l'origine d'une macrothrombopénie et d'un phénotype « GT-like ». Le premier cas étudié était celui d'une patiente de 9 ans, adressée pour l'exploration d'un purpura, avec des épistaxis, des ecchymoses faciles et un saignement prolongé après extraction dentaire. Sa numération plaquettaire était comprise entre 60 et 100 G/L, avec un VPM de 11 à 14.8 fl (valeurs normales : 7-11 fl), et l'immunophénotypage plaquettaire montrait une intégrine $\alpha\text{IIb}\beta 3$ activée en permanence. L'étude génétique a retrouvé que cette patiente était hétérozygote composite, en effet elle portait une mutation G>T sur l'exon 30 d'*ITGA2B* donnant la substitution **p.(Gly991Cys)**, et sur l'autre allèle d'*ITGA2B* une mutation C>T sur l'exon 13 aboutissant à un codon stop et donc une délétion p.Arg422*. Cependant les analyses complémentaires réalisées ont montré que les anomalies plaquettaires chez cette patiente sont imputables à la présence de l'allèle variant et non à la délétion p.Arg422*. En effet il y avait très peu d'expression de l'allèle avec la délétion p.Arg422*, et c'est l'ARNm de l'allèle muté **p.(Gly991Cys)** qui était majoritairement détecté dans les plaquettes de la patiente. La prédiction par bioinformatique de l'effet de cette mutation (grâce au logiciel Poly-phen 2) a montré qu'elle a un effet délétère avec une forte probabilité. De plus le père de la patiente

index, porteur de la même substitution **p.(Gly991Cys)**, présentait aussi une macrothrombopénie sans signes hémorragiques, tandis que sa mère, qui portait la délétion p.Arg422* sur *ITGA2B* n'était pas thrombopénique.

Le second cas étudié par Kashiwagi et al.(52) concerne un garçon de 9 ans sans antécédents notables hormis un asthme, et chez qui on avait découvert fortuitement une macrothrombopénie au décours d'un test de routine. Le patient présentait une thrombopénie à 59-110 G/L et un VPM à 11.9 fL, sans symptômes hémorragiques. Des paramètres similaires ont été retrouvés chez sa mère et son grand-père maternel. Le séquençage d'*ITGA2B* a retrouvé une nouvelle délétion de 3 nucléotides dans l'exon 30 avec conservation du cadre de lecture, donnant donc la délétion **p.(Phe993del)**.

Dans les deux cas des cellules ont été transfectées avec les variants mutés et leur étude par CMF et immunoblot retrouvait l'expression de l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta 3$ sous sa conformation active, avec une activation spontanée du signal *outside-in*.

b. Mutations hétérozygotes d'ITGB3

Gresele et al. (56) ont décrit une nouvelle mutation d'*ITGB3* au sein de deux familles présentant un tableau de macrothrombopénie de transmission autosomique dominante. Le cas index est une femme de 35 ans, avec des antécédents de saignements cutanéomuqueux modérés à sévères depuis l'enfance. Ses numérations plaquettaires étaient comprises entre 26 et 79 G/L avec un VPM à 14.2 fL. L'examen du frottis sanguin retrouvait 14% de macroplaquettes et 2% de plaquettes géantes. Un myélogramme a été réalisé et montrait une légère hyperplasie des mégacaryocytes. Concernant l'étude fonctionnelle des plaquettes, le Temps d'Occlusion Plaquettaire (sur automate PFA100) n'était pas mesurable à l'EPI (>300s) et augmenté à l'ADP (213s); l'agrégation à l'ADP et l'épinéphrine étaient sévèrement diminuées. En cytométrie en flux l'expression de toutes les glycoprotéines de surface était normale, sauf celle d' $\alpha\text{IIb}\beta 3$ qui était réduite (pas de chiffres donnés). L'analyse moléculaire a identifié une substitution hétérozygote **c.2134+1 G>C** dans un site de clivage de l'intron 13 de *ITGB3*, provoquant une délétion de 120pb de l'exon 13: **p.(Asp621_Glu660del)**, et par conséquent une perte de 40 acides aminés du domaine extracellulaire de $\beta 3$. Cette mutation a été retrouvée également chez une femme de 34 ans,

avec des saignements modérés à sévères depuis la naissance, une thrombopénie comprise entre 48-93 G/L, un VPM à 14.5 fL, 21% de macroplaquettes et 1% de plaquettes géantes sur le frottis sanguin. L'étude de lignées de cellules transfectées a montré que cette mutation donne lieu à un déficit de la signalisation *outside-in* médiée par $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$, les voies de phosphorylation intracellulaires sont inhibées, ce qui altère la transduction des signaux et la dimérisation des complexes $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$. Ainsi chez les porteurs de cette délétion les plaquettes peuvent lier le fibrinogène mais la liaison ne peut aboutir à un signal intracellulaire classique. L'interaction du fibrinogène avec $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ et les signaux qui en découlent sont nécessaires au développement des proplaquettes dans les mégacaryocytes, expliquant ainsi pourquoi les plaquettes présentent une anomalie de taille.

Par la suite Bury et al.(62) s'est intéressé à cette même mutation, mais en se focalisant sur son effet au niveau cellulaire. Des cellules souches périphériques de deux patients porteurs de cette délétion **p.(Asp621_Glu660del)** ont été recueillies, puis différenciées en mégacaryocytes. Le but de cette étude était d'analyser les mégacaryocytes sur le plan de la maturation et de la formation des proplaquettes, afin de comprendre le mécanisme de cette délétion. Les résultats ont montré que les mégacaryocytes étaient présents à tous les stades de maturation, il n'y avait pas de différence significative entre le groupe des patients porteurs de la délétion et le groupe contrôle, ce qui signifie que la délétion **p.(Asp621_Glu660del)** n'affecte pas la différenciation ni la maturation des mégacaryocytes. En revanche il est noté une franche réduction de la formation des proplaquettes dans les mégacaryocytes issus des patients malades par rapport aux mégacaryocytes contrôles, avec des anomalies confirmées par microscopie électronique : les expansions cytoplasmiques sont plus courtes et plus larges, moins nombreuses. La cytométrie en flux sur les mégacaryocytes a montré une diminution significative de l'expression de $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ (intensité de fluorescence de 13% pour le variant, contre 21% chez les mégacaryocytes contrôles) et une activation constitutive de l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ dans les mégacaryocytes des patients variants (environ deux fois plus élevée pour les mégacaryocytes mutés vs contrôles, 29 vs 16% respectivement). Enfin les auteurs ont étudié la signalisation *outside-in* via une analyse des protéines intracellulaires des mégacaryocytes par western blot, dont les résultats étaient aussi en faveur d'une activation constitutive de $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$. Ainsi, ces observations montrent que l'hyperactivation de l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ entraînée par ce variant va perturber la

thrombopoïèse plus sévèrement qu'une absence d'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta 3$ à la surface du mégacaryocyte. En résumé, cette délétion provoque une activation constitutive de l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta 3$, ce qui déclenche une signalisation *outside-in* inappropriée, qui entraîne elle-même une polymérisation de l'actine en permanence. Le cytosquelette est alors constamment mobilisé ce qui impacte la formation des proplaquettes, qui sont plus larges et moins nombreuses, et qui donneront une thrombopénie et des plaquettes de plus grande taille.

Kashiwagi et al.(52) ont également reporté une mutation de *ITGB3* donnant la même altération, chez une fille de 8 ans, avec une thrombopénie à 75 G/L à la naissance, et ayant fait un hématome spontané profond. On retrouvait une histoire familiale avec sa mère et son grand-père maternel qui présentaient tous les deux une macrothrombopénie. Le séquençage a retrouvé au niveau du gène *ITGB3* une substitution **c.2143+1 G>A** donnant la même délétion **p.(Asp621_Glu660del)**.

Ghevaert et al. (57) ont décrit une autre mutation chez une famille présentant une macrothrombopénie, de transmission autosomique dominante. Le cas index est une femme de 49 ans, avec une thrombopénie à 80 G/L, un VPM augmenté à 17 fL. Sur le frottis sanguin, on observait une anisocytose plaquettaire ainsi que la présence de plaquettes géantes. Quatre membres de sa famille présentaient des paramètres similaires, et il n'y avait pas de symptomatologie hémorragique ni thrombotique. Lors de l'analyse des plaquettes en CMF, la quantité d'intégrines $\alpha\text{IIb}\beta 3$ présente à la surface plaquettaire était normale, mais l'intensité de fluorescence variait en fonction de l'anticorps utilisé, suggérant une modification structurale de l'intégrine. Par ailleurs la liaison de PAC-1 était augmentée ce qui est en faveur d'une activation spontanée de $\alpha\text{IIb}\beta 3$, mais la liaison du fibrinogène et l'expression de la P-sélectine étaient normales, confirmant l'absence d'activation plaquettaire complète. Le séquençage a retrouvé un variant **c.2245G>C** dans l'exon 14 du gène *ITGB3*, causant la substitution **p.(Asp723His)**. Une modélisation informatique de l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta 3$ avec la mutation a montré une rupture du pont salin qui existe normalement entre les résidus Asp723 (chargé -) sur $\beta 3$ et Arg995 (chargé +) sur αIIb . Enfin les auteurs ont effectué une analyse morphologique des mégacaryocytes obtenus à partir de la différenciation de cellules souches CD34+ du sujet index, ainsi que de cellules CHO transfectées avec le variant muté. Les deux présentaient des protrusions cytoplasmiques

anormales, prouvant que la mutation de l'intégrine modifie la formation des proplaquettes dans les mégacaryocytes, à l'origine de la taille et de la morphologie anormales des plaquettes de la patiente.

Jayo et al. (58) ont décrit une autre mutation, identifiée à l'état hétérozygote, survenue de novo chez une patiente présentant un phénotype hémorragique GT-like sévère. Il s'agissait d'une femme de 43 ans, ayant des antécédents d'hémorragies sévères et fréquentes depuis l'âge de 12 mois, des ménorragies, et un épisode de saignement spontané intra-péritonéal. Sur le plan biologique elle présentait une thrombopénie modérée avec anisocytose plaquettaire. L'agrégation plaquettaire était franchement réduite avec les agonistes classiques, normale à la ristocétine. Une analyse génétique a été réalisée et a identifié dans l'exon 14 d'*ITGB3*, un variant **c.2231 T>C** qui résulte en une substitution **p.(Leu718Pro)** dans la chaîne mature de $\beta 3$, à l'état hétérozygote. La détection de $\alpha IIb\beta 3$ à la surface des cellules transfectées était variable (78%, 69% ou 47% du contrôle normal, en fonction de l'anticorps utilisé). Par ailleurs, la liaison de PAC-1 après stimulation par un agoniste et la liaison du fibrinogène étaient toutes les deux franchement diminuées par rapport au contrôle, ce qui est en faveur d'un déficit qualitatif induit par la mutation. Les auteurs ont émis l'hypothèse que cette mutation induit un changement de conformation de l'intégrine $\alpha IIb\beta 3$, la rendant partiellement activée et incapable d'assurer une agrégation normale. Sur le plan moléculaire, cette substitution a pour conséquence une altération d'une séquence LLXXHDDR qui est très conservée dans les sous-unités β des intégrines. Par ailleurs le complexe $\alpha IIb\beta 3$ est physiologiquement maintenu au repos dans un état de faible affinité grâce à des interactions hydrophobes et électrostatiques entre les domaines transmembranaires de αIIb et de $\beta 3$ et cette interaction pourrait ici être rompue à cause de la mutation. Ceci entraînerait une anomalie de la dimérisation de l'intégrine au moment de l'activation plaquettaire, avec altération de la signalisation *outside-in*, avec une répercussion sur l'agrégation plaquettaire pouvant expliquer le phénotype de cette patiente.

Nurden et al. (60) ont décrit une macrothrombopénie chez une famille, associée à une anisocytose plaquettaire, des granules α de grande taille et une diminution de l'agrégation plaquettaire. Le cas index était une femme de 60 ans, présentant quelques saignements

cutanéomuqueux, une thrombopénie à 100-120 G/L avec un VPM à 12.5 fL. Sa fille présentait également une macrothrombopénie à 72-102 G/L et un VPM à 11.5 fL. Au frottis sanguin il était noté une anisocytose plaquettaire, et l'étude en microscopie électronique retrouvait une structure anormale des granules α qui étaient de trop grande taille. Le séquençage par technique de Sanger du gène *ITGB3* a amené la découverte d'une délétion hétérozygote de 3 pb – sans décalage du cadre de lecture – **c.2230_2232delCTC** aboutissant à un codon stop entraînant une délétion **p.(Leu718 del)**. L'étude des fonctions plaquettaires retrouvait une agrégation très réduite avec la plupart des agonistes, mais une RIPA normale. L'analyse des plaquettes en CMF montrait une expression à la borne limite basse de $\alpha\text{IIb}\beta 3$ chez les 2 patientes associée à une réduction majeure de la liaison de PAC-1 et une très forte diminution de la liaison du fibrinogène, le tout est compatible avec un déficit fonctionnel de $\alpha\text{IIb}\beta 3$. Une modélisation protéique *in silico* a montré que la délétion entraîne un décalage de la queue cytoplasmique de $\beta 3$ par rapport à celle de αIIb , qui ne sont plus synchrones, ce qui entraîne une perte des interactions habituellement présentes à ce niveau. Par ailleurs les hypothèses expliquant l'anomalie de taille des granules est qu'elles résulteraient soit d'une fusion inappropriée, ou bien d'une division insuffisante causée par une altération de l'architecture du cytosquelette.

Enfin Miyashita et al.(61) ont identifié une nouvelle mutation hétérozygote sur *ITGB3* au sein d'une famille avec une macrothrombopénie et un déficit de l'agrégation plaquettaire, sans symptomatologie hémorragique et de transmission autosomique dominante. Il s'agit d'une femme de 56 ans et de ses deux fils, présentant tous les trois une thrombopénie modérée (58-75 G/L) avec un VPM augmenté (13.4-14.5 fL). Chez les trois patients on retrouvait des plaquettes géantes et une agrégation plaquettaire à l'ADP et au collagène franchement réduite, et normale à la ristocétine. En cytométrie en flux le niveau d'expression membranaire de $\alpha\text{IIb}\beta 3$ était diminué et l'étude de la liaison de PAC-1 montrait une activation spontanée et partielle de $\alpha\text{IIb}\beta 3$. Une analyse par séquençage direct a identifié une nouvelle délétion de 3pb sur *ITGB3*, **c.2236_2238delACC** résultant en une délétion **p.(Thr720del)**. Les trois patients affectés portaient ce variant à l'état hétérozygote. Une modélisation protéique *in silico* a montré que cette altération résulte en la perte d'une thréonine au profit d'une arginine en position 723 dans le domaine sous-membranaire de la sous unité $\beta 3$, ce qui supprime le pont salin qui relie normalement les sous-unités αIIb et $\beta 3$.

L'interaction ne pouvant plus se faire entre les deux sous-unités, cela entraîne un changement de conformation de l'intégrine $\alpha\text{Ib}\beta 3$. Physiologiquement, la transduction du signal *outside-in* passe par une étape de phosphorylation de FAK, une protéine à activité tyrosine kinase, ce qui a pour effet de favoriser la prolifération cellulaire, le remaniement de l'actine et la mobilité cellulaire (Figure 14). L'étude de lignées de cellules 293T transfectées avec le variant muté a montré une augmentation de la phosphorylation de FAK dans ces cellules, confirmant un retentissement fonctionnel de la mutation.

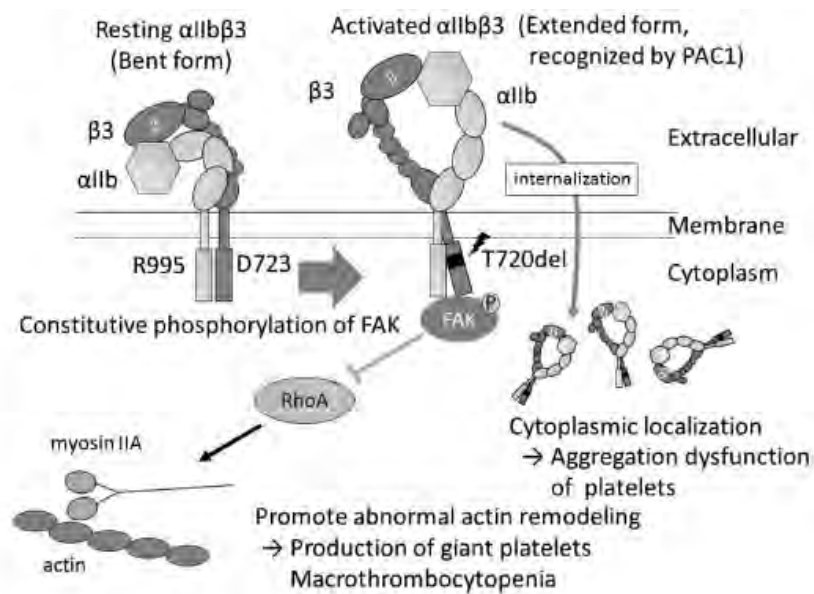


Figure 14 : mécanisme de la MTP induite par la substitution p.Thr720del, d'après Miyashita et al.(61)

En résumé le mécanisme de la macrothrombopénie liée à la délétion **p.(Thr720del)** est une rupture du pont salin entre Arg995 et His723, entraînant une conformation activée permanente de l'intégrine :

- Cela induit un remodelage anormal du cytosquelette d'actine dans les mégacaryocytes avec une répercussion sur la formation des proplaquettes et aboutit donc à une thrombopénie avec présence de plaquettes géantes.
- Dans les plaquettes, l'intégrine sous forme activée va être internalisée entraînant une diminution du taux d'intégrine à la surface plaquettaire, expliquant la dysfonction de l'agrégation plaquettaire (Figure 14).

Ainsi les macrothrombopénies causées par une mutation activatrice hétérozygote d'*ITGA2B* ou *ITGB3*, entraînant des modifications au niveau de la région membranaire proximale, ont des présentations cliniques et biologiques très variables, résumées dans les tableaux ci-dessous (Tableau 6, Tableau 7).

Publication	Variant	Clinique / saignements	Numération plaquettaire	Expression d' α IIb β 3 à la surface plaquettaire en CMF	Agrégation plaquettaire	Hypothèses physiopathologiques
Hardisty et al. (1992) Peyruchaud et al. (1998)	p.(Arg995Gln)	Cutanéo-muqueux Saignements profonds : hématome, méléna Saignement prolongé post extraction dentaire	100-160 G/L VPM 10,3 fL Anisocytose plaquettaire	15% du contrôle normal	↓ADP et collagène	Défaut d'activation plaquettaire, modification du pont salin entre α IIb et β 3
Kunishima et al. (2011)	p.(Arg995Trp)	Saignements mineurs	MTP (pas de chiffres)	50-70% du contrôle normal	↓ ADP et collagène	Liaison spontanée de PAC-1 sur les plaquettes au repos → intégrine α IIb β 3 constitutivement activée Etude de MKC et de cellules CHO transfectées : formation de protrusions cytoplasmiques anormales
Kashiwaghi et al. (2013)	p.(Gly991Cys)	Purpura et épistaxis, saignement prolongé post extraction dentaire	60-100 G/L VPM =11-14,8 fL	NR	NR	Transfection de cellules : expression d' α IIb β 3 sous sa conformation active, activation spontanée de la signalisation <i>outside-in</i>
Kashiwaghi et al. (2013)	p.(Phe993del)	Aucun saignement	59-110 G/L VPM =11,9fL	NR	NR	

Tableau 6 : description et caractéristiques des variants hétérozygotes d'*ITGA2B*

Publication	Variant	Clinique/ saignements	Numération plaquettaire	Expression d' α IIb β 3 à la surface plaquettaire en CMF	Agrégation plaquettaire	Hypothèses physiopathologiques
Gresele et al. (2009) Bury et al. (2012)	p.(Asp621_Glu660del)	Cutanéo-muqueux modérés à sévères	26-79 G/L VPM 14,2 fL avec 14% de macro-plaquettes	Diminuée (pas de chiffres)	↓↓ sévère à l'ADP et à l'épinéphrine	<u>Etude de MKC issus des patients</u> : hyperactivation d' α IIb β 3, réduction de formation des proplaquettes
Ghevaert et al. (2008)	p.(Asp723His)	Aucun saignement	80 G/L VPM = 17 fL Plaquettes géantes	Normale	NR	<u>Etude de MKC et de cellules CHO transfectées</u> : protrusions cytoplasmiques anormales
Jayo et al. (2010)	p.(Leu718Pro)	Hémorragies sévères et fréquentes Saignement spontané intra-péritonéal	Thrombopénie modérée avec anisocytose	NR	↓ ADP et collagène Normale à la ristocétine	Changement de conformation d' α IIb β 3, activation partielle avec anomalie de la dimérisation
Nurden et al. (2017)	p.(Leu718del)	Cutanéo-muqueux	72-120 G/L VPM = 11,5 et 12,5 fL	Limite basse	↓↓ importante à l'ADP et au collagène RIPA normale	<u>Modélisation protéique</u> : décalage des parties cytoplasmiques de α IIb et β 3
Miyashita et al. (2018)	p.(Thr720del)	Aucun saignement	58-75 G/L VPM = 13,4 – 14,5 fL	Diminuée	↓ ADP et collagène Normale à la ristocétine	<u>Modélisation protéique</u> : suppression du pont salin et changement de conformation d' α IIb β 3

Tableau 7 : description et caractéristiques des variants hétérozygotes d'*ITGB3*

Discussion

Il existe donc des formes monoalléliques touchant les complexes Gplb-IX-V et Gplb-IIIa avec des phénotypes cliniques souvent modérés et dont la physiopathologie reste encore partiellement obscure.

Concernant le complexe Gplb-IX-V :

Dans la forme classique du BSS biallélique, les mutations sont habituellement associées à une perte de fonction. Elles ont pour conséquences d'empêcher l'assemblage dans l'appareil de golgi, l'acheminement à la surface de la membrane, et vont causer également un déficit fonctionnel du complexe Gplb-IX-V (63).

Il en va autrement des formes monoalléliques. En effet, l'ensemble des variants hétérozygotes décrits entraînent des substitutions regroupées au niveau des domaines LRR de Gplb α , où se trouve le site de liaison au VWF, et de Gplb β , et responsables d'une diminution de l'affinité pour le VWF, expliquant les anomalies de l'agrégation plaquettaire. En revanche le déficit quantitatif en complexe Gplb-IX-V à la surface plaquettaire n'est pas toujours significatif, les résultats différant selon les études (et selon le type d'anticorps marqueurs utilisés).

Par ailleurs le complexe Gplb-IX-V est en lien étroit avec le cytosquelette, il est nécessaire au maintien de la forme de la plaquette, et intervient également lors de la mégacaryopoïèse puisque la formation des proplaquettes est médiée par le remodelage des filaments d'actine. Il a été démontré par des études in vitro que des Anticorps anti Gplb-IX-V inhibaient fortement la production des plaquettes (10). L'ensemble de ces résultats laisse supposer qu'un déficit en complexe Gplb-IX-V aurait des répercussions directes sur la production des plaquettes et serait à l'origine de la macrothrombopénie.

Il semblerait logique de penser que l'hémizygotie, à savoir le fait de ne posséder qu'un seul allèle normal de *GP1BA* ou de *GP1BB* serait la cause de la thrombopénie. Cependant, dans le syndrome de DiGeorges (Velo-Cardio-Facial syndrome), secondaire à une microdélétion 22q11.2, la délétion inclut le gène *GP1BB*, et les patients atteints ne portent qu'une seule copie normale du gène. Chez ces patients, il existe donc une réduction d'expression du

complexe Gplb-IX-V de 50%. Mais la plupart des patients atteints de 22q11.2 DS (deletion syndrome) n'ont pas de thrombopénie ni de plaquettes géantes, et on peut donc en déduire que 50% de la quantité normale du complexe Gplb-IX-V serait suffisante pour assurer une mégacaryopoïèse et une production plaquettaire normales (63). Ceci renforce l'hypothèse d'un effet dominant négatif spécifique aux mutations du BSS monoallélique.

Zwifelhofer et al.(64) a réalisé une étude de cohorte dont l'objectif était de déterminer si l'hémizygotie de *GP1BB* était à l'origine de macrothrombopénie et de signes hémorragiques. Pour cela il a procédé au recueil de données cliniques et biologiques détaillées chez 15 patients porteurs de 22q11.2 DS. L'évaluation de la symptomatologie hémorragique par le calcul du score ISTH BAT (International Society of Thrombosis and Haemostasis Bleeding Assessment Tool - Annexe 2) a révélé que seuls 53% des patients ont un score hémorragique supérieur à la normale. Globalement les paramètres biologiques (Numération plaquettaire, VPM, expression des glycoprotéines en CMF et agrégation plaquettaire à la ristocétine) étaient subnormaux par rapport aux contrôles sains, et n'étaient pas corrélés avec le degré de sévérité des symptômes hémorragiques. Enfin seulement 25% des patients de la cohorte présentaient une numération et taille plaquettaires compatibles avec une MTP. Les résultats des analyses statistiques ont conclu à une absence de corrélation entre le nombre de copies de *GP1BB* et la présence d'une MTP et de saignements. Cela signifie donc que l'hémizygotie pour *GP1BB* n'est pas la cause de MTP chez les patients porteurs de 22q11.2 DS. Par conséquent les auteurs affirment que la MTP et les saignements retrouvés chez certains patients atteints de 22q11.2 DS seraient liés à l'influence d'autres loci génétiques, ou bien de facteurs environnementaux: chirurgie/trauma, destruction des plaquettes auto-immune ou allo-immune, myélosuppression induite par des infections ou médicaments, ou aplasie médullaire.

En fait, il semble que les mutations à l'origine du BSS monoallélique exercent un effet dit dominant négatif, c'est-à-dire que le variant muté exerce son effet délétère malgré la présence d'un allèle normal. En effet chez les conducteurs hétérozygotes – notamment les proches des patients atteints de BSS classique – on retrouve une copie normale du gène *GP1BA* ou *GP1BB* et ces derniers ne présentent pas de thrombopénie ni de plaquettes géantes (65). Ainsi seules certaines mutations spécifiques sont à l'origine de macrothrombopénie dans le BSS monoallélique, en causant un déficit significatif – qualitatif

ou quantitatif – du complexe Gplb-IX-V, malgré la présence d'un allèle normal de *GP1BA* ou *GP1BB*. Aussi les effets supposés de ces variants dominants négatifs sont les suivants:

- une sous-unité Gplb qui ne permet pas l'acheminement du complexe Gplb-IX-V à la surface, donc un déficit quantitatif en Gplb-IX-V
- un complexe Gplb-IX-V non fonctionnel (64).

En conclusion, les mécanismes exacts expliquant la macrothrombopénie chez les patients porteurs de variants hétérozygotes de *GP1BA* ou de *GP1BB* ne sont pas totalement élucidés, l'hypothèse la plus plausible à ce jour est un effet dominant négatif de ces mutations, qui engendrent un déficit qualitatif ou quantitatif du complexe Gplb-IX-V. Cliniquement, il n'a pas été mis en évidence de lien entre le type de mutation et la sévérité des saignements, que ce soit chez les patients présentant un BSS monoallélique ou biallélique (66).

Concernant le complexe GpIIb-IIIa :

Dans la thrombasthénie de Glanzmann on retrouve classiquement des mutations non-sens, des insertions/délétions avec ou sans décalage du cadre de lecture, des codons stop prématurés donnant des protéines tronquées, et une majorité de mutations faux-sens. Les effets de ces mutations faux-sens sont qu'elles peuvent bloquer la production de l'une ou l'autre des sous-unités constituant l'intégrine, causer une instabilité des ARNm, interférer avec la formation du complexe, ou empêcher son acheminement (53). Il est à noter que la région β -propeller en particulier concentre de nombreuses mutations, donnant des anomalies de conformation, ou empêchant la liaison du calcium, ce qui interfère sévèrement avec la synthèse et le fonctionnement d' α IIb β 3. Ces mutations sont le plus souvent des mutations privées.

En ce qui concerne les variants hétérozygotes de *ITGA2B* et *ITGB3* responsables de thrombopénie, les mutations ont une topographie différente : elles sont concentrées sur la région codant les domaines transmembranaires de α IIb et β 3, notamment la séquence GFFKR de α IIb, et vont toucher le pont salin entre α IIb et β 3 (53). La plupart des études décrivant ces mutations comprennent des études sur mégacaryocytes différenciés à partir de cellules des patients, ou des études de transfection de cellules. Ceci a permis d'explorer au niveau cellulaire voire moléculaire les conséquences de ces variants. Les publications sont

quasiment toutes unanimes quant aux effets des mutations. Le mécanisme de la thrombopénie est clairement identifié : il est expliqué par l'impact des mutations sur la mégacaryopoïèse. Les mutations hétérozygotes sur *ITGA2B* ou *ITGB3* abolissent le pont salin entre α IIb et β 3, l'intégrine α IIb β 3 se retrouve alors en conformation activée constitutivement et de façon inappropriée. Cet état d'activation permanente entraîne une transduction spontanée du signal *outside-in* dans les mégacaryocytes, ce qui perturbe l'interaction avec le cytosquelette et la formation des proplaquettes, celles-ci sont alors plus larges et plus courtes, ce qui se répercute sur les plaquettes formées et engendre la macrothrombopénie (53,61,62). Sur le plan clinique en revanche, on observe une grande variabilité puisque certains patients présentent des saignements sévères et d'autres sont asymptomatiques. Ceci pourrait être expliqué par d'autres facteurs pouvant favoriser la survenue des saignements : facteurs intrinsèques (taux de VWF, hormones oestro-progestatives...), facteurs extrinsèques (challenges hémostatiques, interventions chirurgicales). Des études portant sur de plus grandes cohortes permettraient d'éclaircir ce point.

Perspectives

L'ensemble des études concernant les thrombopénies dues à des mutations hétérozygotes sur *GP1BA*, *GP1BB*, *ITGA2B* et *ITGB3* a permis d'en apprendre davantage sur la physiologie plaquettaire et la mégacaryopoïèse. Cependant la physiopathologie de cette nouvelle entité de thrombopénies constitutionnelles n'est pas encore définie avec précision. C'est dans cette perspective que s'inscrit notre travail. Nous envisageons de mettre en place une étude multi-centrique dans la région grand Ouest, portant sur une cohorte de patients présentant une thrombopénie héréditaire et chez qui l'exploration biologique et le séquençage ont mis en évidence des mutations de *GP1BA*, *GP1BB*, *GP9*, *ITGA2B*, *ITGB3* présentes à l'état hétérozygote. Cette étude comprendra un recueil de données cliniques et biologiques, et notamment les résultats des analyses biologiques et des explorations plaquettaires spécialisées (agrégation plaquettaire, immunophénotypage par CMF) afin de pouvoir décrire plus précisément le phénotype de ces patients. Nous envisageons également une modélisation informatique des protéines issues des variants mutés afin de mieux comprendre la relation structure-fonction de ces protéines anormales. Nous espérons que ce travail permettra de mieux comprendre la physiopathologie de ces anomalies monoalléliques touchant les complexes GpIb-IX-V et GpIIb-IIIa, d'en préciser le phénotype clinique et biologique, et ainsi d'en faciliter le diagnostic et la prise en charge.

Annexe 1 : liste des variants décrits pour *GP1BA*, *GP1BB*, *GP9*, d'après la Leiden Open Variation Database (25–27)

Mutation de GPIBA	modification dans le peptide transcrit	référence
c.1A>C	p.?	Savoia 2014
c.23_31del	p.(Leu8_Leu10del)	Savoia 2014
c.103A>T	p.(Lys35*)	Savoia 2014, Gohda 2007
c.104del	p.(Lys35Argfs*4)	Savoia 2014, Li 1996
c.154dup	p.(Leu52Profs*5)	Afrasiabi 2007
c.165_168del	p.(Ser55Argfs*12)	Vettore 2008, Afsher-Kharghan 2000
c.169A>C	p.(Asn57His)	Berndt 2011
c.208T>G	p.(Tyr70Asp)	Kunishima 2006
c.217C>T	p.Leu73Phe	Miller 1992
c.236dup	p.(Asp79Glufs*2)	Ali 2014
c.241T>C	p.(Cys81Arg)	Kenny 1998
c.266dup	p.(Asp89Glufs*63)	Ali 2014
c.275del	p.(Leu92Argfs*20)	Simsek 1994
c.278dup	p.(Val94Serfs*58)	Ali 2014
c.339_340insGA	p.(Thr114Glufs*16)	Sumitha 2011
c.355dup	p.(Thr119Asnfs*33)	-
c.376A>G	p.(Asn126Asp)	Savoia 2011, Vettore 2011
c.416T>C	p.(Leu139Pro)	Savoia 2014
c.434T>C	p.(Leu145Pro)	Li 1995, Antonucci 2000, Koskela 1999
c.438C>G	p.(Tyr146*)	Savoia 2014
c.515C>T	p.(Ala172Val)	Savoia 2001, De Marco 1990, Ware 1993, Margaglione 1999
c.555_590del	p.(Asn185_Glu197delinsLys)	Savoia 2014, Margaglione 1999
c.583_585del	p.(Leu195del)	Savoia 2014, de la Salle 1995, Ulsemer 2000

c.586C>T	p.(Gln196*)	Savoia 2014
c.667T>G	p.(Trp223Gly)	Berndt 2011, Rosenberg 2007
c.668G>C	p.(Trp223Ser)	Rosenberg 2007
c.673T>A	p.(Cys225Ser)	Savoia 2014, Savoia 2011, Simsek 1994, Rand 2010
c.737G>T	p.(Trp246Leu)	Woods 2014
c.745G>A	p.(Gly249Ser)	Matsubara 2003,Nurden 2007
c.746G>T	p.(Gly249Val)	Miller 1991,Favaloro 2007
c.751G>T	p.(Asp251Tyr)	Enayat 2012
c.763A>G	p.(Met255Val)	Russell 1993, Takahashi 1995
c.785T>G	p.(Val262Gly)	Ali 2014
c.882C>G	p.(Tyr294*)	Glembotsky 2012
c.932_933del	p.(Val311Glyfs*39)	Kanaji 1997
c.941dup	p.(Thr316Hisfs*35)	Ali 2014
c.1012dup	p.(Met338Asnfs*13)	Ali 2013
c.1039G>T	p.(Glu347*)	Yamamoto 2013
c.1064dup	p.(Pro357Thrfs*2)	Ali 2014
c.1077del	p.(Trp359*)	Bowers 2006
c.1077G>A	p.(Trp359*)	Ware 1990
c.1094_1101del	p.(Leu365Argfs*14)	Imai 2009
c.1257dup	p.(Ser420Glnfs*78)	Sumitha 2011
c.1385_1411del	p.Pro462_Ser470del	Othman 2005
c.1436dup	p.(Leu479Phefs*19)	Ali 2014
c.1454dup	p.(Ser486Ilefs*12)	Ali 2013, Gohda 2007, Gonzalez-Manchon 2001, Kanaji 1997
c.1457C>A	p.(Ser486*)	Kunishima 1994
c.1465del	p.(Glu489Asnfs*64)	Ali 2014
c.1480del	p.(Thr494Profs*59)	Noda 1995, Mitsui 1998, Yamamoto 2013,Kanaji 1997
c.1592del	p.(Leu531Argfs*22)	Ali 2014

c.1601_1602del	p.(Tyr534Cysfs*82)	Kenny 1997,Afshar-Kharghan 1997, Koskela 1999,Afshar-Kharghan 2000
c.1601_1602delinsTGG	p.(Tyr534Leufs*83)	Savoia 2014
c.1620G>A	p.(Trp540*)	Holmberg 1997, Kenny 1998
c.1759C>T	p.(Gln587*)	PubMed: Yamamoto 2013

Mutation de GPIBB	modification dans le peptide transcrit	référence
c.-871806_*2118575dup	p.?	DDDS 2015
c.-822054_*1752132del	p.0?	DDDS 2015
c.-817530_*1752132del	p.0?	DDDS 2015
c.-687930_*1752132del	p.0?	DDDS 2015
c.-160C>G	p.0?	Ludlow 1996
c.0	p.0	Bartsch 2011, Kunishima 2013, Tang 2004, Kenny 1999
c.47T>C	p.(Leu16Pro)	Savoia 2014
c.53_65del	p.(Pro18Argfs*23)	Watanable 2003, Savoia 2014, Strassel 2004
c.96C>A	p.(Cys32*)	Ali 2013
c.124_145del	p.(Arg42Cysfs*14)	Savoia 2014, Sumitha 2011
c.127G>T	p.(Gly43Trp)	Savoia 2014
c.137G>A	p.(Trp46*)	Moran 2000
c.138G>A	p.(Trp46*)	Ali 2014
c.143C>A	p.(Ser48*)	Hadjkacem 2010,
c.161C>T	p.(Pro54Leu)	Hilman 2002,Nurden 2003
c.227A>G	p.(Asp76Gly)	Hadjkacem 2010
c.233T>G	p.(Leu78Arg)	Savoia 2014
c.244C>T	p.(Arg82Cys)	Sato 2014
c.265A>G	p.(Asn89Asp)	Savoia 2014
c.266A>C	p.(Asn89Thr)	Strassel 2003
c.269C>G	p.(Pro90Arg)	Sumitha 2011
c.281A>G	p.(Asp94Gly)	Savoia 2014
c.289C>T	p.(Leu97Phe)	Kunishima 2013
c.290T>G	p.(Leu97Arg)	Savoia 2014
c.296C>G	p.(Pro99Arg)	Kunishima 2000
c.315del	p.(Gly106Alafs*87)	Kenny 1999
c.338A>G	p.(Tyr113Cys)	Kurokawa 2001, Sato 2014, Kunishima 1997
c.361C>T	p.(Pro121Ser)	Tang 2004
c.392A>C	p.(Tyr131Ser)	Savoia 2014

c.397G>C	p.(Ala133Pro)	Kunishima 1997
c.410T>C	p.(Leu137Pro)	Savoia 2014
c.418_419dup	p.(Cys141Leufs*53)	Savoia 2014
c.423C>A	p.(Cys141*)	Mahfouz 2012, Savoia 2014
c.439T>A	p.(Cys147Ser)	Kunishima 2006
c.443G>A	p.(Trp148*)	Kunishima 2002, Kunishima 2013
c.448del	p.(Ala150Argfs*43)	Kunishima 2006
c.462G>C	p.(Gln154His)	Sumitha 2011
c.466dup	p.(Ala156Glyfs*153)	Strassel 2006
c.470T>A	p.(Leu157Gln)	Savoia 2014
c.470T>C	p.(Leu157Pro)	Savoia 2014, Sumitha 2011
c.472_473del	p.(Leu158Glyfs*150)	Savoia 2014
c.491dup	p.(His164Glnfs*145)	Savoia 2011

Mutation de GP9	modification dans le peptide transcrit	référence
c.-90G>T	p.(=)	Savoia 2014
c.-4_7del	p.?	Sandrock 2010, Savoia 2014
c.20T>C	p.(Leu7Pro)	Lanza 2002, Savoia 2014
c.70T>C	p.(Cys24Arg)	Savoia 2011, Savoia 2014, Sumitha 2011, Ali 2014
c.72T>G	p.(Cys24Trp)	Savoia 2011, Savoia 2014
c.110A>G	p.(Asp37Gly)	Wright 1993
c.119del	p.(Gly40Alafs*43)	Sumitha 2011, Savoia 2014
c.139C>T	p.(Pro47Ser)	Savoia 2014
c.149C>T	p.(Pro50Leu)	Savoia 2014
c.167T>C	p.(Leu56Pro)	Noris 1998, Savoia 2014
c.182A>G	p.(Asn61Ser)	Dagistan 2007, Savoia 2014, Liang 2005, Savoia 2014
c.188T>C	p.(Leu63Pro)	Savoia 2011, Savoia 2014
c.212T>C	p.(Phe71Ser)	Sumitha 2011, Savoia 2014, Faruq 2020
c.212T>G	p.(Phe71Cys)	Sumitha 2011, Savoia 2014
c.266G>A	p.(Cys89Tyr)	Savoia 2014, Noda 1996, Gohda 2007
c.283T>G	p.(Tyr95Asp)	Ali 2013
c.284A>G	p.(Tyr95Cys)	Savoia 2011, Savoia 2014
c.285T>G	p.(Tyr95*)	Ali 2014
c.289C>T	p.(Arg97Cys)	Savoia 2014
c.305_313del	p.(Asp102_Pro105delinsAla)	Drouin 2005, Savoia 2014
c.328C>T	p.(Gln110*)	Sumitha 2011, Savoia 2014
c.338G>A	p.(Cys113Tyr)	Kunishima 1999, Savoia 2014
c.404G>A	p.(Cys135Tyr)	Ali 2013
c.429G>A	p.(Trp143*)	Iwanaga 1998, Kunishima 2006, Savoia 2014
c.437_474dup	p.(Ala159Argfs*77)	Sumitha 2011, Savoia 2014
c.442dup	p.(Val148Glyfs*67)	Savoia 2011, Savoia 2014
c.450G>A	p.(Trp150*)	Xu 2010
c.506T>C	p.(Leu169Pro)	Savoia 2014

Annexe 2 : Score hémorragique ISTH-BAT (67)

SYMPTOMS (up to the time of diagnosis)	SCORE				
	0 ^a	1 ^a	2	3	4
Epistaxis	No/trivial	- > 5/year or - more than 10 minutes	Consultation only*	Packing or cauterization or antifibrinolytic	Blood transfusion or replacement therapy (use of hemostatic blood components and rFVIIa) or desmopressin
Cutaneous	No/trivial	For bruises 5 or more (> 1cm) in exposed areas	Consultation only*	Extensive	Spontaneous hematoma requiring blood transfusion
Bleeding from minor wounds	No/trivial	- > 5/year or - more than 10 minutes	Consultation only*	Surgical hemostasis	Blood transfusion, replacement therapy, or desmopressin
Oral cavity	No/trivial	Present	Consultation only*	Surgical hemostasis or antifibrinolytic	Blood transfusion, replacement therapy or desmopressin
GI bleeding	No/trivial	Present (not associated with ulcer, portal hypertension, <u>hemorrhoids</u> , <u>angiodyspasia</u>)	Consultation only*	Surgical hemostasis, antifibrinolytic	Blood transfusion, replacement therapy or desmopressin
<u>Hematuria</u>	No/trivial	Present (macroscopic)	Consultation only*	Surgical hemostasis, iron therapy	Blood transfusion, replacement therapy or desmopressin
Tooth extraction	No/trivial or none done	Reported in ≤25% of all procedures, no intervention**	Reported in >25% of all procedures, no intervention**	<u>Resuturing</u> or packing	Blood transfusion, replacement therapy or desmopressin
Surgery	No/trivial or none done	Reported in ≤25% of all procedures, no intervention**	Reported in >25% of all procedures, no intervention**	Surgical hemostasis or antifibrinolytic	Blood transfusion, replacement therapy or desmopressin
Menorrhagia	No/trivial	Consultation only* or - Changing pads more frequently than every 2 hours or - Clot and flooding or - PBAC score > 100 ^b	- Time off work/school > 2/year or - Requiring antifibrinolytics or hormonal or iron therapy	- Requiring combined treatment with antifibrinolytics and hormonal therapy or - Present since menarche and ≥ 12 months	- Acute menorrhagia requiring hospital admission and emergency treatment or - Requiring blood transfusion, Replacement therapy, Desmopressin, or - Requiring dilatation & <u>curettage</u> or endometrial ablation or hysterectomy)
Post-partum hemorrhage	No/trivial or no deliveries	Consultation only* or - Use of syntocin or - Lochia > 6 weeks	- Iron therapy or - Antifibrinolytics	- Requiring blood transfusion, replacement therapy, desmopressin or - Requiring examination under anaesthesia and/or the use of <u>uterin</u> balloon/package to <u>tamponade</u> the uterus	- Any procedure requiring critical care or surgical intervention (e.g. hysterectomy, internal iliac artery ligation, uterine artery <u>embolization</u> , uterine brace sutures)
Muscle hematomas	Never	Post trauma, no therapy	Spontaneous, no therapy	Spontaneous or traumatic, requiring desmopressin or replacement therapy	Spontaneous or traumatic, requiring surgical intervention or blood transfusion
Hemarthrosis	Never	Post trauma, no therapy	Spontaneous, no therapy	Spontaneous or traumatic, requiring desmopressin or replacement therapy	Spontaneous or traumatic, requiring surgical intervention or blood transfusion
CNS bleeding	Never	-	-	Subdural, any intervention	Intracerebral, any intervention
Other bleedings ^a	No/trivial	Present	Consultation only*	Surgical hemostasis, antifibrinolytics	Blood transfusion or replacement therapy or desmopressin

Bibliographie

1. Austin SK. Haemostasis. *Medicine (Baltimore)*. avr 2017;45(4):204-8.
2. Andrews RK, Berndt MC. Platelet physiology and thrombosis. *Thromb Res*. janv 2004;114(5-6):447-53.
3. Palta S, Saroa R, Palta A. Overview of the coagulation system. *Indian J Anaesth*. 2014;58(5):515.
4. Winter WE, Greene DN, Beal SG, Isom JA, Manning H, Wilkerson G, et al. Clotting factors: Clinical biochemistry and their roles as plasma enzymes. In: *Advances in Clinical Chemistry* [Internet]. Elsevier; 2020 [cité 13 nov 2020]. p. 31-84. Disponible sur: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0065242319300654>
5. Kamath S, Lip GYH. Fibrinogen: biochemistry, epidemiology and determinants. *QJM*. 1 oct 2003;96(10):711-29.
6. Triplett DA. Coagulation and Bleeding Disorders: Review and Update. *Clin Chem*. 2000;(8):10.
7. Ezihe-Ejiofor JA, Hutchinson N. Anticlotting mechanisms 1: physiology and pathology. *Contin Educ Anaesth Crit Care Pain*. juin 2013;13(3):87-92.
8. Corral J, González-Conejero R, Hernández-Espinosa D, Vicente V. Protein Z/Z-dependent protease inhibitor (PZ/ZPI) anticoagulant system and thrombosis. *Br J Haematol*. avr 2007;137(2):99-108.
9. Gremmel T, Frelinger A, Michelson A. Platelet Physiology. *Semin Thromb Hemost*. 29 févr 2016;42(03):191-204.
10. Machlus KR, Italiano JE. The incredible journey: From megakaryocyte development to platelet formation. *J Cell Biol*. 10 juin 2013;201(6):785-96.
11. White J. CHAPTER 32 - Disorders affecting megakaryocytes and platelets: Inherited conditions. In: Porwit A, McCullough J, Erber WN, éditeurs. *Blood and Bone Marrow Pathology (Second Edition)* [Internet]. Edinburgh: Churchill Livingstone; 2011 [cité 27 févr 2020]. p. 491-521. Disponible sur: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780702031472000328>
12. Statland BE, Heagan BM, White JG. Uptake of Calcium by Platelet Relaxing Factor. *Nature*. août 1969;223(5205):521-2.
13. Michelson AD, Furman MI. Laboratory markers of platelet activation and their clinical significance. *Curr Opin Hematol*. sept 1999;6(5):342-348.
14. Flaumenhaft R. Chapter 18 - Platelet Secretion. In: Michelson AD, éditeur. *Platelets (Third Edition)* [Internet]. Academic Press; 2013 [cité 27 févr 2020]. p. 343-66. Disponible sur: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123878373000183>
15. Nurden AT, Nurden P. The gray platelet syndrome: Clinical spectrum of the disease. *Blood Rev*. 1 janv 2007;21(1):21-36.

16. Berndt MC, Andrews RK. Bernard-Soulier syndrome. *Haematologica*. 1 mars 2011;96(3):355-9.
17. Canobbio I, Balduini C, Torti M. Signalling through the platelet glycoprotein Ib-V-IX complex. *Cell Signal*. déc 2004;16(12):1329-44.
18. Qiao J, Arthur JF, Gardiner EE, Andrews RK, Zeng L, Xu K. Regulation of platelet activation and thrombus formation by reactive oxygen species. *Redox Biol*. avr 2018;14:126-30.
19. Passam F, Chiu J, Ju L, Pijning A, Jahan Z, Mor-Cohen R, et al. Mechano-redox control of integrin de-adhesion. *eLife*. 22 juin 2018;7:e34843.
20. Savoia A, Kunishima S, De Rocco D, Zieger B, Rand ML, Pujol-Moix N, et al. Spectrum of the Mutations in Bernard-Soulier Syndrome. *Hum Mutat*. sept 2014;35(9):1033-45.
21. Sivapalaratnam S, Westbury SK, Stephens JC, Greene D, Downes K, Kelly AM, et al. Rare variants in GP1BB are responsible for autosomal dominant macrothrombocytopenia. *Blood*. 26 janv 2017;129(4):520-4.
22. Bernard J, Soulier JP. Sur une nouvelle variété de dystrophie thrombocytaire hémorragipare congénitale. *Bull Mem Soc Med Hop Paris*. 22 oct 1948;64(28-29):969-74.
23. Lanza F. Bernard-Soulier syndrome (Hemorrhagiparous thrombocytic dystrophy). *Orphanet J Rare Dis*. déc 2006;1(1):46.
24. Nurden AT, Nurden P. Glycoprotéines, maladies héréditaires des plaquettes, rôle des plaquettes dans la réparation tissulaire. *Bull Académie Natl Médecine*. févr 2013;197(2):349-59.
25. Unique variants in gene GP1BA - Global Variome shared LOVD [Internet]. [cité 20 mars 2020]. Disponible sur: https://databases.lovd.nl/shared/variants/GP1BA/unique#object_id=VariantOnTranscriptUnique%2CVariantOnGenome&id=GP1BA&order=VariantOnTranscript%2FDNA%2CASC&search_transcriptid=00008735&search_VariantOnTranscript/Classification=pathogenic&page_size=100&page=1
26. Unique variants in gene GP1BB - Global Variome shared LOVD [Internet]. [cité 20 mars 2020]. Disponible sur: https://databases.lovd.nl/shared/variants/GP1BB/unique#object_id=VariantOnTranscriptUnique%2CVariantOnGenome&id=GP1BB&order=VariantOnTranscript%2FDNA%2CASC&search_transcriptid=00008736&search_VariantOnTranscript/Classification=pathogenic&page_size=100&page=1
27. Unique variants in gene GP9 - Global Variome shared LOVD [Internet]. [cité 20 mars 2020]. Disponible sur: <https://databases.lovd.nl/shared/variants/GP9/unique>
28. Vettore S, Scandellari R, Moro S, Lombardi AM, Scapin M, Randi ML, et al. Novel point mutation in a leucine-rich repeat of the GPIb chain of the platelet von Willebrand factor receptor, GPIb/IX/V, resulting in an inherited dominant form of Bernard-Soulier syndrome affecting two unrelated families: the N41H variant. *Haematologica*. 11 sept 2008;93(11):1743-7.

29. Kunishima S, Imai T, Hamaguchi M, Saito H. Novel heterozygous missense mutation in the second leucine rich repeat of GPIb α affects GPIb/IX/V expression and results in macrothrombocytopenia in a patient initially misdiagnosed with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Eur J Haematol.* avr 2006;76(4):348-55.
30. Miller JL, Lyle VA, Cunningham D. Mutation of leucine-57 to phenylalanine in a platelet glycoprotein Ib α leucine tandem repeat occurring in patients with an autosomal dominant variant of Bernard-Soulier disease. *Blood.* 15 janv 1992;79(2):439-46.
31. 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.* 1 mars 2001;97(5):1330-5.
32. Noris P, Perrotta S, Bottega R, Pecci A, Melazzini F, Civaschi E, et al. Clinical and laboratory features of 103 patients from 42 Italian families with inherited thrombocytopenia derived from the monoallelic Ala156Val mutation of GPIb (Bolzano mutation). *Haematologica.* 1 janv 2012;97(1):82-8.
33. Ghalloussi D, Saut N, Bernot D, Pillois X, Rameau P, Sébahoun G, et al. A new heterozygous mutation in *GP1BA* gene responsible for macrothrombocytopenia. *Br J Haematol.* nov 2018;183(3):503-6.
34. Ali S, Shetty S, Ghosh K. A novel mutation in GP1BA gene leads to mono-allelic Bernard Soulier syndrome form of macrothrombocytopenia: *Blood Coagul Fibrinolysis.* janv 2017;28(1):94-5.
35. Trizuljak J, Kozubík KS, Radová L, Pešová M, Pál K, Réblová K, et al. A novel germline mutation in *GP1BA* gene N-terminal domain in monoallelic Bernard-Soulier syndrome. *Platelets.* 17 nov 2018;29(8):827-33.
36. Kunishima S, Naoe T, Kamiya T, Saito H. Novel heterozygous missense mutation in the platelet glycoprotein Ib α gene associated with isolated giant platelet disorder. *Am J Hematol.* déc 2001;68(4):249-55.
37. Babuty A, Boisseau P, Eveillard M, Ternisien C, Debord C, Sigaud M, et al. A new case of heterozygous variant of the *GP1BB* gene responsible for macrothrombocytopenia. *Br J Haematol.* juill 2019;186(1):157-9.
38. Kunishima S, Lopez JA, Kobayashi S, Imai N, Kamiya T, Saito H, et al. Missense Mutations of the Glycoprotein (GP) Ib α Gene Impairing the GPIb. :10.
39. Kurokawa Y, Ishida F, Kamijo T, Kunishima S, Kitano K, Koike K. A Missense Mutation (Tyr88 to Cys) in the Platelet Membrane Glycoprotein Ib α Gene Affects GPIb/IX Complex Expression. *Thromb Haemost.* :8.
40. Ferrari S, Lombardi AM, Cortella I, Businaro MA, Bertomoro A, Di Pasquale I, et al. New heterozygous variant in *GP1BB* gene is responsible for an inherited form of macrothrombocytopenia. *Br J Haematol.* mars 2019;184(5):855-8.

41. Ware J, Russell SR, Marchese P, Murata M, Mazzucato M, Marco LD, et al. Point mutation in a leucine-rich repeat of platelet glycoprotein Ib alpha resulting in the Bernard-Soulier syndrome. *J Clin Invest.* 1 sept 1993;92(3):1213-20.
42. Dong J, Gao S, López JA. Synthesis, Assembly, and Intracellular Transport of the Platelet Glycoprotein Ib-IX-V Complex. *J Biol Chem.* 20 nov 1998;273(47):31449-54.
43. Bledzka K, Qin J, Plow EF. 12 - Integrin α IIb β 3. In: Michelson AD, éditeur. *Platelets* (Fourth Edition) [Internet]. Academic Press; 2019 [cité 20 sept 2020]. p. 227-41. Disponible sur: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128134566000126>
44. Yuki K, Bu W, Shimaoka M, Eckenhoﬀ R. Volatile Anesthetics, Not Intravenous Anesthetic Propofol Bind to and Attenuate the Activation of Platelet Receptor Integrin α IIb β 3. Cheng S, éditeur. *PLoS ONE.* 3 avr 2013;8(4):e60415.
45. Peyruchaud O, Nurden AT, Milet S, Macchi L, Pannochia A, Bray PF, et al. R to Q Amino Acid Substitution in the GFFKR Sequence of the Cytoplasmic Domain of the Integrin α IIb Subunit in a Patient With a Glanzmann's Thrombasthenia-Like Syndrome. :10.
46. Chen X, Xie C, Nishida N, Li Z, Walz T, Springer TA. Requirement of open headpiece conformation for activation of leukocyte integrin α X β 2. *Proc Natl Acad Sci.* 17 août 2010;107(33):14727-32.
47. Nurden AT, Pillois X. ITGA2B and ITGB3 gene mutations associated with Glanzmann thrombasthenia. *Platelets.* 2 janv 2018;29(1):98-101.
48. George J, Caen J, Nurden A. Glanzmann's thrombasthenia: the spectrum of clinical disease. *Blood.* 1 avr 1990;75(7):1383-95.
49. Nurden A, Pillois X, Wilcox D. Glanzmann Thrombasthenia: State of the Art and Future Directions. *Semin Thromb Hemost.* 8 août 2013;39(06):642-55.
50. Glanzmann Thrombasthenia Database [Internet]. [cité 2 nov 2020]. Disponible sur: <https://glanzmann.mcw.edu/>
51. Nurden A, Pillois X, Fiore M, Heilig R, Nurden P. Glanzmann Thrombasthenia-Like Syndromes Associated with Macrothrombocytopenias and Mutations in the Genes Encoding the α IIb β 3 Integrin. *Semin Thromb Hemost.* sept 2011;37(06):698-706.
52. Kashiwagi H, Kunishima S, Kiyomizu K, Amano Y, Shimada H, Morishita M, et al. Demonstration of novel gain-of-function mutations of α IIb β 3: association with macrothrombocytopenia and glanzmann thrombasthenia-like phenotype. *Mol Genet Genomic Med.* juill 2013;1(2):77-86.
53. Nurden AT, Pillois X, Nurden P. Understanding the genetic basis of Glanzmann thrombasthenia: implications for treatment. *Expert Rev Hematol.* oct 2012;5(5):487-503.
54. Hardisty R, Pidard D, Cox A, Nokes T, Legrand C, Bouillot C, et al. A Defect of Platelet Aggregation Associated With an Abnormal Distribution of Glycoprotein IIb-IIIa Complexes Within the Platelet: The Cause of a Lifelong Bleeding Disorder. :13.

55. Kunishima S, Kashiwagi H, Otsu M, Takayama N, Eto K, Onodera M, et al. Heterozygous ITGA2B R995W mutation inducing constitutive activation of the α IIb β 3 receptor affects proplatelet formation and causes congenital macrothrombocytopenia. *Blood*. 19 mai 2011;117(20):5479-84.
56. Gresele P, Falcinelli E, Giannini S, D'Adamo P, D'Eustacchio A, Corazzi T, et al. Dominant inheritance of a novel integrin 3 mutation associated with a hereditary macrothrombocytopenia and platelet dysfunction in two Italian families. *Haematologica*. 1 mai 2009;94(5):663-9.
57. Ghevaert C, Salsmann A, Watkins NA, Schaffner-Reckinger E, Rankin A, Garner SF, et al. A nonsynonymous SNP in the ITGB3 gene disrupts the conserved membrane-proximal cytoplasmic salt bridge in the α IIb β 3 integrin and cosegregates dominantly with abnormal proplatelet formation and macrothrombocytopenia. *Blood*. 1 avr 2008;111(7):3407-14.
58. Jayo A, Conde I, Lastres P, Martinez C, Rivera J, Vicente V, et al. L718P mutation in the membrane-proximal cytoplasmic tail of 3 promotes abnormal IIb 3 clustering and lipid microdomain coalescence, and associates with a thrombasthenia-like phenotype. *Haematologica*. 1 juill 2010;95(7):1158-66.
59. Kobayashi Y, Matsui H, Kanai A, Tsumura M, Okada S, Miki M, et al. Identification of the integrin β 3 L718P mutation in a pedigree with autosomal dominant thrombocytopenia with anisocytosis. *Br J Haematol*. 2013;160(4):521-9.
60. Nurden P, Bordet J-C, Pillois X, Nurden AT. An intracytoplasmic β 3 Leu718 deletion in a patient with a novel platelet phenotype. *Blood Adv*. 14 mars 2017;1(8):494-9.
61. Miyashita N, Onozawa M, Hayasaka K, Yamada T, Migita O, Hata K, et al. A novel heterozygous ITGB3 p.T720del inducing spontaneous activation of integrin α IIb β 3 in autosomal dominant macrothrombocytopenia with aggregation dysfunction. *Ann Hematol*. avr 2018;97(4):629-40.
62. Bury L, Malara A, Gresele P, Balduini A. Outside-In Signalling Generated by a Constitutively Activated Integrin α IIb β 3 Impairs Proplatelet Formation in Human Megakaryocytes. *Hotchin NA, éditeur. PLoS ONE*. 23 avr 2012;7(4):e34449.
63. Balduini CL, Melazzini F, Pecci A. Inherited thrombocytopenias—recent advances in clinical and molecular aspects. *Platelets*. 2 janv 2017;28(1):3-13.
64. Zwifelhofer NMJ, Bercovitz RS, Weik LA, Moroi A, LaRose S, Newman PJ, et al. Hemizygosity for the gene encoding glycoprotein Ib β is not responsible for macrothrombocytopenia and bleeding in patients with 22q11 deletion syndrome. *J Thromb Haemost*. févr 2019;17(2):295-305.
65. Nurden AT, Combrié R, Claeysens S, Nurden P. Heterozygotes in the bernard-soulier syndrome do not necessarily have giant platelets or thrombocytopenia: *Correspondence*. *Br J Haematol*. févr 2003;120(4):716-7.
66. Savoia A, Pastore A, De Rocco D, Civaschi E, Di Stazio M, Bottega R, et al. Clinical and genetic aspects of Bernard-Soulier syndrome: searching for genotype/phenotype correlations. *Haematologica*. 1 mars 2011;96(3):417-23.

67. Rodeghiero F, Tosetto A, Abshire T, Arnold DM, Coller B, James P, et al. ISTH/SSC bleeding assessment tool: a standardized questionnaire and a proposal for a new bleeding score for inherited bleeding disorders. *J Thromb Haemost.* 2010;8(9):2063-5.

Vu, le Président du jury,

Pr Jean-Marie BARD

Vu, le Directeur de thèse,

Dr Marc FOUASSIER

Vu, le Directeur de l'UFR,

Pr Gaël GRIMANDI

Nom - Prénoms : **DIB Fatéma, Zohra**

Titre de la thèse : **Thrombopénies constitutionnelles et variants hétérozygotes des gènes *GP1BA*, *GP1BB*, *GP9*, *ITGA2B* et *ITGB3* : revue de la littérature**

Résumé de la thèse :

Les thrombopénies constitutionnelles sont des pathologies héréditaires rares, dont le diagnostic peut être difficile, notamment du fait des similitudes avec le purpura thrombopénique immunologique. Ceci peut entraîner des errances diagnostiques parfois délétères pour les patients. La génétique a désormais une place prépondérante dans le diagnostic de ces pathologies. Le développement des techniques de séquençage nouvelle génération a récemment permis de mettre en évidence plusieurs nouveaux variants à l'origine de thrombopénies héréditaires. Cette revue s'intéresse aux thrombopénies constitutionnelles dues à des mutations hétérozygotes sur les gènes des glycoprotéines plaquettaires : *GP1BA*, *GP1BB*, *GP9*, *ITGA2B* et *ITGB3*. Les données issues de l'ensemble des études ont permis d'améliorer nos connaissances sur la physiologie plaquettaire et la mégacaryopoïèse. Elles ont permis également de mieux définir les mécanismes physiopathologiques de ces anomalies monoalléliques, et de préciser le phénotype clinique et biologique de ces rares thrombopénies constitutionnelles, puis d'en faciliter le diagnostic et la prise en charge.

MOTS CLÉS :

Thrombopénies constitutionnelles – glycoprotéines plaquettaires – *GP1BA* – *GP1BB* – *ITGA2B* – *ITGB3*

JURY :

**PRÉSIDENT : M. Jean-Marie BARD, Professeur de
Biochimie – Faculté de Pharmacie de Nantes**

DIRECTEUR : M. Marc FOUASSIER, PH en hématologie

**ASSEESSEURS : Mme Marie-Christine BENE, PU-PH
Mme Marion EVEILLARD, MCU-PH
M. Benoît GUILLET, MCU-PH**

Adresse de l'auteur : 22 rue Georges Charrier – 44100 Nantes