

UNIVERSITÉ DE NANTES

FACULTÉ DE MÉDECINE

Année : 2021

N° 2021-234

THÈSE

pour le

DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN MÉDECINE

BIOLOGIE MÉDICALE

par

Antoine BABUTY

Né le 23 avril 1990 à Tours

Présentée et soutenue publiquement le 21 octobre 2021

Troubles héréditaires des fonctions plaquettaires : évaluation de l'intérêt diagnostique de nouveaux paramètres (Etude PLATOON)

Présidente : Madame la Professeur Marie Christine BÉNÉ

Directeur de thèse : Monsieur le Docteur Marc FOUASSIER

Remerciements

Aux membres du jury,

Madame la Présidente du jury, **Madame la Professeur Marie-Christine BENE**,
Vous me faites l'honneur d'accepter de présider le jury de cette thèse, veuillez trouver ici l'expression de mon profond respect et de ma reconnaissance. Je vous remercie pour votre encadrement ainsi que pour votre enseignement de l'immunohématologie tout au long de mon internat.

Monsieur le Directeur de thèse, **Monsieur le Docteur Marc FOUASSIER**,
Merci de m'avoir proposé ce beau projet et de m'avoir accompagné tout au long de ce travail. Merci pour ta disponibilité, ton aide et ton soutien, tant dans le service qu'au cours de cette thèse. Merci également pour ta bienveillance depuis le début de mon internat.

Monsieur le Professeur Christian AGARD, qui me fait l'honneur de prendre part au jury de cette thèse. Je vous remercie d'apporter votre regard clinique sur ce travail.

Madame la Docteur Marion EVEILLARD, qui me fait l'honneur d'être présent pour juger de mon travail. Je vous remercie pour votre encadrement durant mon internat, ainsi que pour votre aide pendant la préparation de cette thèse.

Monsieur le Docteur Matthieu FIORE, qui me fait également l'honneur d'accepter de participer au jury de cette thèse. Merci d'apporter à ce travail votre expertise sur les pathologies plaquettaires.

Je remercie également,

Les médecins du Centre Régional de Traitement de l'Hémophilie du CHU de Nantes, pour m'avoir fait découvrir une spécialité passionnante.

Monsieur le Docteur Marc TROSSAERT, pour vos précieux enseignements et votre encadrement tout au long de mon internat.

Madame la Docteur Catherine TERNISIEN, je vous remercie également de m'avoir accueilli et m'avoir tant appris en consultation et au laboratoire d'Hémostase.

Madame la Docteur Marianne SIGAUD pour les nombreuses consultations et pour vos conseils toujours avisés.

Monsieur le Docteur Benjamin GILLET, merci pour tes enseignements et ta bienveillance.

Monsieur le Docteur Nicolas DRILLAUD, merci pour ton aide, ton soutien, et ta bonne humeur.

Merci également,

À tous les praticiens qui m'ont supervisé, dans les services d'Immunologie, de Bactériologie et de Biochimie du CHU de Nantes. Merci à tous les membres du service d'Hémostase Clinique du CHU de Lyon de m'avoir gentiment accueilli pendant ces six mois d'inter-CHU.

Merci aux Docteurs Soraya WUILLEME et Camille DEBORD du laboratoire d'Hématologie pour vos enseignements, que j'essaye de conserver précieusement.

À tous les membres des équipes techniques du laboratoire d'Hématologie du CHU de Nantes, je vous remercie pour tout ce que vous m'avez apporté et transmis, tant sur le plan humain que professionnel.

Aux membres des équipes paramédicales avec qui j'ai pu travailler, en particulier au Centre Régional de Traitement de l'Hémophilie et au centre de prélèvement du CHU de Nantes, merci pour votre aide, votre patience et votre disponibilité tout au long de mon internat.

À tous mes co-internes avec qui j'ai progressé tout au long de cet internat, merci pour les moments partagés ensemble, à l'hôpital comme ailleurs. Merci en particulier à Justine, Martin et Adeline pour votre amitié durant ces années. Merci également aux collocs de Saint Jacques avec qui l'internat a commencé : Alexia, Margaux, Zélie (et encore toi Martin). Malgré la fin de cette période, j'espère que nous pourrions toujours partager quelques instants de rire et de joie.

À mes fidèles amis du collège et du lycée, Maxime, Robin, Benoit, le temps passe, les distances nous éloignent, mais nous sommes restés les mêmes.

À tous mes amis de la Faculté de Médecine de Tours et aux plus récents de Nantes : Alexandra et Erwan, Alice et Papi, G-Max, Mika et Lucie, Marchal et Popo, Martin et Charlotte, Mehdi et Alix, Jean et Jordane, Pouyat, De Vial et Marie, Aurélien et Manon, CLR et Anna, Nonal, Oussama, Thiaudière. Merci d'avoir partagé tant de moments mémorables, vivement que ça reprenne.

À mes parents, pour votre éducation, votre soutien et votre aide. À ma sœur Adèle pour sa joie de vivre et sa bonne humeur.

À ma belle-famille, qui m'a si bien accueilli.

À Juliette, ma biquette d'amour.

Table des matières

I. Introduction.....	8
A. Mégacaryopoïèse.....	8
B. Cycle de vie des plaquettes	12
C. Structures plaquettares	13
D. Fonctions plaquettares.....	21
E. Exploration des pathologies plaquettares	30
F. Les thrombopathies	45
II. Matériel et méthodes.....	48
A. Design de l'étude.....	48
B. Population étudiée	48
C. Objectifs	49
D. Techniques d'étude et d'analyse	50
E. Gestion des données	57
F. Statistiques	57
III. Résultats.....	59
A. Description de la population	59
B. Analyses biologiques de première intention	59
C. Agrégations plaquettares.....	62
D. Cytométrie en flux.....	65
E. Dosage de la sérotonine intra plaquettaire	67
F. Comparaison des groupes ISTH-BAT normal versus ISTH-BAT pathologique.....	68
IV. Discussion	73
V. Perspectives.....	79
VI. Conclusion	80

Figures

Figure 1 : Schéma de la production plaquettaire.....	11
Figure 2 : Lipides de la membrane plasmique de la plaquette au repos.....	15
Figure 3 : Cytosquelette plaquettaire au repos	18
Figure 4 : Granules denses plaquettaire en whole mount electron microscopy	20
Figure 5 : Schéma des voies d'activation plaquettaire.....	27
Figure 6 : Granule α géant unique.....	33
Figure 7 : Tracé d'un test d'agrégation plaquettaire	36
Figure 8 : Mécanismes d'action des agonistes plaquettares forts et faibles.....	37
Figure 9 : Courbes d'agrégation plaquettaire selon les atteintes.....	38
Figure 10 : Anomalies des voies de signalisation plaquettaire	40
Figure 11 : Agrégations plaquettares des 20 patients inclus dans l'étude PLATOON.....	64
Figure 12 : Etude de la sécrétion des granules α marqués par le CD62 et des granules δ marqués par le CD63 en cytométrie en flux.....	65
Figure 13 : Test à la mépacrine : étude des granules δ en cytométrie en flux	66
Figure 14 : Facteur II résiduel, comparaison des groupes ISTH-BAT normal versus ISTH-BAT pathologique	69
Figure 15 : Comparaison quantitative du critère surface à 4 minutes	71
Figure 16 : CD62, CD63, Sérotonine intra plaquettaire : comparaison des groupes ISTH-BAT normal versus ISTH-BAT pathologique	72

Tableaux

Tableau 1 : Caractéristiques cliniques et biologiques à l'inclusion	61
Tableau 2 : Classification des courbes d'agrégation plaquettaire	63
Tableau 3 : Comparaison des paramètres biologiques de première intention entre les groupes ISTH-BAT normal et ISTH-BAT pathologique.	68
Tableau 4 : Analyse qualitative globale des courbes d'agrégation plaquettaire : comparaison entre les groupes ISTH BAT normal et ISTH-BAT pathologique.....	69
Tableau 5 : Analyse qualitative des courbes d'agrégation plaquettaire selon le paramètre surface à 4 minutes : comparaison entre les groupes ISTH BAT normal et ISTH-BAT pathologique.	70

Abréviations

AC : Adenylate cyclase	MFI : Mean Fluorescence Intensity
ADN : Adénosine désoxyribonucléique	NO : Monoxyde d'azote
ADP : Adénosine diphosphate	PFA : Platelet Function Analyzer
AINS : anti inflammatoires non stéroïdiens	PG : Prostaglandine
AMR : Ashwell Morell Receptor	PGI ₂ : Prostacycline
ARN : Acide ribonucléique	PI3-K : Phosphoinositide 3-kinase
ATP : Adénosine triphosphate	PIP ₂ : Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate
BAT : Bleeding Assesment Tool	PKC : Proteine Kinase C
PBS : Phosphate Buffer Saline	PLA2 : Phospholipase A2
CHU : Centre Hospitalier Universitaire	PLC : Phospholipase C
CRTH : Centre Régional de traitement de l'hémophilie	PPP : Plasma pauvre en plaquettes
CTAD : citrate, théophylline, adénosine, dipyridamole	PRP : Plasma riche en plaquettes
DAG : Diacylglycérol	PS : Phosphatidylsérine
DMS : Système membranaire de démarcation	PE : Phosphatidyléthanolamine
EDTA : Acide éthylènediaminetétraacétique	RCPG : Récepteur couplé aux protéines G
EIQ : Ecart inter quartile	SCO : Système canaliculaire ouvert
ELISA : Enzyme-linked immunosorbent assay	STD : Système tubulaire dense
ET : Ecart-type	TCK : Temps Céphaline Kaolin
FPI : Fraction plaquettaire immature	THFP : Troubles héréditaires des fonctions plaquettaires
GDP : Guanosine diphosphate	TP : Taux de Prothrombine
GTP : Guanosine triphosphate	TPO : Thrombopoïétine
HPLC : High Performance Liquid Chromatography	TRAP : Thrombin Receptor Activator Peptide
IP ₃ : Inositol triphosphate	TX : Thromboxane
ISRS : Inhibiteur sélectif de la recapture de la sérotonine	VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor
ISTH-SSC BAT : International Society on Thrombosis and Haemostasis-Scientific and Standardization Committee Bleeding Assessment Tool	VPM : Volume plaquettaire moyen
ITAM : Immunoreceptor tyrosine-based activation motif	VWF : von Willebrand Factor
	VWF:Act : von Willebrand Factor activité
	VWF:Ag : von Willebrand Factor antigène

I. Introduction

A. Mégacaryopoïèse

Les mégacaryocytes sont des cellules précurseurs hautement spécialisées ayant pour unique fonction la production et la libération de plaquettes dans la circulation sanguine.¹ Les mégacaryocytes, comme toutes les autres cellules du sang, se développent à partir d'une cellule souche pluripotente. Chez l'adulte les cellules souches hématopoïétiques résident principalement dans la moelle osseuse. Sous l'influence de facteurs de transcriptions (par exemple GATA 1, FLI1, FOG)² la cellule souche hématopoïétique s'engage dans un processus de différenciation afin d'obtenir une cellule progénitrice myéloïde commune (Colony-Forming Unit - Granulocyte Erythroid Macrophage Megakaryocyte [CFU-GEMM]). À partir de cette cellule encore pluripotente, les précurseurs engagés dans la lignée mégacaryocytaire sont divisés en deux types de colonies qui possèdent des capacités de prolifération différentes. Les BFU-MKs (Burst Forming Unit-Megakaryocytes) peu matures peuvent donner de grandes colonies de mégacaryocytes. Les CFU-MKs (Colony Forming Unit-Megakaryocytes), plus matures, donnent naissance à des colonies plus petites.

L'engagement dans la lignée des mégacaryocytes est accompagné par des niveaux élevés d'expression de CD61 (intégrine $\beta 3$ ou GPIIIa) et de CD41 (intégrine α IIb ou GPIIb).

Le promégakaryoblaste est le premier précurseur de la lignée mégacaryocytaire reconnaissable dans la moelle osseuse. Il se différencie progressivement en mégacaryocyte où il acquiert les propriétés nécessaires à la formation des plaquettes. Au cours de leur différenciation, les mégacaryocytes subissent une endomitose par des cycles répétés de réplication de l'ADN sans division cellulaire. L'endomitose ne résulte pas d'une absence totale

de mitose, mais plutôt d'une mitose prématurément terminée. Le contenu chromosomique est séparé en lobes mais l'étape de cytokinèse qui sépare normalement de façon irréversible une cellule mère en deux cellules filles au cours de la mitose ne se produit pas.³ Ce phénomène répété d'endomitose conduit à une polyploïdisation de l'ADN ayant pour but d'augmenter la synthèse de protéines. En parallèle, l'agrandissement de la cellule permet de préparer un réservoir de membrane qui sera nécessaire à la formation des plaquettes.⁴

Le nombre de cycles endomitotiques peut varier de deux à six (soit de 4N à 128N) ; cependant la majorité des mégacaryocytes subit trois cycles d'endomitose pour atteindre un contenu en ADN de 16N.

Après le processus d'endomitose, le mégacaryocyte continue de se différencier par une production intense de protéines, organelles et systèmes membranaires qui pourront être partagés lors de la fragmentation du mégacaryocyte pour produire les plaquettes.

Système membranaire de démarcation

Le système membranaire de démarcation (DMS) est un réseau étendu de canaux membranaires composé de citernes et de tubules aplatis. Il dérive de la membrane plasmique des mégacaryocytes sous la forme d'invaginations tubulaires. Le DMS est en contact avec le milieu externe et fonctionne principalement comme une réserve membranaire pour la formation et l'extension des plaquettes.

Système tubulaire dense

Les mégacaryocytes contiennent également un système tubulaire dense qui n'est pas en contact avec l'environnement extérieur.

Granules

Au cours du développement des mégacaryocytes on observe l'apparition d'organites, que l'on dénomme corps multivésiculaires, provenant des endosomes précoces. La taille de ces corps multivésiculaires peut atteindre jusqu'à 0,5 μm de diamètre. Ils contiennent à la fois des protéines telles que le facteur de von Willebrand (VWF), la β -thromboglobuline, la protéine membranaire P-selectine (CD62) et la protéine membranaire CD63 (granulophysine). Ces corps multivésiculaires constituent ainsi des organites intermédiaires permettant la compartimentation des différents éléments constitutifs des granules denses et des granules α qui seront retrouvés dans les plaquettes.⁵

Formation et libération des plaquettes

Au terme du processus de maturation, le mégacaryocyte mature situé dans l'espace extravasculaire sur le côté abluminal des cellules endothéliales des sinus médullaires développe de longs pseudopodes cytoplasmiques, appelés pro plaquettes, qui traversent la paroi sinusoïdale et pénètrent dans le sinus médullaire. Leur processus de formation repose sur la polymérisation irréversible de la tubuline et de l'actine en filament cytosquelettiques. L'élongation des filaments de tubuline est permise par la dynéine cytoplasmique, protéine motrice moléculaire des microtubules, localisée le long des microtubules des pro plaquettes et qui permet leur glissement.⁶ Les microtubules permettent également le transport de la membrane, des organelles et des granules. La polymérisation des fibres d'actine elle, est responsable des ramifications de la tige des pro plaquettes, aboutissant à une multiplication importante du nombre de plaquettes produites.⁷ *In fine*, les pro plaquettes s'étendent dans les sinusoïdes vasculaires de la moelle osseuse, où elles sont libérées et entrent dans la circulation sanguine. Ces fragments anucléés ou pré plaquettes, dépassent les dimensions des plaquettes

normales et apparaissent comme des « plaquettes géantes ». Elles possèdent encore la capacité de se diviser en « pro plaquettes en forme d’haltère ». Ce sont ces dernières, qui subiront une ultime division pour former les plaquettes définitives présentes dans la circulation sanguine^{8,9} **(figure 1)**.

Le noyau nu du mégacaryocyte est ensuite phagocyté par les macrophages des cordons médullaires. Un mégacaryocyte permet ainsi la production d’environ 2000 à 5000 plaquettes par cellule.¹⁰

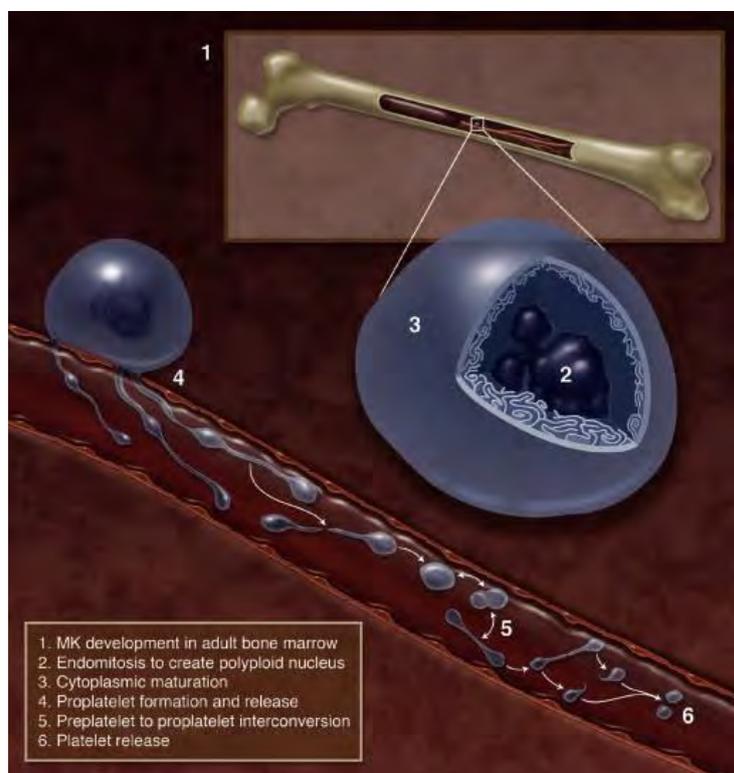


Figure 1 : Schéma de la production plaquettaire (d’après Machlus, K. R. & Italiano, J. E. J. The incredible journey: From megakaryocyte development to platelet formation. J. Cell Biol. 201, 785–796 (2013)).

Les mégacaryocytes ont été identifiés dans des sites intravasculaires du poumon, ce qui a conduit à une théorie selon laquelle les mégacaryocytes pourraient passer entièrement dans la circulation sanguine puis être séquestrés dans les capillaires pulmonaires où ils se fragmenteraient en plaquettes. Cependant, selon ces observations, la contribution estimée des

mégacaryocytes pulmonaires à la production totale de plaquettes reste incertaine, car les valeurs ont été estimées de 7 à 100%.^{11,12} De plus, des résultats expérimentaux utilisant des modèles accélérés de thrombopoïèse chez la souris suggèrent que la fraction de la production de plaquettes se produisant dans le poumon murin est insignifiante.

B. Cycle de vie des plaquettes

Le corps humain produit environ 100 milliards de plaquettes par jour. À l'état d'équilibre, seule une petite fraction de celles-ci est consommée dans les processus hémostatiques. La majorité est éliminée par le système réticulo-endothélial du foie et de la rate. Leur temps de séjour dans la circulation est relativement court, environ 10 jours chez l'homme, comparativement aux globules rouges qui peuvent rester dans la circulation sanguine jusqu'à 4 mois.

Mort physiologique des plaquettes

À l'état physiologique, seule une partie minime des plaquettes est consommée sur les sites de brèche vasculaire dans l'hémostase primaire. La majorité des plaquettes est éliminée par apoptose via la voie Bcl-x1.¹³ Celles-ci sont ensuite phagocytées par les macrophages du système réticulo endothélial, principalement dans la rate mais également dans le foie et la moelle osseuse.

Récemment de nouvelles voies d'élimination des plaquettes ont été mises en évidence.

L'acide sialique est la partie sucre terminale de la plupart des glycoprotéines et glycolipides présents sur les surfaces cellulaires. Les neuraminidases (NEU) sont des enzymes ayant une activité sialidase. On en compte 4 chez l'homme (NEU1, 2, 3, 4) dont une décrite dans la

plaquette (NEU1). Les plaquettes vieillissantes sont exposées aux neuraminidases circulantes ou à l'exposition membranaire de leur propre neuraminidase, entraînant une perte de l'acide sialique de leurs glycoprotéines et glycolipides et exposant le sucre sous-jacent, le β galactose. Les asialoglycoprotéines plaquettaires sont reconnues par un récepteur présent sur les hépatocytes et les cellules de Kupffer : le récepteur Ashwell Morell (AMR), entraînant leur clairance par endocytose. En parallèle de leur clairance, la liaison des plaquettes sénescents à l'AMR des hépatocytes entraîne une activation intracellulaire de la voie JAK2/STAT3 et la production de thrombopoïétine (TPO). La TPO est l'hormone majeure qui stimule la mégacaryocytopoïèse dans la moelle osseuse via le récepteur MPL présent sur les mégacaryocytes, permettant de générer en permanence de nouvelles plaquettes.¹⁴

C. Structures plaquettaires

Les plaquettes sont les plus petites des nombreux types de cellules présentes dans le sang circulant, avec un diamètre moyen de seulement 2,0 à 5,0 μm et une épaisseur de 0,5 μm . Elles possèdent un volume cellulaire moyen de 6 à 10 femtolitres et une durée de vie de 7 à 10 jours.

Le glycocalyx

La surface externe de la plaquette contient une couche de glycoprotéines et de glycolipides connue sous le nom de glycocalyx. En l'absence de signaux d'activation, les charges négatives du glycocalyx exercent une force répulsion empêchant leur interaction spontanée avec les autres éléments circulant dans le sang ainsi qu'avec les cellules endothéliales de la paroi vasculaire. Le glycocalyx est donc un élément important interdisant l'agrégation spontanée des plaquettes.¹⁵

La membrane

La membrane plaquettaire présente une bicouche lipidique, de très nombreuses protéines, et des domaines enrichis en glycosphingolipides. Les lipides membranaires sont constitués essentiellement de phospholipides. Les phospholipides principaux sont la phosphatidylcholine (PC), la phosphatidylsérine (PS) et la phosphatidyléthanolamine (PE) ainsi que de la sphingomyéline (SM) en moindre quantité et du cholestérol.¹⁶ La distribution de ces phospholipides, sur les feuillet interne et externe de la membrane plaquettaire, est asymétrique. Les phospholipides de charge négative (la PS et la PE) sont localisés principalement dans le feuillet interne de la plaquette. Cette distribution asymétrique physiologique des phospholipides de la membrane plaquettaire est maintenue par des enzymes ATP dépendante : les flippases et floppases.¹⁷ Ainsi, au repos, la coagulation ne peut pas se dérouler sur la surface de la membrane plaquettaire qui n'expose pas de phosphatidylsérine chargée négativement (**figure 2**).

Les lipides de la membrane plaquettaire sont également une source importante de molécules indispensables à la signalisation plaquettaire, comme le 1,2 diacylglycérol (DAG), l'inositol triphosphate (IP₃), des prostaglandines (PG) et des phosphatidylinositides (PI).¹⁶

L'acide arachidonique, un acide gras essentiel présent dans la membrane plaquettaire, joue également un rôle essentiel dans la formation des messagers intra cellulaires au cours de l'activation plaquettaire.

Enfin, le cholestérol et les sphingolipides forment des régions appelées radeaux lipidiques. Ces régions ou « microdomaines lipidiques » permettent de concentrer en des zones précises de la plaquette des récepteurs associés à la signalisation plaquettaire comme les récepteurs GPIb-IX-V ou encore GPIIb-IIIa.¹⁸

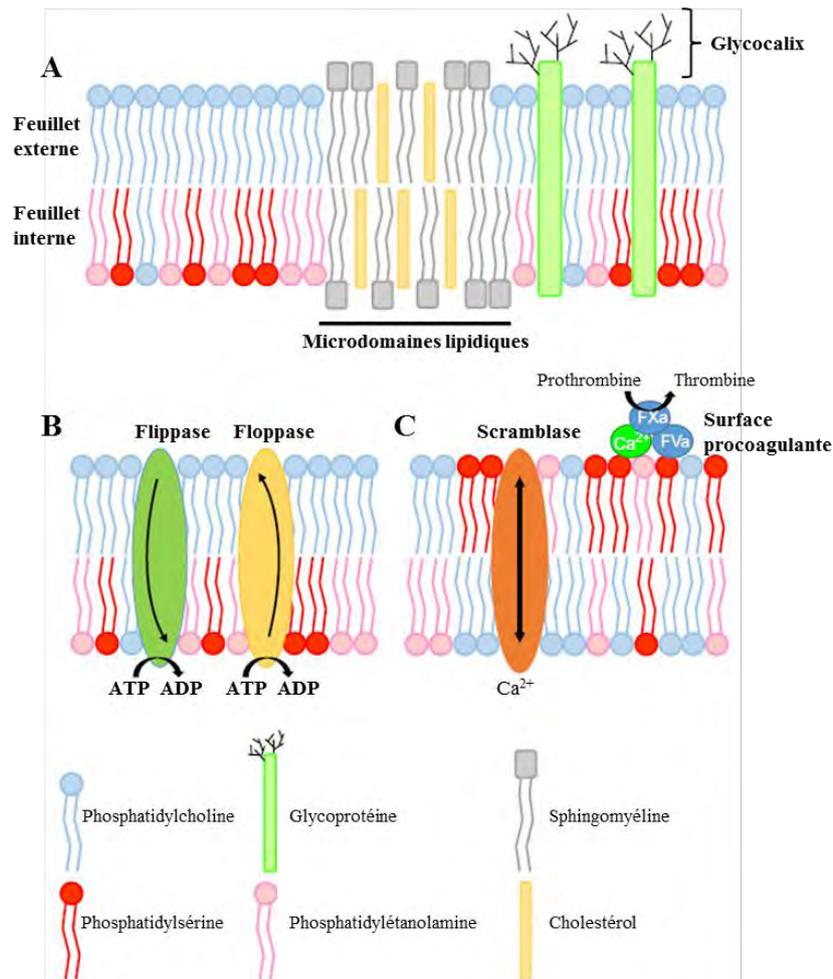


Figure 2 : Lipides de la membrane plasmique de la plaquette au repos. (A) Schéma de la membrane plasmique de la plaquette au repos : distribution asymétrique des lipides entre les feuillettes internes et externes. (B) Cet arrangement est maintenu par l'action des protéines flippases et floppases. (C) Dans les plaquettes activées, les enzymes scramblases servent de médiateurs aux réarrangements des phospholipides de la membrane plaquettaire générant une surface procoagulante (d'après Stevens, G. T. *The Structure of Resting and Activated Platelets*. in *Platelets*, 4th edition 47–77 (2019)).

Les récepteurs membranaires des plaquettes

La membrane plaquettaire est particulièrement riche en récepteurs. Certains sont spécifiques aux plaquettes, d'autres sont partagés avec un grand nombre de cellules dans l'organisme. Certains de ces récepteurs jouent un rôle majeur dans la fonction hémostatique des plaquettes, d'autres seraient impliqués dans des fonctions moins connues des plaquettes comme l'inflammation, les métastases tumorales ou encore la défense immunitaire.¹⁹

Parmi ces récepteurs, on peut citer : des intégrines (familles $\beta 1$, $\beta 2$ et $\beta 3$ dont l'intégrine $\alpha \text{IIb}\beta 3$), des récepteurs à séquences répétées riches en leucine (dont la glycoprotéine GPIb-IX-V), des récepteurs à sept domaines transmembranaires, des récepteurs de la superfamille des immunoglobulines, des tétraspanines, des récepteurs de la famille des lectines, des récepteurs de tyrosine kinase et d'autres (récepteur c-mpl à la TPO, récepteur au complément C1q, etc).

Les complexes glycoprotéiques GPIb-IX-V et GPIIb-IIIa sont deux récepteurs essentiels dans la fonction hémostatique des plaquettes.

Le complexe glycoprotéique GPIb-IX-V est constitué de quatre sous-unités : GPIb α , GPIb β , GPV, GPIX. Il existe environ 25 000 complexes GPIb-IX-V par plaquette. Le domaine N-terminal de la sous unité GPIb α contient des sites de liaison pour le facteur von Willebrand (VWF). Ce récepteur permet ainsi l'adhérence de la plaquette au sous endothélium vasculaire lésé par l'intermédiaire du VWF. La GPIb est connectée au cytosquelette de la plaquette et sa liaison au VWF engendre un signal aboutissant à la polymérisation des filaments d'actine et au changement de forme de la plaquette.²⁰

Le complexe glycoprotéique GPIIb-IIIa, ou $\alpha \text{IIb}\beta 3$, est le récepteur le plus abondant des plaquettes. On estime que la plaquette contient environ 80 000 récepteurs $\alpha \text{IIb}\beta 3$, 50 000 à la surface et 30 000 dans le système canaliculaire et la membrane des granules, et qui seront exposés à la surface des plaquettes lors de l'activation plaquettaire.²¹

L'activation plaquettaire induit comme message final l'activation massive des complexes $\alpha \text{IIb}\beta 3$ (« inside/out signaling ») qui vont pouvoir lier plusieurs protéines adhésives. Soit le fibrinogène lorsque les forces de cisaillement sont faibles, soit le VWF lorsque les forces de cisaillement sont élevées. Ces protéines adhésives vont pouvoir lier à leur tour d'autres

plaquettes et ainsi permettre la formation du clou plaquettaire. La rétractation du caillot qui intervient après la formation clou plaquettaire est également permise par la GPIIbIIIa qui après sa liaison au fibrinogène envoie un signal au cytosquelette plaquettaire (« outside/in signaling »).

Le système canaliculaire connecté à la surface (ou système canaliculaire ouvert : SCO)

Le SCO est constitué de profondes invaginations de la membrane plaquettaire dans le cytoplasme de la plaquette. Ces invaginations augmentent considérablement la surface plaquettaire totale et sert principalement de réservoir de membrane. Lors de l'activation plaquettaire, la plaquette s'étale sur les surfaces endommagées et émet de longs pseudopodes. Ce changement de forme rapide est possible grâce au réservoir de membrane fourni par le SCO. Celui-ci permet également un relargage plus rapide des granules et offre une surface d'échange plus important avec le milieu extérieur pour la capture de protéines plasmatiques (fibrinogène, ...).²²

Le système tubulaire dense

Contrairement au SCO, le système tubulaire dense est un système membranaire non connecté à la surface. Il dérive du réticulum endoplasmique lisse des mégacaryocytes. Ses fonctions principales sont le stockage des ions calcium (Ca^{2+})²³, avec les lysosomes et les mitochondries, ainsi que le lieu de synthèse des prostaglandines.²⁴

Le cytosquelette

Parmi les nombreux constituants du cytosquelette il est important de souligner le rôle des microtubules qui forment un anneau circonférentiel de 8 à 24 microtubules à la périphérie de la plaquette et qui maintiennent la forme discoïde des plaquettes au repos. Le réseau de microfilaments d'actine intervient lors de l'activation plaquettaire dans l'émission de pseudopodes, la contraction, la dégranulation et la rétraction du caillot (**figure 3**).

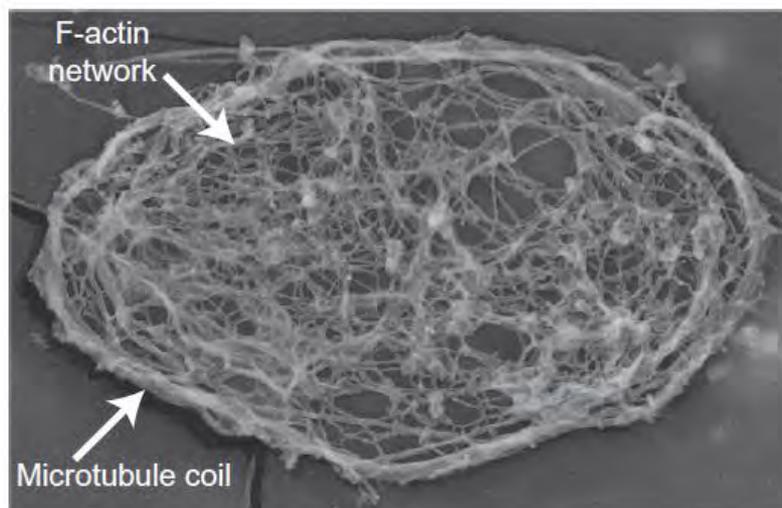


Figure 3 : Cytosquelette plaquettaire au repos. Réseau de microtubules et de filaments d'actine dans une plaquette au repos après avoir retiré la membrane plasmique, grossissement x22000 (d'après Stevens, G. T. The Structure of Resting and Activated Platelets. in Platelets, 4th edition 47–77 (2019)).

Les organites plaquettaires

Les plaquettes renferment dans leur cytoplasme des mitochondries, des grains de glycogène et plusieurs types de granules (les granules α , les granules denses et les lysosomes). Les granules α et les granules denses sont spécifiques des plaquettes et mégacaryocytes. Lors de l'activation plaquettaire, les granules sécrètent leur contenu par exocytose, fusionnant leur membrane à celle de la plaquette.²⁵

Granules α

Les granules α sont les organites les plus abondants (jusqu'à 200 par plaquette). Ils ont une taille de 200 à 500 nm. Ils sont le principal réservoir de protéines de la plaquette. Ils contiennent des protéines synthétisées au niveau des mégacaryocytes (β -thromboglobuline, le facteur 4 plaquettaire, le VWF), des protéines plasmatiques incorporées passivement (albumine, immunoglobuline) ou activement via des récepteurs membranaires spécifiques (fibrinogène via le récepteur GPIIb-IIIa) à partir du plasma. Un marqueur spécifique de la membrane des granules α est la P-sélectine (CD62). Il est aisément identifiable en cytométrie en flux et sa présence à la surface des plaquettes témoigne de l'activation plaquettaire.²⁶

Granules denses (granules δ)

Les granules denses (ou granules δ) sont beaucoup moins nombreux que les granules α (3 à 8 par plaquette). Les granules denses sont de forme ovale, d'une taille d'environ 150 nm de diamètre et présentent une forte densité en microscopie électronique (**figure 4**). Ils contiennent des cations (principalement du Ca^{2+}), des polyphosphates, de l'ATP et de l'ADP à de fortes concentrations ainsi que de la sérotonine. De façon similaire au CD62 pour les granules α , la granulophysine (ou CD63) est un marqueur de la membrane du granule dense. Le CD63 est également retrouvé à la surface des lysosomes.²⁷

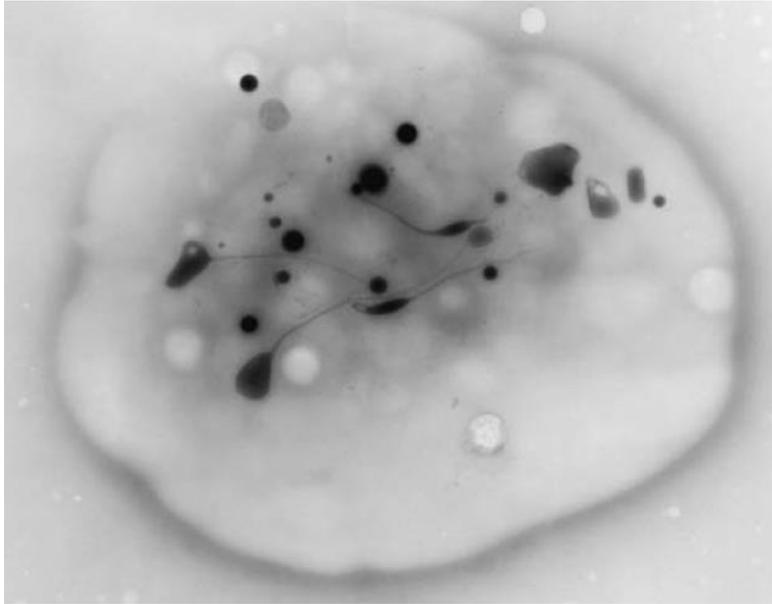


Figure 4 : Granules denses plaquettaire en whole mount electron microscopy (d'après Hayward, C. P. M. et al. Results of an external proficiency testing exercise on platelet dense-granule deficiency testing by whole mount electron microscopy. Am. J. Clin. Pathol. 131, 671–675 (2009)).

Lysosomes (granules λ)

Les lysosomes sont de forme arrondie, d'une taille d'environ 150 nm de diamètre et contiennent principalement des enzymes de dégradation. Leur rôle dans l'hémostase reste obscur. Durant l'activation plaquettaire le contenu lysosomal pourrait être excrété, permettant la dégradation de protéines et de composants extracellulaires afin d'assurer les processus hémostatiques.²⁸

Autres composants de la plaquette

Un petit nombre de mitochondries contribuent au métabolisme énergétique. Des grains de glycogène en quantité importante sont souvent regroupés en amas. Il resterait dans la plaquette quelques ribosomes, ainsi que de faibles quantités d'acide ribonucléique (ARN) messenger. La plaquette, bien que dépourvue de noyau, est encore capable de synthétiser quelques protéines.^{29–31}

D. Fonctions plaquettaires

Le rôle majeur des plaquettes est d'assurer la formation du clou plaquettaire lors de l'hémostase primaire et de supporter les différentes étapes de la coagulation. Cependant, les plaquettes sont impliquées dans de nombreux autres processus physiologiques ou physiopathologiques tels que la réparation des vaisseaux sanguins, la thrombose, l'inflammation et même la progression tumorale.³²

Rôle dans l'hémostase primaire

Sur les sites de lésion vasculaire, les plaquettes ont pour fonction principale de s'activer et de s'agréger afin de former un « bouchon » hémostatique et de rétablir une circulation sanguine normale. A l'état physiologique, l'endothélium vasculaire possède de remarquables propriétés anti thrombotiques. Il sécrète du monoxyde d'azote (NO), puissant vasodilatateur³³ et inhibiteur indirect de l'élévation de calcium intra plaquettaire nécessaire à l'activation plaquettaire.³⁴ Les cellules endothéliales synthétisent également de la prostacycline qui, *via* les récepteurs couplés aux protéines G, augmente le taux intra plaquettaire d'AMPc et inhibe également l'augmentation de calcium intra plaquettaire.³⁵ Enfin les cellules endothéliales produisent une NTPDase (CD39) qui réduit les niveaux d'ADP et augmente la formation d'AMPc.³⁶

A l'inverse, le sous endothélium est fortement thrombogène. La formation du thrombus primaire dépend essentiellement des plaquettes qui subissent plusieurs transformations séquentiellement ou simultanément. On décrit habituellement l'adhérence, l'activation, la sécrétion et l'agrégation des plaquettes, que l'on peut compléter par la phase de rétraction du caillot.³⁷

Adhérence des plaquettes

Lors d'une brèche vasculaire, les plaquettes vont ralentir et adhérer au sous-endothélium exposé en liant des constituants de la matrice comme le collagène et le VWF par l'intermédiaire de ses récepteurs membranaires.

Le VWF est un acteur intermédiaire primordial entre le collagène et les plaquettes. Il provient de la synthèse des cellules endothéliales, du plasma, ou des granules α plaquettaires après sécrétion.³⁸ Le collagène exposé du sous endothélium vasculaire se lie au VWF par son domaine A3. Celui-ci va ensuite changer de conformation et exposer son domaine A1 qui pourra lier les plaquettes via leurs récepteurs GPIb-IX-V. Ces plaquettes, ralenties sur le site de brèche vasculaire, vont pouvoir se lier à d'autres substances adhésives afin de s'accrocher fermement et d'initier la formation d'un thrombus plaquettaire. Des forces de cisaillement élevées, retrouvées dans les flux artériels ou dans les petits vaisseaux favorisent la concentration des globules rouges au centre des vaisseaux et celle des plaquettes en périphérie ce qui augmente leur probabilité de rencontre avec un endothélium lésé.

L'adhérence stable des plaquettes au sous endothélium est assurée par l'intermédiaire des récepteurs GPVI, GPIa-IIa et dans une moindre mesure GPIV, qui vont pouvoir se lier aux différents types de collagène du sous endothélium. L'adhérence des plaquettes entraîne leur activation irréversible par l'exposition de leurs récepteurs GPIIb-IIIa activés et leur agrégation principalement par l'intermédiaire du fibrinogène et du VWF.

Voies d'activation plaquettaire

Les voies d'activation plaquettaire impliquées dans l'adhérence passent par l'activation de récepteurs membranaires de type intégrines ou d'immuno-récepteurs à motifs ITAM (immuno-tyrosine based activation motifs). Parmi les récepteurs couplés aux motifs ITAM, on

peut citer notamment le récepteur GPVI au collagène (pouvant se lier également à la laminine, au fibrinogène et à la fibrine)³⁹ et le récepteur FcγRIIa aux fragments Fc des IgG. En aval des motifs ITAM, la suite de la signalisation fait intervenir des Src kinases (Lyn et Fyn) qui recrutent la tyrosine kinase Syk aboutissant à l'activation de la phospholipase C γ 2 (PLC γ 2) et à la mobilisation des stocks de calcium intra cellulaire.⁴⁰

Les médiateurs solubles, principalement la thrombine, le thromboxane A2 (TXA2) et l'ADP activent des récepteurs couplés aux protéines G hétérotrimériques (RCPG). En aval de ces récepteurs à sept domaines transmembranaires, la protéine G, composé des sous unités α , β et γ , joue un rôle central dans les mécanismes d'activation de la plaquette. Après activation des RCPG par leur agoniste, la sous unité α perd sa molécule de guanosine diphosphate (GDP), qui est remplacée par une molécule de guanosine triphosphate (GTP). Ce switch α GDP – α GTP dissocie les sous unités α , β et γ qui pourront alors servir de messagers spécifiques.⁴¹

La sous unité $G_{\alpha q}$ est activée par les récepteurs PAR1-4 à la thrombine, P2Y1 à l'ADP, TP α/β au TXA2 et 5-HT_{2a} à la sérotonine (5HT). $G_{\alpha q}$ active la phospholipase C β (PLC β) qui hydrolyse le phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP₂) de la membrane et produit deux seconds messagers : l'inositol-1,4,5-trisphosphate (IP₃) et le diacylglycérol (DAG). La PLC β peut aussi être activée par les sous unités β et γ de la protéine G.⁴²

L'IP₃ est responsable de l'augmentation de la concentration cytosolique de Ca²⁺, essentielle pour l'activation des plaquettes. La concentration de Ca²⁺ libre cytosolique est maintenue activement à environ 0,1 μ M dans les plaquettes au repos, et augmente drastiquement à plus de 1 μ M après activation. La première source de calcium contenue dans le système tubulaire dense (STD) des plaquettes est libérée par le médiateur IP₃. Une fois les réserves de calcium du STD épuisées, la protéine STIM1 de la membrane du STD se lie au récepteur membranaire ORAI1 permettant l'entrée supplémentaire de Ca²⁺.⁴³

L'augmentation de la concentration de Ca^{2+} active la protéine CalDAG-GEFI qui permet à RAP1/2 de passer à sa forme active : RAP1/2-GTP. A son tour, RAP1/2-GTP active les protéines talin et kindlin qui interagiront directement avec les intégrines membranaires $\alpha IIb\beta 3$ permettant leur activation, leur regroupement et ainsi l'agrégation des plaquettes entre elles.⁴⁴ Cette signalisation aboutissant à l'activation des intégrines $\alpha IIb\beta 3$ est appelée « inside/out signaling ».⁴⁵

Le DAG active lui la protéine kinase C (PKC), dont la mission est de phosphoryler de nombreuses protéines nécessaires à la sécrétion plaquettaire et, dans une moindre mesure, de participer à l'activation de RAP1.⁴⁶

Deux autres sous unités de la protéine G, $G_{\alpha i}$ et $G_{\alpha z}$, activées respectivement par le récepteur P2Y₁₂ à l'ADP et le récepteur adrénergique α_{2A} à l'épinéphrine, permettent quant à elles, une inhibition de l'adénylate cyclase (AC). A l'état physiologique, l'AC active en permanence l'ATP en AMPc, inhibant l'élévation du Ca^{2+} intra plaquettaire et empêchant donc l'activation plaquettaire.⁴⁷

La sous unité $G_{\alpha i}$, ainsi que les sous unités G_{β} et G_{γ} sont également capable d'activer la phosphoinositide 3-kinase (PI3-K) permettant la production de phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate (PIP_3) à partir du PIP_2 membranaire. Le PIP_3 possède deux effets connus à ce jour dans la signalisation plaquettaire. Il inhibe RASA3 qui, dans les plaquettes au repos, empêche l'activation de RAP1/2 et maintient l'état inactif de la plaquette.⁴⁸ Le deuxième effet du PIP_3 est l'activation d'AKT, dont le rôle dans l'activation plaquettaire reste à ce jour non parfaitement élucidé.⁴⁹

Enfin la sous unité $G_{\alpha 13}$, activée par les récepteurs à la thrombine et au thromboxane A₂, active la protéine Rho qui enclenche la cascade ROCK. Celle-ci permet principalement le

changement de forme de la plaquette et la sécrétion granulaire par l'activation de l'actine et de la myosine, en collaboration avec l'augmentation intra plaquettaire de calcium.⁴⁷

Les médiateurs de l'agrégation plaquettaire activent également la phospholipase A2 (PLA2). Celle-ci clive les phospholipides membranaires, qui libèrent de l'acide arachidonique. L'acide arachidonique est transformé par la cyclo oxygénase 1 (COX-1) en prostaglandine H2 ou G2 (PGH2 et PGG2). La PGH2 est ensuite métabolisée en TXA2 par la thromboxane synthétase.⁵⁰ Une fois formé, le TXA2 peut diffuser hors de la plaquette, activant des récepteurs proches de manière autocrine ou paracrine avant d'être hydrolysé en TXB2 inactif. Bien que le TXA2 soit un puissant activateur plaquettaire, sa demi-vie en solution aqueuse est limitée.

En l'absence de brèche vasculaire, des voies inhibitrices maintiennent les plaquettes dans un état de repos dans la circulation sanguine. Ce sont essentiellement des récepteurs couplés aux protéines G comme les récepteurs de la prostacycline (PGI₂) ainsi que des immuno-récepteurs à motifs ITIM (immuno-tyrosine based inhibition motifs) (PECAM) qui participent à cette action inhibitrice. La prostacycline, sécrétée par l'endothélium sain agit en stimulant l'adénylate cyclase et la production intracellulaire d'AMP cyclique.⁵¹ De même, le monoxyde d'azote (NO) inhibe les plaquettes en stimulant une guanylate cyclase et la production de GMP cyclique.⁵²

On peut ainsi résumer le rôle physiologique de chaque agoniste (**figure 5**) :

- Le collagène : active le récepteur GPVI, couplé aux motifs ITAM qui emprunte la cascade Syk et active la PLC γ 2 aboutissant à une augmentation du calcium intra plaquettaire.

- L'ADP : active les récepteurs P2Y1 et P2Y12, couplés aux protéines G. P2Y1 active la sous unité $G\alpha_q$ permettant principalement l'augmentation de calcium intra plaquettaire et l'activation de la GPIIb-IIIa. P2Y12, couplé à la sous unité $G\alpha_i$ intervient dans l'inhibition de l'AC et de l'AMPc.
- La thrombine : active les récepteurs PAR1 et 4 couplés aux protéines G. C'est l'activateur plaquettaire le plus puissant. PAR1 et 4 activent les sous unités $G\alpha_q$ et $G\alpha_{13}$. Cette dernière entraîne le changement de forme de la plaquette et la sécrétion granulaire par la cascade Rho.
- Le TXA2 via ses récepteurs TP α/β active les sous unités $G\alpha_q$ et $G\alpha_{13}$.
- La sérotonine via son récepteur 5-HT_{2a} active également la sous unité $G\alpha_q$.
- L'épinéphrine, via son récepteur α_{2A} adrénergique est capable d'activer la sous unité $G\alpha_z$ qui comme la sous unité $G\alpha_i$ inhibe la production d'AC et d'AMPc.
- Enfin la prostacycline, par l'intermédiaire de la sous unité $G\alpha_s$, active l'axe AC-AMPc et joue un rôle de régulation négative de l'activation plaquettaire.

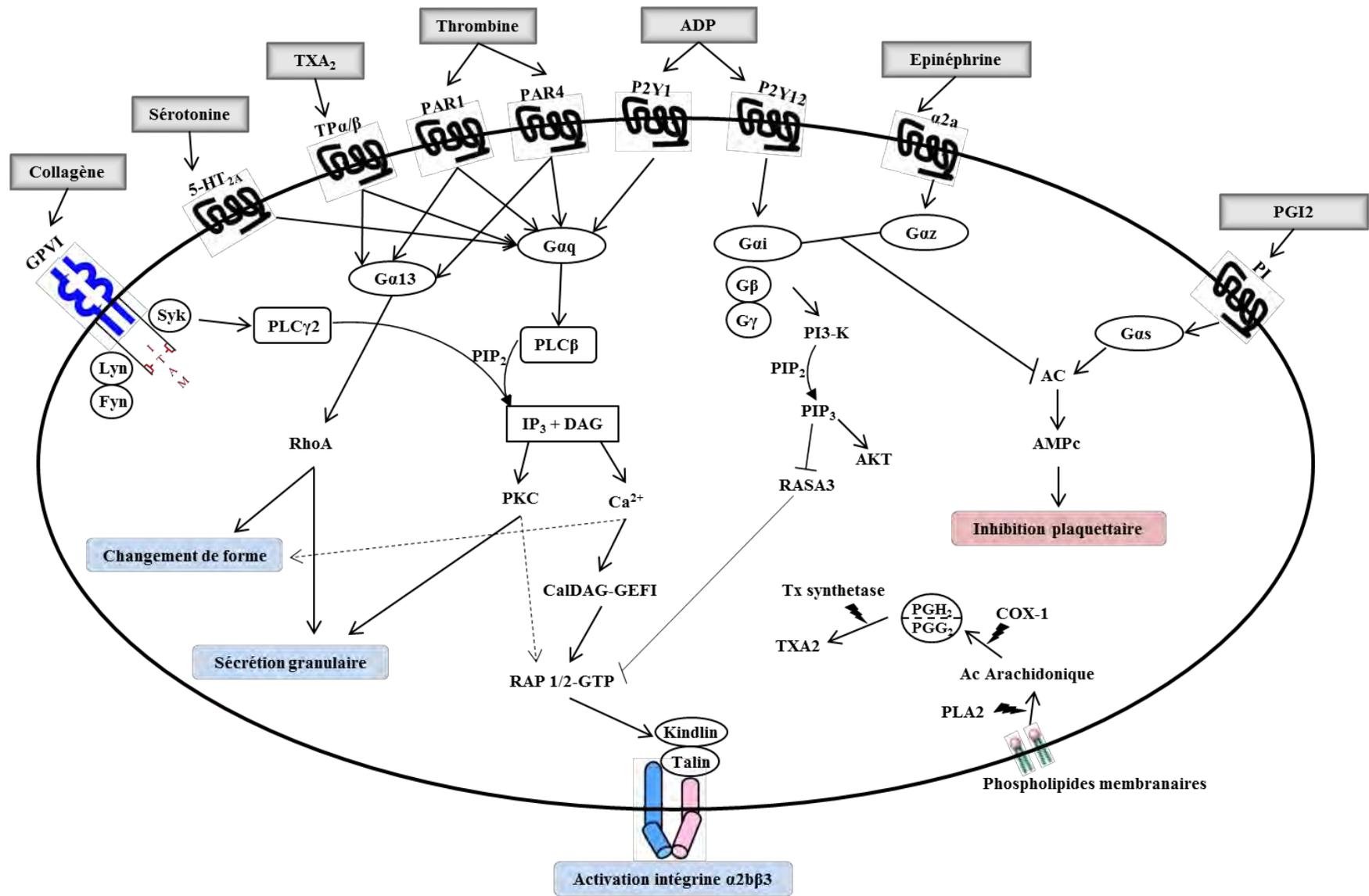


Figure 5 : Schéma des voies d'activation plaquettaire.

La sécrétion plaquettaire

L'activation plaquettaire entraîne la contraction des plaquettes, une centralisation des granules ainsi que la sécrétion de leur contenu à l'extérieur de la plaquette par fusion avec la membrane plasmique ou avec le système canaliculaire ouvert.⁵³ Les substances libérées sont biologiquement actives et constituent une rétro régulation positive pour renforcer l'adhérence, l'agrégation et la sécrétion des plaquettes. Certaines molécules peuvent influencer la coagulation (facteur V, fibrinogène, VWF), ou encore modifier la perméabilité vasculaire (VEGF) ainsi que le tonus vasculaire (sérotonine).

L'agrégation plaquettaire

L'agrégation plaquettaire se produit lorsque les glycoprotéines adhésives (essentiellement le fibrinogène et le VWF) se lient sur la GPIIb-IIIa de deux plaquettes différentes établissant des ponts inter plaquettaires. La liaison du complexe au fibrinogène s'effectue par reconnaissance des séquences d'acides aminés particulières : RGD. Le VWF, la fibronectine et la vitronectine, qui possèdent aussi cette séquence peptidique, peuvent se substituer ou agir en concertation avec le fibrinogène et provoquer l'agrégation. Lorsque les forces de cisaillement sont élevées, le VWF est considéré comme l'acteur le plus important en initiant les contacts plaquette-plaquette.⁵⁴ La liaison du complexe GPIIb-IIIa à ces ligands nécessite une modification conformationnelle consécutive à l'activation plaquettaire. Ce processus de liaison récepteur-ligand se répète, ce qui entraîne le recrutement des couches supplémentaires de plaquettes et finalement, la formation d'un bouchon hémostatique.

Plaquettes et coagulation

La "fonction procoagulante" des plaquettes fait référence à leur capacité d'exposer la phosphatidylsérine (PS) chargée négativement à leur membrane externe après activation, ce qui permet de localiser les complexes ténases et prothrombinases de la coagulation à proximité du caillot sanguin en formation.⁵⁵ L'exposition de la PS n'est possible qu'avec des taux très élevés de calcium intra plaquettaire, ce qui est atteint avec l'association du relargage de calcium du STD et de l'entrée de calcium par l'action combinée des protéines STIM1 et ORAI1.⁴³ La suite du signal fait intervenir la cascade CalDAG-GEFI et RAP1.

La double valence positive des ions calcium leur permet de lier les charges négatives des aminophospholipides membranaires comme la PS aux charges négatives de facteurs de coagulation, en particulier les quatre protéines de coagulation vitamine K-dépendantes (facteurs II, VII, IX et X). Ces interactions permettent de fixer et concentrer les facteurs de la coagulation sur la surface plaquettaire, ce qui accélère la génération de thrombine, qui, outre son rôle central dans la coagulation, permet aussi d'amplifier l'agrégation plaquettaire.

Autres rôles des plaquettes

Du fait de leur contenu granulaire extrêmement riche, les plaquettes sont impliquées dans de nombreux processus physiopathologiques autres que l'hémostase.

- Rôle immunologique : les plaquettes peuvent piéger les bactéries via leurs récepteurs TLR4. Les plaquettes activées produisent des cytokines et chemokines pour le recrutement des neutrophiles et favorisent la présentation d'antigène des cellules dendritiques aux lymphocytes T.⁵⁶

- Rôle dans l'inflammation : les plaquettes peuvent interagir avec les monocytes et les neutrophiles, permettant leur recrutement sur les sites de lésion vasculaire et participant à leur rôle dans la défense de l'hôte et la réparation tissulaire.⁵⁷
- Rôle dans les processus tumoraux : en se liant aux cellules métastatiques dans la circulation sanguine, les plaquettes forment des microthrombi qui immobilisent et favorisent la pénétration des cellules malignes dans les tissus, en plus de les masquer partiellement aux cellules du système immunitaire. Les plaquettes sont également une source importante de facteur pro angiogéniques contenus dans leurs granules, favorisant l'angiogénèse et la croissance tumorale.⁵⁸
- Rôle des plaquettes dans l'athéromatose : il est bien établi que par leurs interactions avec les cellules endothéliales et le relargage de leur contenu granulaire riche en cytokines pro inflammatoires, les plaquettes jouent un rôle important dans le développement des maladies athéromatotiques.⁵⁹

E. Exploration des pathologies plaquettaires

Avant toute exploration biologique des plaquettes, il est indispensable de préciser le contexte clinique qui justifie la venue du patient. L'interrogatoire et l'examen clinique sont des éléments tout aussi importants que les analyses biologiques pour établir un diagnostic fiable.

L'interrogatoire personnel du patient précisera les antécédents hémorragiques et en particulier la présence de saignements cutanéo muqueux (purpura, épistaxis, gingivorragie, saignements prolongés aux coupures, méno-métrorragies chez les femmes), leur fréquence et leur gravité. Les antécédents médicaux et chirurgicaux peuvent également orienter le diagnostic. Une recherche minutieuse de toute prise médicamenteuse ou autre substance active pouvant modifier les fonctions (aspirine, AINS, Inhibiteurs Sélectifs de la Recapture de la Sérotonine

(ISRS)) ou le nombre des plaquettes (antibiotiques type céphalosporines, ...) doit systématiquement être menée.

L'élaboration de scores hémorragiques permet de mieux graduer les profils hémorragiques des patients dans les études de recherche et dans la pratique clinique. Ces scores sont utilisés pour les pathologies hémorragiques⁶⁰⁻⁶² mais également dans la surveillance des traitements anticoagulants (score HAS-BLED)⁶³, ou encore la quantification des pertes sanguines lors des menstruations (score HIGHAM).⁶⁴ Le score hémorragique élaboré par l'ISTH-SCC a été validé récemment pour le diagnostic des pathologies plaquettaires.⁶² Celui-ci peut aller de 0 à 56 chez les femmes et de 0 à 48 chez les hommes, sur la base d'un score maximal de 4 dans 14 catégories distinctes évaluant différents types de saignements (**annexe 1**).

L'examen clinique recherchera la présence d'un caractère syndromique associant des anomalies de la numération ou des fonctions plaquettaires à des anomalies touchant d'autres organes et, notamment la présence de symptômes dysmorphiques.

La recherche d'antécédents hémorragiques familiaux est également primordiale afin d'orienter vers des pathologies hémorragiques héréditaires. La réalisation d'un arbre généalogique et sa mise à jour sont indispensables.

Analyses biologiques simples:

Pour réaliser la numération plaquettaire, le sang est recueilli dans des tubes contenant un chélateur du calcium, l'éthylène diamine tétra-acétique (EDTA). L'analyse de la numération plaquettaire sur tube citraté est nettement moins précise, entre autres car le prélèvement est partiellement dilué par l'anticoagulant liquide. Elle doit être exclusivement réservée aux patients présentant une pseudo thrombopénie à l'EDTA. Celle-ci consiste en un artéfact

technique lié à l'agglutination des plaquettes ou au satellitisme plaquettaire en présence d'EDTA.

Les analyseurs automatisés utilisent différentes méthodologies pour compter les plaquettes : par impédancemétrie, par analyse optique ou par détection immunologique. La méthode la plus souvent utilisée, par impédance, peut être mise en défaut avec la mise en évidence de fausses thrombopénies chez des patients présentant des plaquettes de taille augmentée ou de taille diminuée, et qui ne seront pas comptées comme telles. A l'inverse en présence de schizocytes ou, exceptionnellement, de cryoglobulines, ceux-ci pourront être comptabilisés à tort comme des plaquettes, augmentant artificiellement la numération plaquettaire.⁶⁵

Concernant les pathologies hémorragiques, la numération plaquettaire doit toujours être analysée en association au volume plaquettaire moyen (VPM). Celui-ci est déduit par l'automate de la courbe de répartition de la taille des plaquettes. Le VPM permet de différencier les pathologies plaquettaires associées à des plaquettes de taille diminuée (micro thrombopathie), de taille augmentée (macro thrombopathie) ou de taille normale.⁶⁶

Un autre paramètre fourni par certains analyseurs hématologiques et qui peut aider au diagnostic devant l'apparition d'une thrombocytopénie est la fraction plaquettaire immature (FPI). Les plaquettes contiennent de l'ARN qui se perd progressivement au fur et à mesure de leur circulation. Au-delà d'un certain seuil d'ARN contenu dans les plaquettes, on parle de plaquettes immatures. Cette FPI est détectée à l'aide de colorants fluorescents colorant l'ARN. En cas de thrombocytopénie associée à un pourcentage accru de FPI, on s'orientera vers des thrombopénies de consommation ou de récupération. En revanche, des valeurs faibles de FPI orienteront plutôt vers des pathologies de production des plaquettes.^{67,68} Enfin l'examen morphologique des plaquettes sur frottis sanguin constitue une étape importante dans la validation biologique d'une thrombopénie. Le frottis sanguin se fait à partir d'un tube de sang prélevé en présence d'EDTA et coloré au May-Grünwald Giemsa (MGG). Les frottis doivent

être réalisés le plus rapidement possible après le prélèvement. En dehors des pseudo thrombopénies à l'EDTA, très fréquentes, certains aspects morphologiques caractéristiques des plaquettes en microscopie optique permettent presque à eux seuls d'identifier des pathologies plaquettaires. Entre autre, on peut citer l'aspect de plaquettes vides dans le syndrome des plaquettes grises, les plaquettes géantes associées à des inclusions leucocytaires dans les syndromes MYH9, un granule α géant unique dans le syndrome Paris-Trousseau (**figure 6**), etc.^{69,70} En raison de la petite taille des plaquettes et du caractère potentiellement fluctuant des anomalies plaquettaires, l'examen morphologique du frottis sanguin doit être réalisé par des praticiens aguerris et doit porter sur un nombre suffisant d'éléments.

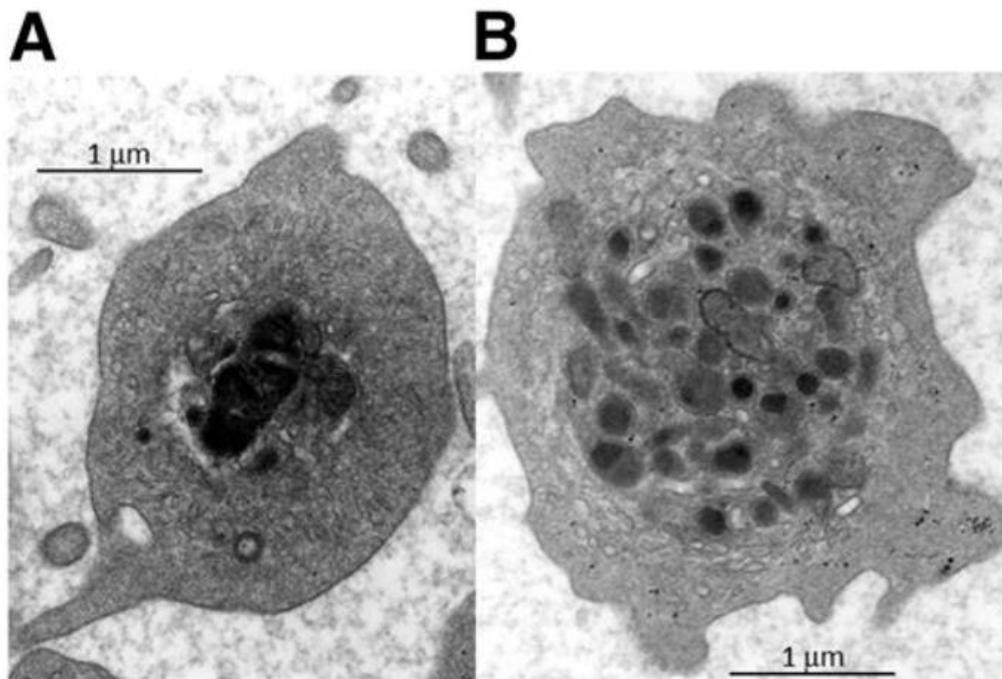


Figure 6 : Granule α géant unique. A : En microscopie électronique, présence d'un granule α géant chez un patient atteint du syndrome de Paris-Trousseau. B : Plaquette normale en microscopie électronique (d'après Stevenson, W. S. et al. Paris-Trousseau thrombocytopenia is phenocopied by the autosomal recessive inheritance of a DNA-binding domain mutation in FLII. Blood 126, 2027–2030 (2015)).

Analyses biologiques spécialisées

Le temps d'occlusion plaquettaire

Les analyseurs PFA-100® ou PFA-200® (qui sont une alternative au temps de saignement par méthode Ivy) permettent de mesurer « un temps de saignement in vitro ». Techniquement, du sang total prélevé sur tube citraté est aspiré dans des conditions rhéologiques standardisées à travers un capillaire et débouche sur une membrane percée recouverte de collagène ainsi que d'un activateur plaquettaire : soit de l'épinéphrine (PFA E), soit de l'ADP (PFA A). Les agonistes activent les plaquettes, qui forment un thrombus au niveau de la membrane et arrêtent le flux sanguin. Le sang est soumis dans ce système à des forces de cisaillement élevées, c'est donc principalement le VWF qui joue le rôle de pont entre les plaquettes. Une thrombopénie (moins de 80 G/L) ou une anémie (hématocrite < 20%) se traduisent par un allongement des temps d'occlusion plaquettaire (TOP) et rendent l'analyse ininterprétable.⁷¹ Cette analyse est particulièrement performante pour le dépistage de la maladie de Willebrand (VWD) avec une valeur prédictive négative excellente de 99,9%. La sensibilité d'un temps d'occlusion plaquettaire anormal pour la VWD (en excluant le sous type 2N) est également de 99,3%.⁷² Alors qu'il est très sensible pour les atteintes plaquettaires très sévères comme la Thrombasthénie de Glanzmann ou la maladie de Bernard-Soulier, le temps d'occlusion plaquettaire est un outil assez médiocre dans le dépistage des thrombopathies modérées et mineures.⁷³

Etude de l'agrégation plaquettaire

L'étude des fonctions plaquettaires par agrégométrie spectrophotométrique (Light transmission agregometry, LTA) développée par Gustav Born dans les années 1960⁷⁴, reste à ce jour le test de référence pour l'évaluation des fonctions plaquettaires.⁷⁵⁻⁷⁸ Parmi les

avantages de cette technique, on peut citer sa relative simplicité, la possibilité de suivre la réponse aux différents agonistes dans le temps, sa reproductibilité et la possibilité de coupler l'analyse à la sécrétion d'ATP en temps réel en lumi agrégométrie. Malheureusement plusieurs inconvénients rendent la réalisation et l'interprétation de ce test parfois délicates, notamment le fait de devoir travailler sur des plaquettes fraîches, la variabilité imputable à l'opérateur, et l'interprétation des tracés parfois variable selon les équipes.⁷⁹ En effet, les nombreuses voies de rétroaction dans l'activation des plaquettes rendent complexe l'interprétation des courbes d'agrégation plaquettaire qui ne s'inscrivent pas dans des pathologies bien déterminées.

Le sang est recueilli dans des tubes citratés et l'analyse doit être réalisée au maximum dans les quatre heures suivant le prélèvement. L'analyse est réalisée sur du plasma riche en plaquette (PRP) obtenu après centrifugation lente du sang total. La transmission lumineuse est enregistrée dans le temps. L'agrégation plaquettaire est détectée par une augmentation de la transmission lumineuse à travers la suspension plaquettaire.

Le tracé d'agrégation est calibré entre 0% d'agrégation (correspondant au PRP, absence de transmission lumineuse) et 100% d'agrégation (correspondant au PPP, transmission maximale de la lumière). L'ajout d'un agoniste au PRP entraîne une activation plaquettaire, modifiant à la fois le milieu réactionnel et la transmission lumineuse, enregistrée par l'automate. L'analyse est réalisée sur 10 minutes. Différents paramètres sont analysables : la phase de latence, le changement de forme plaquettaire, la vitesse ou pente d'agrégation, l'agrégation primaire et secondaire, la réversibilité et l'amplitude maximale de l'agrégation (**figure 7**). Certains automates calculent également l'aire sous la courbe à 4 minutes.⁷⁶

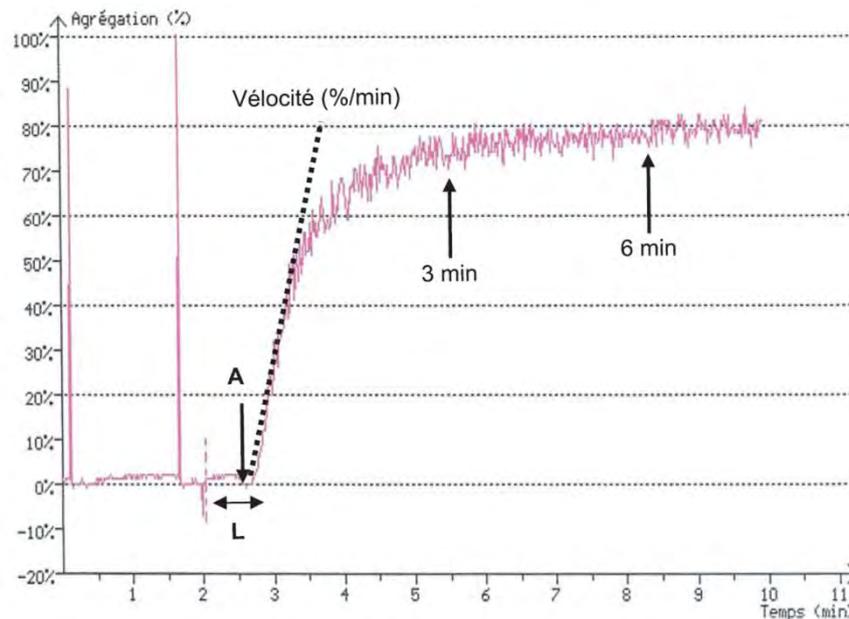


Figure 7 : Tracé d'un test d'agrégation plaquettaire. Exemple d'un test d'agrégation plaquettaire réalisé en PRP avec le collagène 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ comme agoniste (A). Les principaux modes d'expression du résultat sont : le temps de latence (L), l'agrégation à 3 minutes (73 %), à 6 min (77 %), l'agrégation maximale (79 %). Il est également possible de calculer la vélocité initiale et l'aire sous la courbe (d'après Gaussem P, *Thérapie*, 2006, 61 (5) : 395 – 400).

Différents agonistes plaquettaire sont couramment utilisés. On peut différencier les agonistes faibles des agonistes forts (**figure 8**) :

- Les agonistes faibles comme l'épinéphrine et l'ADP présentent une agrégation biphasique. La première phase correspond à l'agrégation des plaquettes stimulées par l'inducteur. La deuxième phase correspond à la production de TXA2 à partir des phospholipides membranaires et à la libération du contenu granulaire (en particulier l'ADP contenu dans les granules denses), qui vont pouvoir aller stimuler et faire agréger d'autres plaquettes.⁸⁰ À forte concentration ($> 5\mu\text{M}$), la première et la deuxième vague d'agrégation à l'ADP fusionnent ce qui peut donner un aspect d'agrégation monophasique.⁸¹
- Avec les agonistes forts (collagène, acide arachidonique, TRAP (Thrombin Receptor Activating Peptides)), la production de TXA2 et la libération du contenu granulaire se

fait en même temps et indépendamment de l'agrégation plaquettaire. Les courbes d'agrégation plaquettaire présentent donc un aspect monophasique.

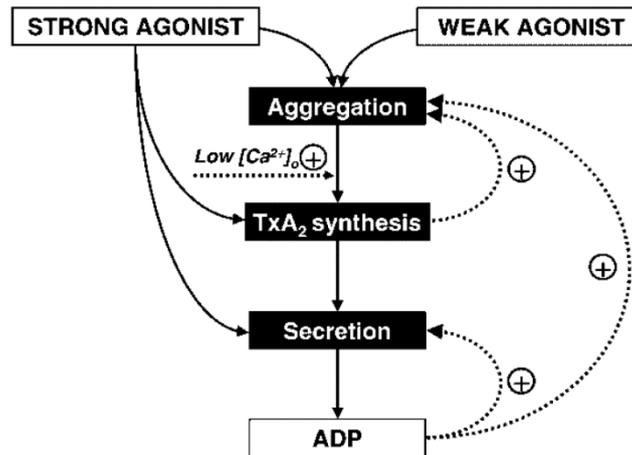


Figure 8 : Mécanismes d'action des agonistes plaquettaire forts et faibles. La réponse d'agrégation des plaquettes aux agonistes est amplifiée par la production de TXA2 à partir des phospholipides membranaires et la sécrétion d'ADP par les granules denses plaquettaire (d'après Cattaneo, M. Light transmission aggregometry and ATP release for the diagnostic assessment of platelet function. *Semin. Thromb. Hemost.* 35, 158–167 (2009)).

D'autres agonistes forts, comme le CRP (Collagen Related Peptides), le U46619 (analogue stable du TXA2) ou encore le ionophore de calcium, peuvent être utilisés dans les laboratoires spécialisés dans le diagnostic des maladies plaquettaire pour préciser les anomalies des fonctions plaquettaire.

A partir des tracés des agrégations plaquettaire aux différents agonistes, il est possible d'identifier des anomalies de récepteurs ou de voies de signalisation (**figure 9**).

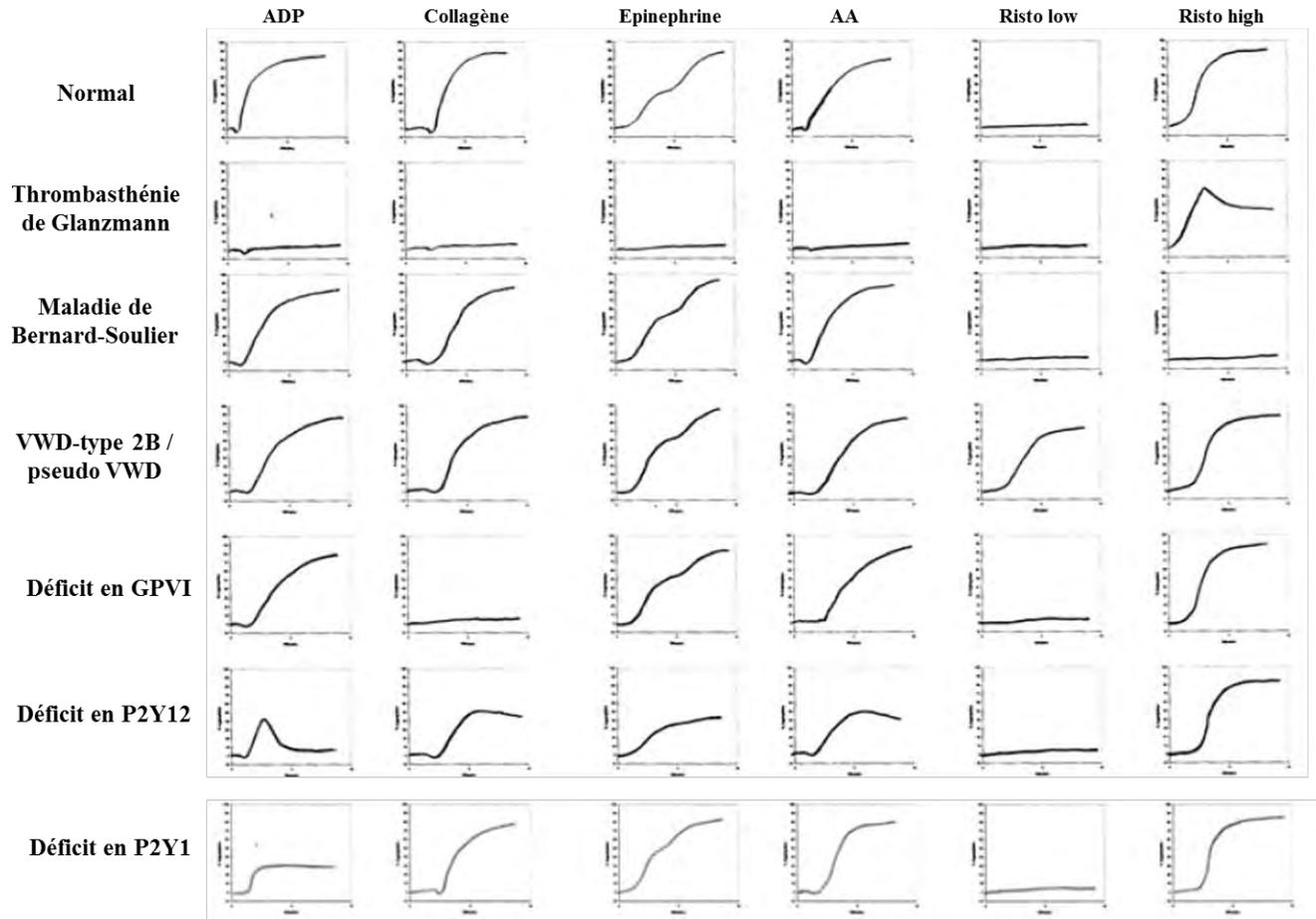


Figure 9 : Courbes d'agrégation plaquettaire selon les atteintes. AA : acide arachidonique, Risto low : ristocétine faible dose, Risto high : ristocétine forte dose) (d'après Harrison, P. et al. Guidelines for the laboratory investigation of heritable disorders of platelet function. Br. J. Haematol. 155, 30–44 (2011)).

Au-delà de ces anomalies facilement identifiables, on peut aussi distinguer à partir des courbes d'agrégation plaquettaire, des anomalies plus fines des voies de signalisation plaquettaire (**figure 10**).

- Anomalies de signalisation de la protéine G α i : ce sous-groupe présente un défaut d'agrégation et de sécrétion à l'ADP et l'épinéphrine, dont les récepteurs hétérotrimériques activent la protéine G α i. Une caractéristique clé du diagnostic est l'association de deux anomalies : une agrégation transitoire à l'ADP avec à l'épinéphrine une agrégation primaire réduite ou absente sans deuxième vague. Une réduction de l'agrégation et de la sécrétion à des concentrations faibles et

intermédiaires d'autres agonistes plaquettaires (notamment le collagène) peut être observée, ce qui est cohérent avec l'altération du rôle d'amplification de l'ADP. Une réponse robuste à l'acide arachidonique 1mM permet de distinguer les anomalies de signalisation de la protéine G α i des anomalies concernant la voie du TXA $_2$.⁸²

- Anomalies de la voie du thromboxane A $_2$: Ces anomalies se caractérisent par un défaut marqué et sélectif d'agrégation à l'acide arachidonique (1mM). Une réponse d'agrégation normale à l'U46619 (mimétique stable du TXA $_2$) est la preuve d'un défaut de conversion de l'acide arachidonique en TXA $_2$. Une réponse altérée au U46619 témoigne au contraire d'anomalies au niveau du récepteur au TXA $_2$ ou de sa cascade de signalisation en aval. Des anomalies d'agrégation à de faibles concentrations d'autres agonistes plaquettaires sont également observables puisque le TXA $_2$ possède un effet rétroactif positif dans l'agrégation plaquettaire.⁸²
- Anomalies des granules denses et de leurs voies de signalisation : les patients atteints de ces anomalies présentent une réduction de l'agrégation à de faibles concentrations de la plupart des agonistes plaquettaires. Typiquement, l'agrégation à l'ADP n'est touchée que de façon minime. En effet, la deuxième vague d'agrégation à l'ADP est dépendante très majoritairement de la production de TXA $_2$ alors que la sécrétion ne joue qu'un rôle minime.⁸³

En l'absence de tracés distinctifs, et devant la présence de multiples inducteurs touchés, on décrit les anomalies plaquettaires comme complexes.^{82,84}

Une agrégation anormale à l'épinéphrine peut être observée chez certains individus sains⁸⁵, peut être en raison de la variation du nombre d'adréno récepteurs α_2 .⁸⁶ Cependant chez ces sujets sains, les anomalies constatées avec l'épinéphrine doivent être isolées et les agrégations plaquettaires avec les autres inducteurs doivent être normales.

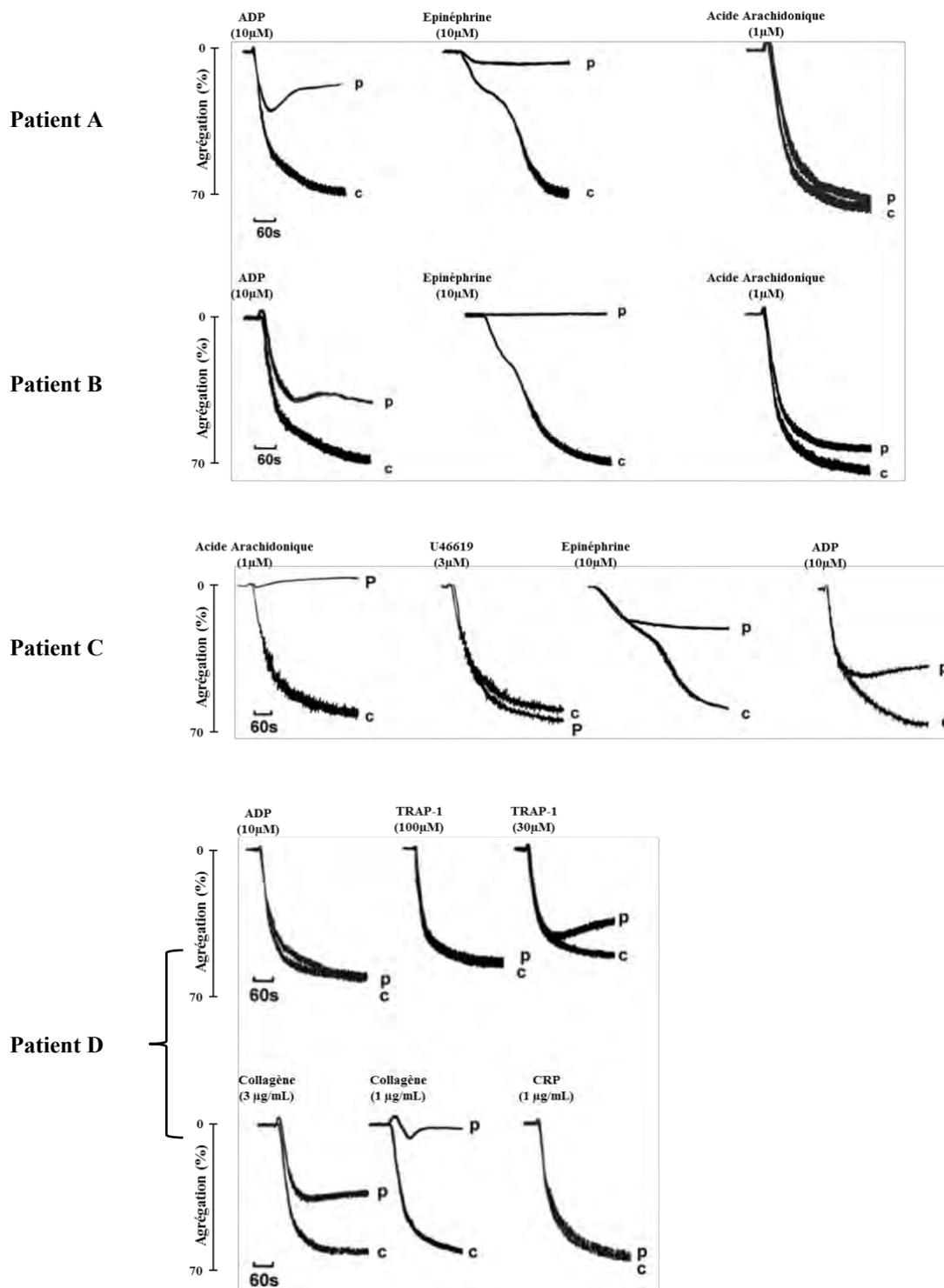


Figure 10 : Anomalies des voies de signalisation plaquettaire. A et B : Anomalies de la voie de signalisation Gai chez 2 patients. C : Agrégation plaquettaire chez un patient atteint d'une anomalie de la voie du TXA2. D : Agrégation chez un patient atteint d'un déficit en granules denses. p : patient, c : contrôle (d'après Dawood, B. B. et al. Evaluation of participants with suspected heritable platelet function disorders including recommendation and validation of a streamlined agonist panel. *Blood* 120, 5041–5049 (2012)).

Etudes plaquettaires par cytométrie en flux

Depuis le début des années 2010, l'utilisation de la cytométrie en flux a pris une part de plus en plus importante dans l'aide au diagnostic et au suivi des anomalies des fonctions plaquettaires. C'est aujourd'hui un élément indispensable pour la caractérisation fine des fonctions plaquettaires.^{73,87-92} C'est un examen complémentaire excellent pour diagnostiquer les thrombopathies sévères comme la maladie de Glanzmann ou la maladie de Bernard-Soulier puisque l'absence ou l'anomalie qualitative des récepteurs GPIIb/IIIa ou GPIb-IX-V sont aisément détectables en cytométrie en flux. C'est également un outil précieux dans le diagnostic des déficits en granules denses avec le test à la mépacrine⁹³, ou encore dans le syndrome de Scott avec l'absence d'exposition des phospholipides anioniques marqués à l'Annexine-V.⁹⁴

Les conditions pré analytiques indispensables à l'étude des plaquettes comprennent toujours la réalisation des analyses dans les 4 heures suivant le prélèvement, la conservation des échantillons à température ambiante et la préservation de l'échantillon vis-à-vis des vibrations qui pourraient artificiellement activer les plaquettes avant l'analyse.

Selon les paramètres étudiés, il est possible de travailler sur du PRP ou directement en sang total. La quantité d'anticorps à utiliser pour chaque test doit être calibrée par titrage lors des premières étapes de la mise en place du test. Les étapes d'incubation doivent se faire dans l'obscurité et à température ambiante.

La cytométrie permet d'analyser un nombre important de plaquettes en un minimum de temps et on estime qu'il faut analyser au moins 10 000 événements (soit 10 000 plaquettes) afin d'obtenir des résultats significatifs et interprétables. On comprend donc qu'en cas de thrombopénie profonde, il est impossible de réaliser et/ou d'interpréter correctement cette analyse.

Les marqueurs plaquettaires analysables en cytométrie en flux sont multiples. Ils peuvent correspondre à des protéines présentes à la surface des granules des plaquettes (P-sélectine (CD62) pour les granules α et granulophysine (CD63) pour les granules denses), à des substances se localisant dans des compartiments spécifiques (comme la mépacrine qui se lie à l'ATP et marque donc les granules denses⁹⁵) ou bien enfin à des protéines de la surface plaquettaire : α IIb β 3, GPIb-IX-V, GPVI etc. Il est aussi possible de comparer l'expression des marqueurs en présence ou en l'absence d'activateurs plaquettaires (TRAP, collagène, ...) afin de mettre en évidence des anomalies des voies d'activation plaquettaire.^{88,96}

Des kits commerciaux ont également été développés, impliquant des billes de calibration, afin de quantifier un antigène d'intérêt présent sur les plaquettes.⁹²

Microscopie électronique

Il s'agit du test de référence pour visualiser de façon effective l'ultrastructure plaquettaire. Les analyses par microscopie électronique demandent un haut niveau d'expertise ce qui limite leur réalisation à quelques équipes qui maîtrisent parfaitement ces techniques.

Autres analyses

De nombreuses autres analyses ont été développées afin de mieux caractériser le fonctionnement et le contenu des plaquettes.

Parmi les tests dits globaux, on retrouve la thromboélastographie, qui mesure la coagulation du sang total. Au cours de cette analyse, l'enregistrement des différentes phases de la coagulation permet d'apprécier la qualité du caillot final. La thromboélastographie a été particulièrement étudiée dans la prise en charge des patients ayant subi d'importants

traumatismes et dans la surveillance des traitements anti agrégants plaquettaires en chirurgie.⁹⁷ Le test de génération de thrombine, un autre test d'hémostase global, mesure le potentiel d'un plasma à générer de la thrombine après activation de la coagulation in vitro par du facteur tissulaire ou par un autre déclencheur. Contrairement aux tests de coagulation classiques (TP et TCA) qui n'évaluent que la phase d'initiation de la coagulation, le test de génération de thrombine mesure également la quantité de thrombine générée puis l'arrêt de formation de thrombine secondaire à l'activation des voies anticoagulantes.⁹⁸ Ce test, réalisable sur du plasma riche en plaquettes, peut contribuer au diagnostic de maladies plaquettaires comme le syndrome des plaquettes « Québec »⁹⁹ ou le syndrome de Scott.¹⁰⁰

Enfin le dosage du facteur II résiduel, un test de routine automatisé, fait aussi partie des tests de coagulation globaux. Il est parfaitement corrélé au test de consommation de la prothrombine. Ce dernier test, élaboré dans les années 1960, consiste à mesurer un temps de coagulation en présence de fibrinogène et de thromboplastine (mélange de facteur tissulaire et de phospholipides). Ce temps est raccourci en cas d'anomalie d'activation des plaquettes et en particulier d'exposition des phospholipides anioniques puisque les facteurs de la coagulation ne peuvent pas aller se fixer à la surface plaquettaire.¹⁰¹⁻¹⁰⁴

Le contenu des granules plaquettaires peut être spécifiquement étudié selon plusieurs approches autres que la cytométrie en flux. Par exemple, le dosage de la sérotonine contenue dans les granules denses est réalisable selon différentes techniques : sérotonine radio marquée, HPLC (high performance liquid chromatography), ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay).¹⁰⁵ Les techniques immuno enzymatique peuvent également permettre de doser certains composant des granules alpha (fibrinogène, TFPI, ...).^{106,107} La libération d'ATP par les plaquettes après activation par un agoniste peut être mesurée à l'aide d'un lumi-agrégamètre. Un réactif luciférase-luciférine réagit avec l'ATP libéré pour générer de l'adényl-luciférine. L'adényl-luciférine est oxydé par l'O₂ présent dans l'atmosphère. Ce processus s'accompagne

d'une réaction chimioluminescente. La quantité de lumière émise est enregistrée; elle est proportionnelle à la quantité d'ATP libérée.

Diagnostic moléculaire

L'établissement d'un diagnostic moléculaire concluant est d'un grand secours dans les maladies hémorragiques constitutionnelles. Il permet d'optimiser le traitement et de clarifier l'évolution de la maladie. Dans les pathologies plaquettaires, il est d'une importance toute particulière car ces dernières peuvent être accompagnées de pathologies hématologiques malignes ou d'autres atteintes organiques. Par exemple, le syndrome d'Hermansky-Pudlak est un groupe de troubles systémiques, chaque sous-groupe étant défini par la déficience d'un gène spécifique. Plus de dix sous-types de syndrome d'Hermansky-Pudlak existent, selon les mutations certains sous type peuvent être associés à un déficit en granules denses plaquettaires mais aussi à des fibroses pulmonaires ou à des atteintes gastro intestinales, qui font la sévérité de l'atteinte.¹⁰⁸ Dans un autre contexte, les thrombocytopénies associées aux variants de RUNX1, ETV6 et ANKRD2 sont associées à un risque accru d'hémopathies malignes et nécessitent un suivi adapté.^{109,110} On comprend donc que dans ces pathologies, le diagnostic moléculaire requiert une importance toute particulière.

Le séquençage génétique par méthode Sanger utilisé pendant près de 40 ans restait un examen long et coûteux¹¹¹. L'amélioration des technologies de biologie moléculaire permettant maintenant d'étudier des panels de gènes par NGS (Next Generation Sequencing) a facilité l'identification d'anomalies génétiques chez des patients présentant des anomalies plaquettaires où le défaut génétique était auparavant inconnu.¹¹²⁻¹¹⁴

F. Les thrombopathies

Les thrombopathies représentent un groupe hétérogène de pathologies, tant sur le plan physiopathologique que par leur sévérité. Cliniquement on observe des saignements cutanéo muqueux (purpura, épistaxis, gingivorragie, ménorragie, temps de saignement long aux coupures). Quelques thrombopathies particulièrement sévères, pouvant mettre en jeu le pronostic vital, ont fait l'objet de nombreuses études et de publications amenant à une meilleure compréhension de leur physiopathologie et une amélioration de leur prise en charge. Il s'agit notamment de la Thrombasthénie de Glanzmann et du syndrome de Bernard-Soulier. Cependant, de nombreuses thrombopathies restent encore mal connues et nécessitent des moyens complexes afin de pouvoir les caractériser.

Thrombopathies acquises

Leur fréquence est largement supérieure aux thrombopathies congénitales. Elles sont très souvent secondaires à la prise de médicaments (anti-inflammatoires, anti agrégants plaquettaires, antibiotiques, chimiothérapies, etc)¹¹⁵, voire de phytothérapies.¹¹⁶ Elles peuvent également être secondaires à des hémopathies malignes¹¹⁷ : syndromes myéloprolifératifs (Polyglobulie de Vaquez, thrombocytémie essentielle, leucémie myéloïde chronique, splénomégalie myéloïde chronique), syndromes myélodysplasiques, leucémies aiguës et dysglobulinémies monoclonales. On décrit aussi habituellement des thrombopénies associées à l'insuffisance hépatocellulaire et à l'insuffisance rénale (via une augmentation des taux de monoxyde d'azote et de prostacycline, deux agents anti agrégants plaquettaires).¹¹⁸

Thrombopathies congénitales

Les troubles héréditaires des fonctions plaquettaires (THFP) forment un groupe hétérogène de pathologies dont les manifestations cliniques sont d'intensité variable.¹¹⁹ Leurs étiologies sont nombreuses. Certaines sont bien définies comme des anomalies des récepteurs de protéines d'adhésion et des récepteurs d'agonistes solubles, des anomalies des granules plaquettaires, des anomalies des voies de signalisation ou encore de l'exposition des phospholipides membranaire.^{120,121} D'autres entités font l'objet de recherches tel que les troubles de la sécrétion plaquettaire (syndrome des plaquettes grises, maladie du pool vide δ plaquettaire) dont la physiopathologie ne reste que partiellement élucidée.^{122,123}

On peut classer ces thrombopathies selon leurs mécanismes physiopathologiques :

- Défaut d'adhésion : il s'agit du syndrome de Bernard-Soulier (déficit en GPIb-IX-V) et de la pseudo maladie de Willebrand (hyper affinité de la GPIIb α plaquettaire pour le VWF).
- Déficit d'interaction plaquette – plaquette : il s'agit de la Thrombasthénie de Glanzmann (déficit en GPIIb-IIIa) et des pathologies plaquettaires apparentées (déficit en CalDAG-GEFI et déficit en Kindlin 3).
- Défaut de sécrétion des granules : cela peut concerner les granules α (syndrome des plaquettes grises), les granules denses (maladie du pool vide plus ou moins associé à d'autres anomalies organiques dans les syndromes de Hermansky-Pudlak et de Chediak-Higashi).
- Défaut de la fonction procoagulante des plaquettes par défaut d'exposition des phospholipides anioniques : il s'agit du syndrome de Scott.

- Défaut de transduction du signal : cela concerne les anomalies de la signalisation passant par la protéine G hétérotrimérique, les anomalies des voies d'activation et de synthèse du TXA₂, les anomalies des voies de signalisation permettant la sécrétion des granules α et des granules denses, etc.

Afin de diagnostiquer ces pathologies, l'agrégation plaquettaire par agrégométrie optique est à ce jour l'examen de référence.⁷⁶ Il est admis qu'une agrégation plaquettaire présentant des anomalies sur au moins deux agonistes différents suggère un trouble des fonctions plaquettaires si ce résultat est confirmé sur un autre échantillon.⁷⁷

Le risque hémorragique des patients présentant des anomalies mineures des fonctions plaquettaires est difficilement évaluable et il n'existe, à notre connaissance, aucune étude concernant leur physiopathologie. De plus, en dehors de l'agrégométrie optique, il n'existe actuellement pas de consensus ou d'approche standardisée pour le diagnostic des THFP. Une meilleure compréhension de la physiopathologie des THFP ainsi qu'une évaluation des tests disponibles permettraient une amélioration de la prise en charge diagnostique et thérapeutique des patients atteints de ces troubles.

Le but de ce travail était d'étudier les THFP mineures d'un point de vue physiopathologique et de rechercher des marqueurs pouvant évaluer leur potentiel hémorragique (étude PLATOON).

II. Matériel et méthodes

A. Design de l'étude

L'étude PLATOON est une étude de cohorte monocentrique prospective menée au centre hospitalier universitaire (CHU) de Nantes. Les inclusions étaient prévues pendant une durée de 24 mois. L'objectif était d'inclure 20 patients. S'agissant d'une étude non-interventionnelle, réalisée dans le cadre du soin, l'étude PLATOON a été approuvée le 20 septembre 2019 par le Groupe Nantais d'Éthique dans le Domaine de la Santé (GNEDS) (**annexe 2**). Le recrutement a été réalisé lors des consultations spécialisées d'hémostase au Centre Régional de Traitement de l'Hémophilie (CRTH) du CHU de Nantes. A l'inclusion, le patient recevait une information orale et une note d'information écrite lui était remise (**annexe 3**). L'obtention de son consentement éclairé était recueilli (**annexe 4**).

B. Population étudiée

Les patients adultes (>18 ans) inclus dans l'étude devaient répondre aux critères suivants : test fonctionnel d'agrégation plaquettaire pathologique sur au moins deux agonistes différents et au minimum à deux reprises, affiliés à une couverture sociale.

Les critères de non inclusion étaient : patients mineurs, sous tutelle ou curatelle, patients participant à une autre étude de recherche, traitement par antiagrégant plaquettaire, anti-inflammatoires non stéroïdiens, inhibiteurs sélectifs de recapture de la sérotonine en cours ou datant de moins de 14 jours, transfusion plaquettaire dans les 14 jours précédant les analyses biologiques.

C. Objectifs

L'objectif primaire de cette étude était de préciser les mécanismes physiopathologiques responsables des anomalies plaquettaires chez des patients atteints de THFP mineurs.

Pour y répondre, nous avons réalisé différentes analyses dans une cohorte de patients présentant un THFP (présentant au moins deux inducteurs pathologiques en agrégométrie optique, retrouvé à deux reprises) :

- Numération plaquettaire en impédancemétrie et par fluorocytométrie à partir de l'automate XN9000.
- Bilan d'hémostase complet.
- Etude de l'agrégation plaquettaire en présence de divers agonistes (Collagène, Epinéphrine, Acide Arachidonique, ADP, TRAP) avec recueil des paramètres disponibles (temps de latence, vitesse, agrégation maximale, aire sous la courbe à 4 minutes).
- Etude en cytométrie en flux afin d'évaluer la présence et la mobilisation des granules plaquettaires (étude de l'expression du CD62, du CD63 et test à la mepacrine ; sans et avec activation plaquettaire).
- Etude du contenu des granules denses (sérotonine) par technique ELISA.

L'objectif secondaire de cette étude était de préciser le potentiel hémorragique de ces pathologies plaquettaires mineures.

Pour cela nous nous avons réalisé pour chaque patient un score hémorragique validé dans le cadre des pathologies plaquettaires.⁶² Nous avons voulu évaluer si un ou des paramètres issus des analyses cytologiques (numération plaquettaire, paramètres plaquettaires), des analyses fonctionnelles (agrégation plaquettaire, étude en cytométrie en flux) ou des analyses

protéiques (dosage de sérotonine intra plaquettaire) étaient corrélés au score hémorragique du patient.

D. Techniques d'étude et d'analyse

Afin de répondre à l'objectif principal, plusieurs techniques d'analyse et plusieurs paramètres d'évaluation ont été utilisés. Les paramètres d'études de l'hémostase primaire comprenaient la numération plaquettaire, la mesure du temps d'occlusion plaquettaire, le dosage du VWF activité et antigène, l'agrégation plaquettaire sur agrégomètre et l'analyse des granules plaquettaires par cytométrie en flux. Les paramètres de la coagulation comprenaient le temps de prothrombine (TP), le temps de céphaline Kaolin (TCK) et le dosage du fibrinogène. Si le TP et/ou le TCK étaient anormaux, les facteurs de coagulation appropriés étaient dosés. Le score hémorragique réalisé au cours de la consultation d'hémostase spécialisée était celui proposé et validé par l'ISTH-SSC.⁶²

Les prélèvements sanguins étaient réalisés dans des tubes citratés VACUETTE® de 3,5 mL de type 9NC Coagulation sodium citrate 3,2% (6 tubes), un tube VACUETTE® CTAD (citrate théophylline, adénosine, dipyridamole) de 3,5 mL et un tube VACUETTE® EDTA K3 de 4 mL. Les prélèvements étaient acheminés au laboratoire sans délai et traités dès que possible, dans un délai maximum de quatre heures.

Obtention des paramètres de routine de l'hémostase primaire

Les résultats de la numération plaquettaire étaient obtenus à partir de l'automate XN9000 (Sysmex). Ils comprenaient la numération plaquettaire (en G/L) en mode « impédance » et

« fluorescence », le VPM et la fraction plaquettaire immature (en pourcentage et en valeur absolue).

Le temps d'occlusion plaquettaire était réalisé sur automate PFA-100® ou PFA-200®, sur sang total citraté. Les deux cartouches (Epinéphrine et ADP) étaient systématiquement testées dans les deux heures suivant le prélèvement.

Le dosage du facteur de Willebrand activité (VWF:Act) et antigène (VWF:Ag) étaient également réalisés sur plasma et sur automate ACL AcuStar®.

Etude de l'agrégation plaquettaire

Le sang était recueilli dans des tubes citratés, et laissé au repos au moins 15 minutes avant la première étape de centrifugation. Les échantillons étaient centrifugés à 200 g pendant 10 min à +20°C avec accélération douce et sans frein pour obtenir un plasma riche en plaquette (PRP). Les échantillons étaient ensuite centrifugés à 1500 g pendant 15 min à +20°C pour obtenir un plasma pauvre en plaquette (PPP). L'étude in vitro de l'agrégation plaquettaire était réalisée dans un agrégomètre thermo calibré à 37°C avec un mélange réactionnel, sous agitation magnétique (1100 rotations par minute).

30 µL d'agoniste étaient ajoutés à 270 µL de PRP afin d'étudier l'agrégation plaquettaire.

Différentes concentrations finales d'agoniste suivantes étaient utilisées^{76,77} :

- ADP 5 µM et 10 µM (American Biochemical & Pharmaceuticals LTD®)
- Epinéphrine 5 µM et 10 µM (Stago®)
- Acide Arachidonique 1mM (Stago®)
- Collagène 1,25 µg/mL (Stago®)

- Ristocétine 1,5 mg/mL et 0,5 mg/mL (Stago®)
- TRAP 50 µM (Stago®)

L'analyse était réalisée sur 10 minutes. L'appréciation qualitative des courbes d'agrégation plaquettaire reposait sur l'examen des paramètres suivants : la phase de latence, le changement de forme plaquettaire, la vitesse ou pente d'agrégation, l'agrégation primaire et secondaire, la réversibilité et l'amplitude maximale.⁷⁶ Le paramètre de recherche correspondant à l'aire sous la courbe d'agrégation à 4 minutes était également étudié.

Les valeurs normales des paramètres plaquettaires ont été établies pour chaque inducteur sur une population témoin d'au moins 25 individus.

Les courbes d'agrégation plaquettaires étaient regroupées selon les critères suivant :

- Anomalies Gai-like : Défaut d'agrégation à l'ADP et à l'épinéphrine avec une agrégation transitoire à l'ADP ainsi qu'une première vague réduite ou absente sans seconde vague d'agrégation à l'épinéphrine. Une réduction mineure de l'agrégation à des concentrations faibles et intermédiaires d'autres agonistes plaquettaires pouvait être observée (agrégation plaquettaire maximale >50% ou se normalisant à la concentration supérieure de l'agoniste testé). La réponse à l'acide arachidonique (1mM) devait être normale.
- Anomalies de la voie du thromboxane A2 : Défaut d'agrégation à l'acide arachidonique (1mM). Des anomalies mineures d'agrégation à de faibles concentrations d'autres agonistes plaquettaires pouvaient être associées (agrégation plaquettaire maximale >50% ou se normalisant à la concentration supérieure de l'agoniste testé).

- Anomalies des granules denses et de leurs voies de signalisation : réduction de l'agrégation à de faibles concentrations de la plupart des agonistes plaquettaires sauf à l'ADP, impacté de façon plus modérée (agrégation maximale >50%).
- Anomalies mineures : anomalies regroupant les phénomènes d'hypoagrégabilité à l'ADP 5µM et se normalisant à la concentration de 10 µM, d'allongement du temps de latence à l'épinéphrine, et possiblement d'hypo agrégabilité mineure à d'autres agonistes à faible concentration (agrégation plaquettaire maximale >50% ou se normalisant à la concentration supérieure de l'agoniste testé).
- Anomalies complexes : anomalies touchant plusieurs inducteurs et ne correspondant à aucun des groupes précédents.

Etude de la sécrétion plaquettaire par cytométrie en flux⁹⁶

Les valeurs normales des paramètres étudiés en cytométrie en flux (expression du CD62 et du CD63, phase de capture et de sécrétion de la mépacrine) ont également été établies sur une population témoin d'au moins 25 individus.

Test à la mépacrine

Les échantillons étaient centrifugés à 200 g pendant 10 min à +20°C pour obtenir un PRP. Le PRP était ensuite dilué au vingtième dans du tampon phosphate (Phosphate-Buffered Saline, PBS). 300 µL de cette suspension plaquettaire étaient ensuite incubés avec ou sans 30 µL de Mépacrine (Sigma) pour une concentration finale de 3,4µM simultanément avec 10 µL de CD41 FITC (BD Biosciences) pendant 30 minutes à température ambiante et à l'abri de la lumière. Puis chaque tube était divisé en deux aliquots, incubés avec ou sans 60 µM de TRAP-6 pendant 15 minutes à température ambiante et à l'abri de la lumière. Un volume de

1mL de tampon phosphate (Phosphate-Buffered Saline, PBS) était ajouté à la fin de l'incubation pour permettre l'analyse sur le cytomètre. Les phases de capture et de sécrétion de la mepacrine étaient étudiées sur un cytomètre en flux NAVIOS (Beckman Coulter). L'analyse était réalisée en vitesse "Low" avec acquisition d'au moins 10 000 plaquettes. La fluorescence était quantifiée en moyenne d'intensité de fluorescence (MFI, unité arbitraire). Les données ont été analysées par le logiciel CXP (Beckman Coulter®).

La phase de capture correspond à la capacité des plaquettes à incorporer la mepacrine (incorporation passive) au niveau des granules denses. C'est donc un marqueur de la présence des granules denses. Pour la phase de capture, le ratio d'absorption a été calculé comme le quotient de la MFI des plaquettes incubées avec la mepacrine (MFI1) divisé par la MFI des plaquettes incubées sans mepacrine (MFI2).

La phase de sécrétion correspond à la capacité des plaquettes à libérer la mepacrine contenue dans les granules denses après activation plaquettaire. C'est un marqueur des voies d'activation des granules denses plaquettaires. Pour cette phase, le ratio de sécrétion a été calculé comme le quotient de la MFI des plaquettes incubées avec la mepacrine au repos (MFI1) divisé par la MFI des plaquettes incubées avec la mepacrine après stimulation par le TRAP-6.

Ratio absorption = $MFI1/MFI2$

Ratio sécrétion = $MFI1/MFI3$

Etude de l'expression du CD62 et CD63

Deux tubes étaient préparés : pour chaque tube, 5 μ L de sang total était incubé avec 80 μ L de PBS, 10 μ L de CD62 PE (BD Biosciences®), 10 μ L de CD63 FITC (BD Biosciences®) et 5

μL de CD41 APC (BD Biosciences®). Un tube était incubé avec 5,8 μL de PBS (tube « plaquettes au repos) tandis que l'autre tube était incubé avec 5,8 μL de TRAP-6 (tube « plaquettes activées », concentration finale en TRAP-6 à 60 μM). Les deux tubes étaient incubés 15 minutes à température ambiante et à l'abri de la lumière. Un volume de 1mL de PBS était ajouté à la fin de l'incubation pour permettre l'analyse sur le cytomètre. L'analyse de l'expression du CD62 et du CD63 était réalisée sur un cytomètre en flux NAVIOS (Beckman Coulter®). Les données ont été analysées par le logiciel CXP (Beckman Coulter®). L'analyse était réalisée en vitesse "Low" avec acquisition d'au moins 10 000 plaquettes. La fluorescence était quantifiée en moyenne d'intensité de fluorescence (MFI, unité arbitraire).

L'expression du CD62 et du CD63 était calculé par le ratio suivant :

$$\text{MFI}_{\text{plaquettes stimulées}} / \text{MFI}_{\text{plaquettes au repos}}$$

Dosage de la sérotonine intra-plaquettaire

Les dosages ont été réalisés par technique ELISA^{105,124} (KIT Sérotonine ELISA par IBL®) basé sur la compétition entre la sérotonine biotinylée et la sérotonine contenue dans l'échantillon, vis-à-vis d'un anticorps (de lapin) anti-sérotonine d'isotype IgG.

Les échantillons dilués et acylés étaient incubés 16 à 20 heures entre 2 et 8°C, dans les puits de la microplaque contenant la sérotonine biotinylée et l'anticorps anti-sérotonine. Après lavage des puits, le conjugué enzymatique (phosphatase alcaline anti-biotine) était incubé 2 heures à température ambiante sous agitation. Après un nouveau lavage, le substrat enzymatique (p-Nitro Phényl Phosphate) était lui incubé 1 heure à température ambiante sous agitation. Enfin une solution d'arrêt était ajoutée afin de stopper la réaction et la densité

optique était lue à la longueur d'onde de 405 nm et rapportée à une courbe d'étalonnage. Les résultats étaient exprimés en ng/10⁹ plaquettes.

Les valeurs normales de sérotonine intra plaquettaire étaient calculées à partir du dosage réalisé dans les mêmes conditions sur une population témoin.

Obtention des paramètres de la coagulation

Le sang était recueilli sur tube CTAD puis centrifugé à une vitesse de 1500 g pendant 15 minutes. Les analyses étaient réalisées sur le plasma dans les 4 heures suivant le prélèvement, sur l'automate ACL TOP 750 (Werfen®). Il était systématiquement réalisé : TP, TCK, fibrinogène (méthode de Clauss). Les dosages des cofacteurs II-V-VII-X et VIII-IX-XI-XII étaient réalisés en cas d'allongement respectivement du temps de Quick ou du TCK.

Le dosage du facteur II résiduel était également réalisé pour tous les patients inclus. Brièvement, on recueillait environ 4 ml de sang du patient dans un tube en verre rincé à l'eau distillée et soigneusement séché. Le tube était ensuite incubé pendant 4 heures à 37°C. A la fin de l'incubation, on réalisait le dosage du facteur II résiduel dans le sérum grâce à un réactif contenant un plasma déficient en facteur II, sur automate ACL TOP 750 (Werfen®). Le résultat était considéré comme normal si le taux de facteur II résiduel était inférieur à 10%.

Score hémorragique

Au cours de la consultation d'hémostase un score hémorragique validé dans les pathologies plaquettaires : l'ISTH/SSC Bleeding Assessment Tool⁶⁰, était systématiquement réalisé. Ce score, initialement utilisé dans la maladie de Willebrand¹²⁵ a été validé pour détailler le phénotype hémorragique de patients suspects de THFP.^{62,126} Un score ISTH-BAT était

considéré comme pathologique s'il était ≥ 6 pour les femmes et ≥ 4 pour les hommes (**annexe n°1**).

E. Gestion des données

L'investigateur principal s'engageait à maintenir confidentielles les identités des patients inclus dans l'étude. L'ensemble des données étaient traitées par une seule personne, l'investigateur principal, qui générait un code d'anonymat pour chaque patient inclus, dans le but de créer une base de données électronique ne contenant aucune information relative à l'identité des patients. Les données étaient recueillies sur un support numérique de type tableur EXCEL.

Les données seront conservées 15 ans. Elles ne seront pas transférées à un tiers.

F. Statistiques

Les données ont été analysées à l'aide du logiciel Prism (GraphPad Software®).

Les caractéristiques cliniques et sociodémographiques des patients ont été décrites à l'aide de moyennes, écart-types et pourcentages, afin de présenter une description complète et approfondie de l'échantillon. Les effectifs étant faibles, la distribution des valeurs des autres paramètres n'était pas évaluable. Ces paramètres ont donc été décrits d'après leur médiane et l'écart interquartile.

L'association statistique entre 2 variables qualitatives a été évaluée à l'aide du test exact de Fisher. Pour les variables quantitatives, la différence de moyenne entre 2 groupes a été évaluée à l'aide du test de Wilcoxon-Mann-Whitney.

Justification statistique du nombre d'inclusions

Cette étude entraine dans le cadre de la recherche non interventionnelle. Du fait de l'absence de données dans la littérature, les variations de MFI considérées comme significatives n'étaient pas connues à l'avance, et étaient déterminées en cours d'étude notamment grâce aux moyennes de laboratoire réalisées sur des sujets témoins. Un calcul du nombre de patients nécessaire n'était donc pas envisageable.

Le nombre de patients de l'étude était déterminé par le nombre de patients suivis régulièrement en consultation au CHU de Nantes.

Au CHU de Nantes, environ 40 patients sont suivis au CRTM pour des THFP mineurs. Ces patients sont revus tous les quatre ans en consultation, et parfois plus précocement en cas d'accident hémorragique ou d'intervention chirurgicale programmée. Il a donc été estimé que le nombre de patients pouvant être inclus sur 24 mois était de 20 patients.

Degré de signification statistique prévu

Le degré de signification statistique était fixé à 5% (risque de première espèce).

Méthode de prise en compte des données manquantes, inutilisées ou non valides

Il n'y avait pas d'observations ou d'analyses incomplètes.

III. Résultats

A. Description de la population

Les caractéristiques cliniques des patients sont résumées dans le **tableau 1**.

20 patients ont été inclus dans l'étude PLATOON d'août 2018 à février 2021. Il s'agissait de 13 femmes (65%) et 7 hommes (35%). 60% des patients rapportaient des antécédents hémorragiques familiaux. L'âge moyen du diagnostic d'anomalies des fonctions plaquettaires était de 33,7 ans. L'âge moyen d'inclusion dans l'étude était lui de 43,1 ans.

La médiane du score hémorragique ISTH-SSC était de 5, il était normal chez 50% des patients.

B. Analyses biologiques de première intention

Les valeurs des analyses biologiques de première intention sont décrites dans le **tableau 1**.

La numération plaquettaire était normale chez tous les patients. Le VPM également était compris dans les valeurs normales sauf pour un patient, qui présentait un VPM très légèrement augmenté (12,1 fL pour une normale comprise entre 7,4-11,7 fL). Le compte plaquettaire, effectué sur le plasma riche en plaquette pour chaque patient, était systématiquement supérieur à 150 G/L, permettant l'analyse de l'agrégation plaquettaire en agrégométrie optique.⁷⁶

Les paramètres de la coagulation (TP, TCK et fibrinogène) étaient tous normaux, hormis un patient qui présentait un ratio TCK à 1,23 en rapport avec un FXII à 34% (FVIII, FIX et FXI normaux) sans incidence hémorragique.

Les temps d'occlusion plaquettaires étaient allongés pour la cartouche Epinéphrine dans 55% des cas et dans 70% des cas pour l'ADP. Les taux de VWF activité et antigène étaient tous normaux.

Le dosage du facteur II résiduel était normal chez 8 patients et pathologique chez les 12 autres patients inclus dans l'étude. La moyenne était de 11% (ET = 6%) pour une valeur normale \leq 10%.

Tableau 1 : Caractéristiques cliniques et biologiques à l'inclusion

Caractéristiques	Valeurs
Nombre de patients, n	20
Age au diagnostic, moyenne (ET)	33,7 (16,9)
Age à l'inclusion, moyenne (ET)	43,1 (18,2)
Sexe, n (%)	
• Féminin	13 (65)
• Masculin	7 (35)
Histoire familiale de troubles de l'hémostase, n (%)	12 (60)
Bleeding score, médiane (EIQ)	5 [3 – 7]
• Bleeding score pathologique, n (%)	10 (50)
• Bleeding score normal, n (%)	10 (50)
Compte plaquettaire (G/L)	
• Impédancemétrie, médiane (EIQ)	251 [200 – 293]
• Fluorocytométrie, médiane (EIQ)	266 [206 – 308]
• < 150, n (%)	0 (0)
VPM (valeurs normales 7,4 – 11,7 fL), médiane (EIQ)	10,0 [9,7 – 10,4]
• > 11,7, n (%)	1 (5)
Fraction plaquettaire immature en %, médiane (EIQ)	4,0 [2,9 – 5,6]
Fraction plaquettaire immature en G/L, médiane (EIQ)	11,1 [7,5 – 14,7]
Plasma Riche en Plaquettes (G/L), médiane (EIQ)	452 [385 – 556]
<150 n (%)	0 (0)
TP (%), médiane (EIQ)	96 [92 – 108]
• < 70, n (%)	0 (0)
TCK (ratio), médiane (EIQ)	1,04 [1,00 – 1,09]
• ≥ 1,2, n (%)	1 (5)
Fibrinogène (g/L), médiane (EIQ)	2,9 [2,7 – 3,4]
• < 2, n (%)	0 (0)
PFA (secondes)	
• EPI, médiane (EIQ)	156 [135 – 1187]
• > 150, n (%)	11 (55)
• ADP, médiane (EIQ)	109 [96 – 121]
• > 100, n (%)	14 (70)
VWF:Act (%), médiane (EIQ)	85 [72 – 101]
VWF:Ag (%), médiane (EIQ)	80 [69 – 102]
Facteur II résiduel (%), médiane (EIQ)	11 [8 – 15]
• ≥ 10, n (%)	12 (60%)

C. Agrégations plaquettaires

L'appréciation qualitative des courbes d'agrégation plaquettaire montrait les résultats suivant :

- Acide Arachidonique (1mM), diminué chez 8 patients (40%)
- ADP faible dose (5 μ M), diminué chez tous des patients inclus (100%).
- ADP forte dose (10 μ M), diminué chez 9 patients (45%).
- Epinéphrine (5 et 10 μ M), diminuée chez 17 patients (85%).
- Collagène (1,25 μ g/mL), diminué chez 15 patients (75%).
- TRAP-6 (50 μ M), légèrement diminué chez 1 patient (5%).
- Ristocétine (0,5 et 1,5 mg/mL) : normale chez tous les patients (0% pathologique)

Le paramètre de recherche correspondant à la surface d'agrégation plaquettaire à 4 minutes retrouvait lui :

- Acide arachidonique (1mM), diminué chez 8 patients (40%)
- ADP faible dose (5 μ M), diminué chez 18 patients (90%).
- ADP forte dose (10 μ M), diminué chez 8 patients (40%).
- Epinéphrine (5 μ M), diminuée chez 15 patients (75%).
- Epinéphrine (10 μ M), diminuée chez 12 patients (60%).
- Collagène (1,25 μ g/mL), diminué chez 14 patients (70%).
- TRAP-6 (50 μ M), légèrement diminué chez 1 patient (5%).

- Ristocétine (0,5 et 1,5 mg/mL) : normale chez tous les patients (0% pathologique).

Les agrégations plaquettaires des patients (1 à 20) inclus dans cette étude sont présentées dans la **figure 11**.

Au total, 7 patients présentaient des anomalies des courbes d'agrégation plaquettaire type G α i-like, 7 patients avaient un phénotype d'anomalies mineures, 5 patients montraient plutôt des anomalies complexes de l'agrégation plaquettaire, et 1 patient un phénotype de déficit en granule denses ou dans ses voies de signalisation (**tableau 2**).

Tableau 2 : Classification des courbes d'agrégation plaquettaire

Types d'anomalies plaquettaires	Nombre de patients	Pourcentage	ISTH-BAT
Anomalies G α i-like	7	35%	Normal : 5
			Pathologique : 2
Anomalies mineures	7	35%	Normal : 3
			Pathologique : 4
Anomalies complexes	5	25%	Normal : 2
			Pathologique : 3
Anomalies des granules denses	1	5%	Pathologique : 1

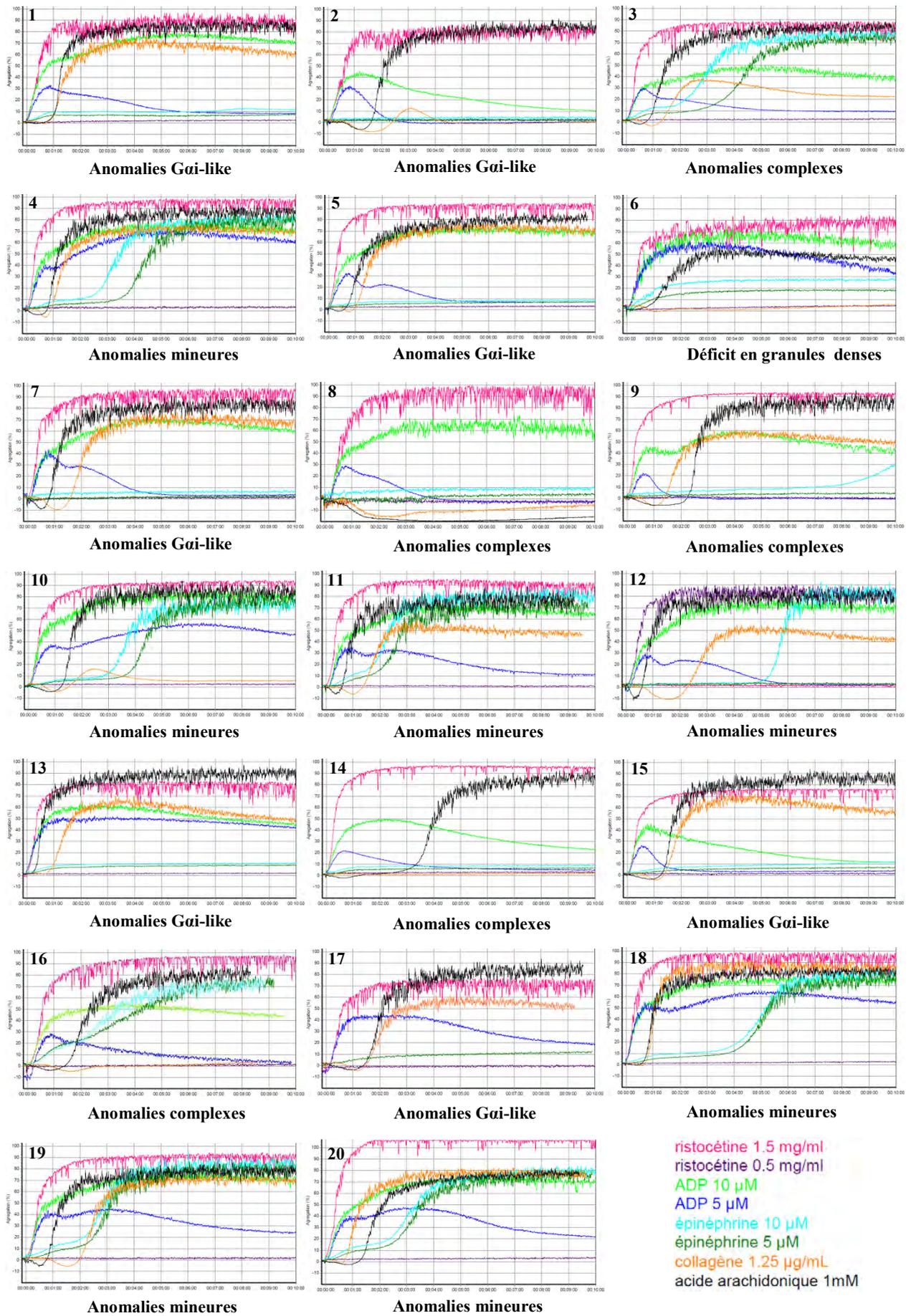


Figure 11 : Agrégations plaquettaires des 20 patients inclus dans l'étude PLATOON. En abscisse : temps écoulé (0 à 10 minutes), en ordonnée : pourcentage d'agrégation (0 à 100%).

D. Cytométrie en flux

Concernant l'étude de la sécrétion des granules α (**figure 12**) après activation par le TRAP-6, la moyenne des ratios d'intensité de fluorescence de CD62 était de 51,27 (ET = 16,32) pour une valeur normale $> 30,9$. Deux patients seulement présentaient des ratios d'expression de CD62 très légèrement diminués, respectivement à 27,21 et 29,28.

L'étude de la sécrétion des granules dense (**figure 12**) par le marquage au CD63 était normale chez tous les patients inclus. La moyenne des ratios d'intensité de fluorescence de CD63 après activation par le TRAP-6 était de 7,44 (ET = 1,65) pour une valeur normale $> 4,64$.

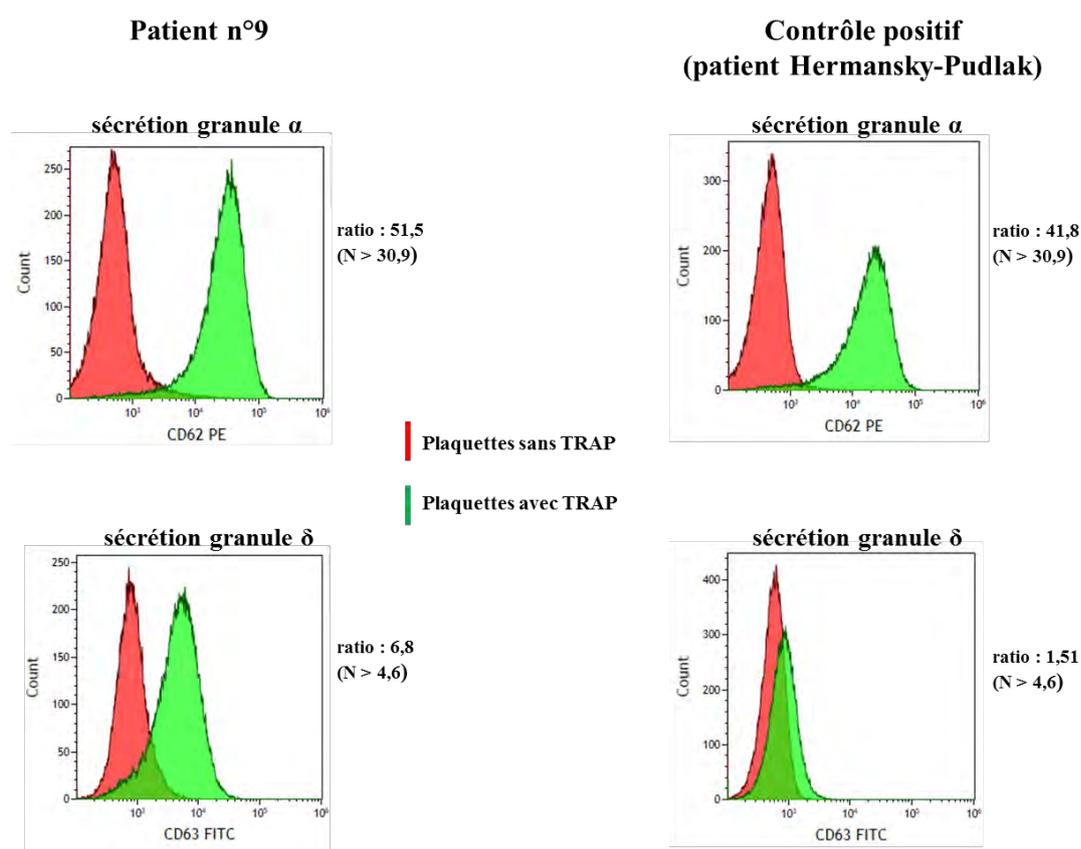


Figure 12 : Etude de la sécrétion des granules α marqués par le CD62 et des granules δ marqués par le CD63 en cytométrie en flux. Comparaison entre le patient n°9 et un patient atteint de la maladie d'Hermansky-Pudlak (déficit en granules denses).

Le test à la mépacrine était divisé en deux étapes (**figure 13**) :

Concernant la première étape, la phase de capture, les ratios d'absorption de la mépacrine étaient normaux chez tous les patients avec une moyenne à 20,31 (normale > 3,88).

La deuxième étape du test à la mépacrine, qui analyse la sécrétion des granules denses, était normale dans 17 cas et faiblement diminuée chez 3 patients avec des ratios de sécrétion respectivement à 1,71 - 1,49 - 1,93 pour une normale > 2,08.

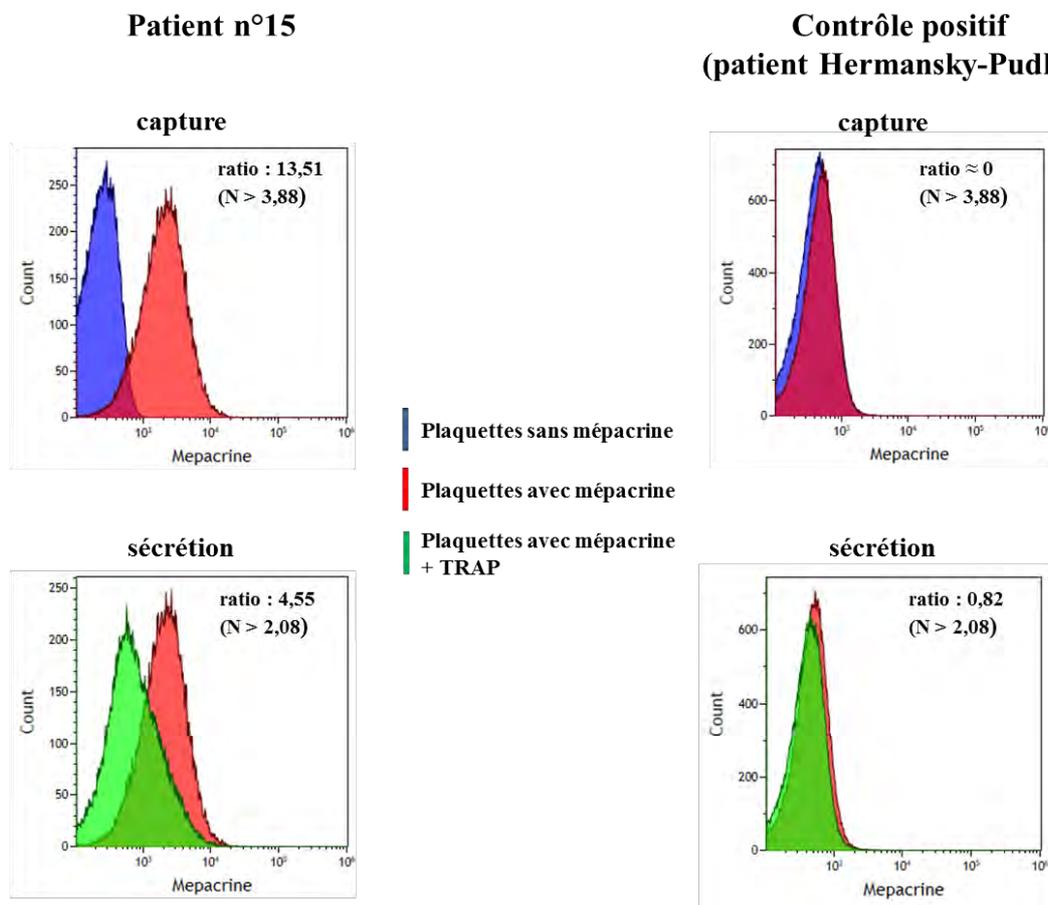


Figure 13 : Test à la mépacrine : étude des granules δ en cytométrie en flux. Comparaison des phases de capture et de sécrétion entre le patient n°15 et un patient atteint de la maladie d'Hermansky-Pudlak (déficit en granules denses).

E. Dosage de la sérotonine intra plaquettaire

Le dosage de la sérotonine intra plaquettaire, par méthode ELISA, était normal chez tous les patients avec une moyenne à 715 ng/10⁹ plaquettes (ET = 206) pour une valeur normale > 355 ng/10⁹ plaquettes.

F. Comparaison des groupes ISTH-BAT normal versus ISTH-BAT pathologique

La comparaison des paramètres biologiques de première intention entre les groupes ISTH-BAT normal et ISTH-BAT pathologique est résumée dans le **tableau 3**.

Tableau 3 : Comparaison des paramètres biologiques de première intention entre les groupes ISTH-BAT normal et ISTH-BAT pathologique.

Paramètres (exprimés en moyenne)	ISTH-BAT normal (n=10)	ISTH-BAT pathologique (n = 10)	p
Plaquettes (G/L), impédance	238	272	ns
Plaquettes (G/L), fluorescence	276	259	ns
VPM (fL)	10,3	9,7	ns
IPF (%)	5,5	4,0	ns
IPF (G/L)	15,5	9,5	ns
PFA Epi / PFA ADP	162 / 108	173 / 112	ns / ns
TP (%)	97	100	ns
TCK (ratio)	1,05	1,06	ns
Fibrinogène (g/L)	3,0	3,2	ns
VWF:Act / VWF:Ag	101/80	85/94	ns/ns
Facteur II résiduel (%)	8	14	0,02

La comparaison des paramètres de la numération plaquettaire (compte plaquettaire, VPM, Fraction plaquettaire immature en % et en valeur absolue) ne mettait pas en évidence de différence significative entre les deux groupes. La comparaison des paramètres biologique de première intention concernant l'hémostase primaire et la coagulation (PFA épinéphrine et ADP, TP, TCK, fibrinogène, VWF activité et antigène) ne montrait pas non plus de différence significative entre les deux groupes, hormis un paramètre, le dosage du facteur II résiduel. Celui-ci était significativement plus élevé dans le groupe ISTH-BAT pathologique (14%) versus ISTH-BAT normal (8%) ($p = 0,02$) (**figure 14**).

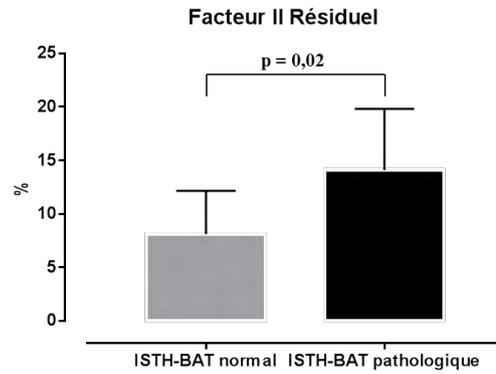


Figure 14 : Facteur II résiduel, comparaison des groupes ISTH-BAT normal versus ISTH-BAT pathologique.

La comparaison des paramètres de l'agrégation plaquettaire entre les deux groupes portait sur l'analyse qualitative globale des courbes des différents agonistes testés (agrégation plaquettaire normale versus pathologique) (**tableau 4**).

Tableau 4 : Analyse qualitative globale des courbes d'agrégation plaquettaire : comparaison entre les groupes ISTH BAT normal et ISTH-BAT pathologique.

Inducteur	Groupe ISTH-BAT normal	Groupe ISTH-BAT pathologique	p
ADP 5 μ M	Normal : 0	Normal : 0	ns
	Anormal : 10	Anormal : 10	
ADP 10 μ M	Normal : 5	Normal : 6	ns
	Anormal : 5	Anormal : 4	
Acide Arachidonique 1mM	Normal : 7	Normal : 5	ns
	Anormal : 3	Anormal : 5	
Collagène 1,25 μ g/mL	Normal : 3	Normal : 2	ns
	Anormal : 7	Anormal : 8	
Epinéphrine 5 μ M	Normal : 1	Normal : 2	ns
	Anormal : 9	Anormal : 8	
Epinéphrine 10 μ M	Normal : 1	Normal : 2	ns
	Anormal : 9	Anormal : 8	
Ristocétine 0,5 mg/mL	Normal : 10	Normal : 10	ns
	Anormal : 0	Anormal : 0	
Ristocétine 1,5 mg/mL	Normal : 10	Normal : 10	ns
	Anormal : 0	Anormal : 0	
TRAP-6 50 μ M	Normal : 9	Normal : 10	ns
	Anormal : 1	Anormal : 0	

La comparaison des agrégations plaquettaires entre les deux groupes était également effectuée sur le paramètre de recherche surface d'agrégation à 4 minutes. L'analyse qualitative de ce paramètre, normal versus pathologique, est présenté dans le **tableau 5**. Il n'y avait pas de différence significative entre les deux groupes quel que soit l'agoniste testé.

Tableau 5 : Analyse qualitative des courbes d'agrégation plaquettaire selon le paramètre surface à 4 minutes : comparaison entre les groupes ISTH BAT normal et ISTH-BAT pathologique.

Inducteur	Groupe ISTH-BAT normal	Groupe ISTH-BAT pathologique	p
ADP 5 μ M	Normal : 1	Normal : 1	ns
	Anormal : 9	Anormal : 9	
ADP 10 μ M	Normal : 6	Normal : 6	ns
	Anormal : 4	Anormal : 4	
Acide Arachidonique 1mM	Normal : 7	Normal : 5	ns
	Anormal : 3	Anormal : 5	
Collagène 1,25 μ g/mL	Normal : 4	Normal : 2	ns
	Anormal : 6	Anormal : 8	
Epinéphrine 5 μ M	Normal : 1	Normal : 4	ns
	Anormal : 9	Anormal : 6	
Epinéphrine 10 μ M	Normal : 4	Normal : 4	ns
	Anormal : 6	Anormal : 6	
Ristocétine 0,5 mg/mL	Normal : 10	Normal : 10	ns
	Anormal : 0	Anormal : 0	
Ristocétine 1,5 mg/mL	Normal : 10	Normal : 10	ns
	Anormal : 0	Anormal : 0	
TRAP-6 50 μ M	Normal : 9	Normal : 10	ns
	Anormal : 1	Anormal : 0	

Il n'y avait également pas de différence significative entre le groupe ISTH-BAT normal versus ISTH-BAT anormal concernant l'analyse quantitative du paramètre de recherche surface d'agrégation à 4 minutes, quel que soit l'agoniste utilisé (**figure 15**).

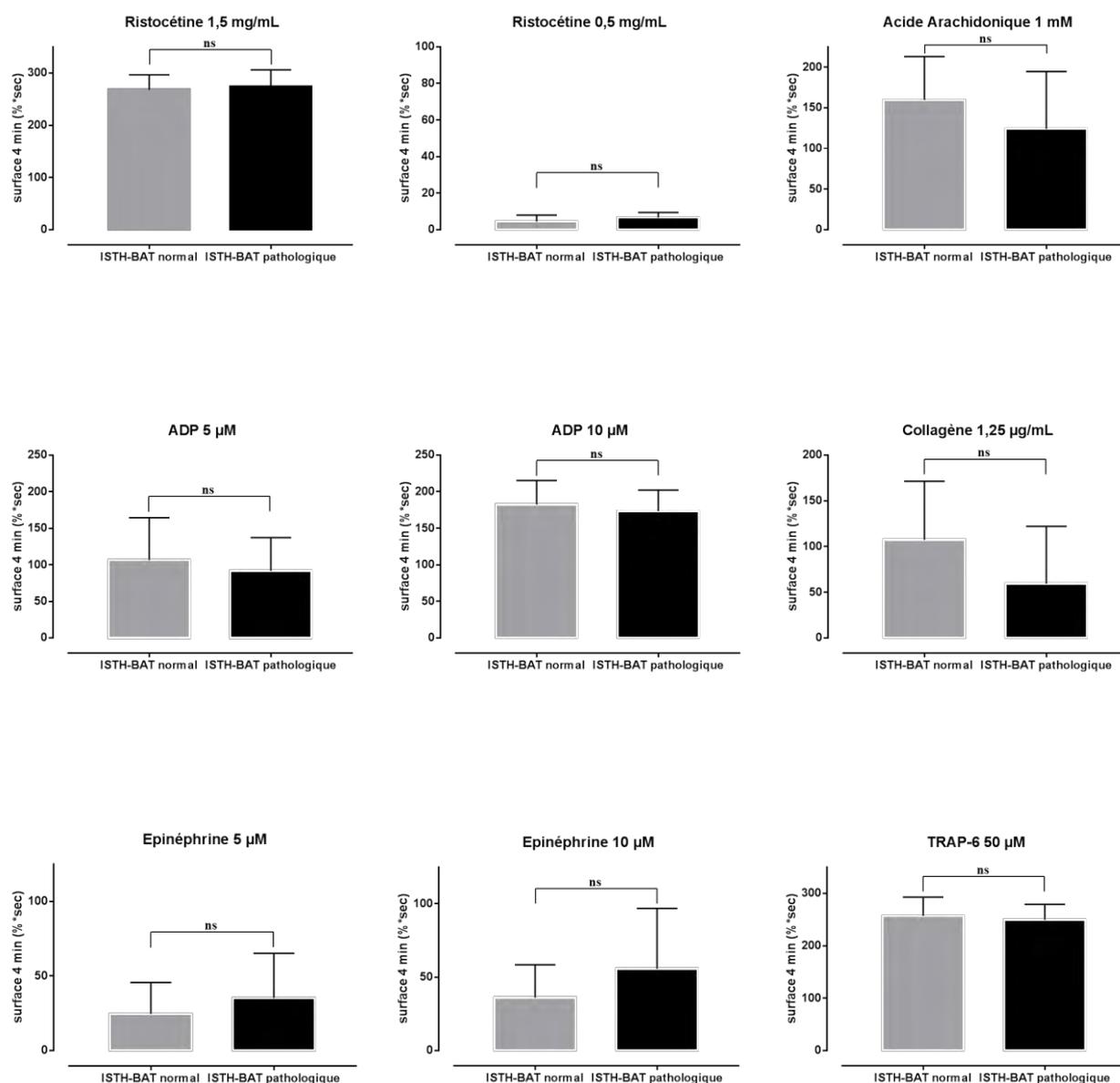


Figure 15 : Comparaison quantitative du critère surface à 4 minutes. Le critère surface à 4 minutes (exprimé en %*sec) est comparé entre les groupes ISTH-BAT normal et le groupe ISTH-BAT pathologique, selon les différents inducteurs testés.

La comparaison des paramètres de la cytométrie en flux concernant les ratios d'expression du CD62 et du CD63 après activation par le TRAP-6, ainsi que les ratios d'expression de la mépacrine (phases de capture et de sécrétion), ne montrait pas de différence significative entre les groupes ISTH-BAT normal et ISTH-BAT pathologique (**figure 16 A et B**).

Enfin il n'y avait pas non plus de différence significative entre le dosage de la sérotonine intra plaquettaire dans le groupe ISTH-BAT normal (moyenne 731 ng/10⁹ plaquettes) et celui dans le groupe ISTH-BAT pathologique (moyenne : 698 ng/10⁹ plaquettes) (**figure 16 C**).

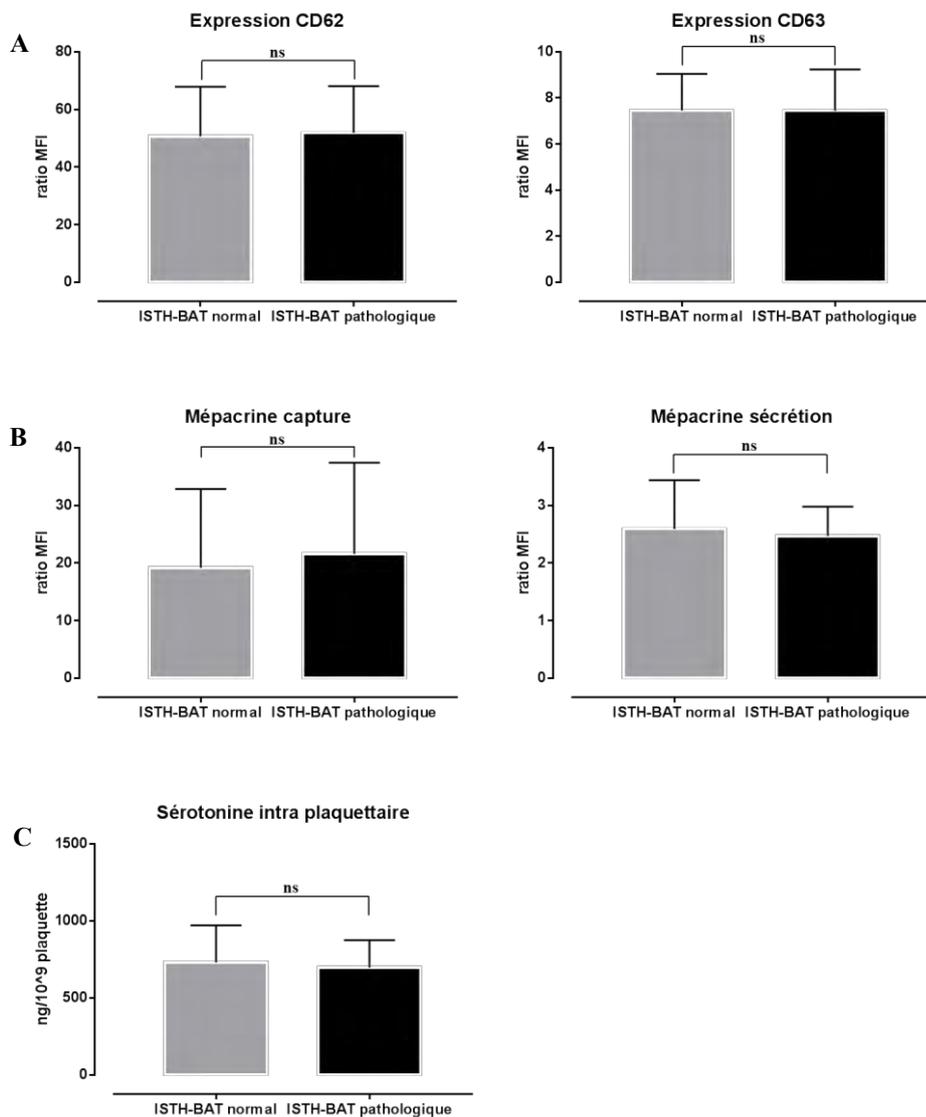


Figure 16 : CD62, CD63, Sérotonine intra plaquettaire : comparaison des groupes ISTH-BAT normal versus ISTH-BAT pathologique. A : Ratio CD62 et CD63 après activation par le TRAP-6. B : Ratio mépacrine pour les phases de capture et de sécrétion. C : Sérotonine intra plaquettaire dosée par méthode ELISA.

IV. Discussion

Dans cette étude, nous avons appliqué de manière systématique un même panel d'agonistes plaquettaires à des concentrations issues des recommandations internationales^{77,127}, sur une cohorte de patients atteints de troubles héréditaires des fonctions plaquettaires, c'est-à-dire à des patients connus pour avoir une agrégation plaquettaire pathologique avec au moins deux inducteurs, sur deux prélèvements différents. L'ADP et l'épinéphrine étaient les principaux inducteurs touchés. L'ADP à la concentration faible de 5 μ M était anormale chez tous les patients, tandis que l'épinéphrine était anormale chez 85% des patients aux concentrations de 5 et 10 μ M.

Les phénotypes d'agrégation plaquettaire des patients de cette étude pouvaient être classés en quatre sous-groupes :

- 7 patients présentaient des anomalies de l'agrégation plaquettaire de type G α i-like (défaut d'agrégation à l'ADP et à l'épinéphrine avec une agrégation transitoire à l'ADP ainsi qu'une première vague réduite ou absente sans seconde vague d'agrégation à l'épinéphrine, réduction mineure possible de l'agrégation à des concentrations faibles et intermédiaires d'autres agonistes plaquettaires, réponse à l'acide arachidonique (1mM) normale).
- 7 patients présentaient des anomalies mineures de l'agrégation plaquettaire (anomalies regroupant les phénomènes d'hypoagrégabilité à l'ADP 5 μ M et se normalisant à la concentration de 10 μ M, d'allongement du temps de latence à l'épinéphrine, et possiblement d'hypo agrégabilité mineure à d'autres agonistes à faible concentration).

- 4 patients présentaient des anomalies complexes de l'agrégation plaquettaire (anomalies touchant plusieurs inducteurs et ne pouvant être affectées dans aucun autre groupe).
- 1 patient présentait des anomalies de sécrétion des granules denses (réduction de l'agrégation à de faibles concentrations de la plupart des agonistes plaquettaire sauf à l'ADP, impacté de façon plus modérée).

Cette répartition des anomalies d'agrégation plaquettaire chez des patients atteints de THFP est comparable à ce qu'ont pu retrouver d'autres études.^{82,84}

Les anomalies de l'agrégation plaquettaire retrouvées dans cette étude orientent majoritairement vers des défauts des voies de signalisation intra plaquettaire. 7 patients présentaient des anomalies de type G α i-like, potentiellement liées à des anomalies de la voie de signalisation de la protéine G. En effet la protéine G hétérotrimérique joue un rôle majeur dans la transduction du signal d'activation plaquettaire des récepteurs à sept domaines transmembranaires. L'ADP active les voies de signalisation G α i et G α q tandis que l'épinéphrine active la sous unité G α z de la protéine G hétérotrimérique. Les voies de signalisation G α i et G α z ont pour spécificité de n'être activées que par un seul récepteur, respectivement le récepteur P2Y₁₂ à l'ADP et le récepteur α 2a à l'épinéphrine. Ceci implique donc que des anomalies de ces voies de signalisation se traduisent directement par des modifications spécifiques de l'agrégation plaquettaire contrairement aux voies de signalisation empruntant les sous unités G α q et G α 13, qui sont activables par plusieurs inducteurs différents (Thrombine, TXA₂, Sérotonine, ADP). Une anomalie d'un récepteur à ces agonistes (5-HT_{2a}, PAR-1, PAR-4, P2Y₁, TP α/β) peut donc être au moins partiellement masquée par les autres récepteurs fonctionnels. Néanmoins, il est peu probable que les

anomalies plaquettaires présentées par les patients de cette étude soient causées par des mutations très délétères de la protéine G hétérotrimérique. En effet, la signalisation médiée par la protéine G étant un mécanisme commun à de très nombre types cellulaires, des mutations touchant largement la protéine G pourraient provoquer un phénotype plus sévère dans d'autres tissus voire être létale in utéro.¹²⁸

Le critère de recherche de l'agrégation plaquettaire mesurant l'aire sous la courbe à 4 minutes n'identifiait pas non plus d'agoniste plaquettaire distinguant les patients avec un score hémorragique normal versus pathologique. Cette mesure à 4 minutes permet de prendre en compte partiellement les anomalies à type d'allongement du temps de latence, d'hypo agrégabilité ou encore de désagrégation. Malheureusement la mesure de ce paramètre est arrêtée trop précocement dans le temps. L'agrégation plaquettaire est mesurée sur 10 minutes, et la mesure de l'aire sous courbe à 10 minutes permettrait d'intégrer plus fidèlement les différentes anomalies que l'on peut rencontrer lors d'une agrégation plaquettaire.

Pour ce travail, nous avons utilisé un protocole de cytométrie en flux simple d'utilisation⁹⁶ qui permet de détecter la présence et la mobilisation des granules α et des granules denses après activation par le TRAP-6. D'autres protocoles d'exploration des granules plaquettaires par cytométrie en flux ont été développés ces dernières années^{93,129}, cependant leur complexité les rend peu applicables en pratique clinique courante. La très grande majorité des patients de notre cohorte présentait des ratios de sécrétion des granules α (marquage au CD62) et des granules denses (marquage au CD63) ainsi que des tests à la mépacrine normaux. Seuls deux patients avaient des ratios d'expression de CD62 très légèrement diminués et trois patients des ratios de sécrétion des granules denses après incubation avec la mépacrine très légèrement diminués également. Ces résultats démontraient la présence des granules α et des granules denses, ainsi que leur capacité à être mobilisé par l'intermédiaire d'un agoniste plaquettaire

puissant dans l'immense majorité des cas. Les anomalies rencontrées lors des analyses en cytométrie en flux étaient toujours très modérées, probablement en rapport avec de discrètes anomalies dans les voies de signalisation des granules plaquettaires.

Le contenu des granules denses était aussi évalué par le dosage de la sérotonine intra plaquettaire par méthode ELISA, normal chez tous les patients.

Même si l'apport de la cytométrie en flux dans le diagnostic des THFP mineurs semble être limité, il est intéressant de noter que la patiente n°6, avec une agrégation plaquettaire évoquant un déficit en granules denses ou une anomalie dans ses voies de signalisation, avait en parallèle un test de capture à la mépacrine normal et un test de sécrétion de la mépacrine légèrement diminué. Les deux analyses étaient donc en faveur d'une anomalie de sécrétion des granules denses.

Le score hémorragique élaboré par l'ISTH-SCC a été validé récemment pour le diagnostic des pathologies plaquettaires.⁶² Cependant, les études ayant conduit à utiliser ce score dans les thrombopathies incluaient les thrombopathies sévères, caractérisées par une symptomatologie hémorragique très marquée.^{62,84,130,131} Dans notre étude qui s'intéressait uniquement aux thrombopathies mineures, les résultats du score hémorragique (l'ISTH-SSC BAT) réalisé au cours des consultations étaient très hétérogènes. Dix patients avaient un score hémorragique normal et dix patients un score hémorragique pathologique. La comparaison de ces deux groupes (ISTH-BAT normal versus anormal) ne permettait pas de mettre en évidence de différence significative concernant les paramètres de l'agrégométrie optique, de la cytométrie en flux ou de la sérotonine intra plaquettaire. L'étude de Lowe en 2013 comparait également des sous-groupes de thrombopathies dont des anomalies de type G α i-like et des anomalies de sécrétion¹²⁶. Les scores ISTH-BAT étaient très variables au sein des sous-groupes, comme

dans notre travail. Cette étude ne permettait pas de mettre en évidence d'association entre le type d'anomalie plaquettaire détectée par agrégométrie et le score ISTH-BAT.

Dans notre étude, une seule analyse semblait associée à un profil hémorragique ; le dosage du facteur II résiduel, qui était significativement plus faible dans le groupe ISTH-BAT normal que dans le groupe ISTH-BAT pathologique. Le dosage du facteur II résiduel est un test de coagulation global, de routine et automatisé. Quelques très rares études avaient montré un allongement du temps de consommation de la prothrombine (très proche méthodologiquement du taux de facteur II résiduel) dans certaines pathologies hémorragiques incluant des pathologies plaquettaires dont les déficits en GpIIb-IIIa, les déficits en granules denses ou encore le syndrome de Scott.^{101-104,132,133} Ceci est concordant avec nos résultats qui montrent que des patients avec des fonctions plaquettaires altérées, de façon isolée comme dans notre travail, présentent des niveaux de facteur II résiduel augmentés. À notre connaissance, cette étude est la première à établir un lien direct entre l'élévation du taux de facteur II résiduel et un score ISTH-BAT pathologique chez des patients atteints de THFP mineurs.

Ce travail présente plusieurs points forts.

Il s'agissait d'une étude de cohorte prospective.

Elle utilisait un panel d'examen biologiques exhaustif et respectant les recommandations internationales. Les analyses étaient réalisées au sein d'un même CHU, par une équipe formée aux techniques d'exploration des pathologies plaquettaires, limitant les variations inter-opérateurs.

De plus ces analyses biologiques spécialisées étaient utilisées sur une population définie comme ayant un THFP défini par des critères d'inclusion stricts. La population incluse, en terme d'âge et de sexe, était tout à fait comparable aux études antérieures portant sur les THFP.^{62,84,126,131}

Enfin la comparaison des anomalies biologiques à un score hémorragique validé dans les pathologies plaquettaires permettait d'obtenir un phénotype clinico-biologique complet.

L'étude PLATOON souffre cependant de plusieurs limites.

La principale est évidemment le nombre assez faible de patients inclus (seulement vingt). Un nombre plus important de patients aurait peut-être pu permettre d'identifier certains facteurs de concordance entre score hémorragique anormal et anomalies des fonctions plaquettaires.

De plus cette cohorte n'a pas été comparée à une population témoin. Cependant toutes les normes de laboratoire de l'agrégation plaquettaire et de la cytométrie en flux ont été réalisées sur une population de sujets volontaires sains et représentatifs de la population générale permettant d'établir des limites fiables.

V. Perspectives

Quelques études se sont intéressées au diagnostic moléculaire des THFP mineures.^{134,135} Les analyses génétiques peuvent permettre d'établir avec certitude le diagnostic de THFP chez des patients présentant des anomalies biologiques mineures associées à une symptomatologie hémorragique hétérogène, voire parfois absente.

L'étude de Leo utilisait un très large panel de gènes chez des patients présentant des anomalies plaquettaires à type de défauts de sécrétion des granules denses ou d'anomalies Goi-like.¹³⁴ Plus de 80 gènes impliquant le récepteur P2Y12 à l'ADP, l'adénylate cyclase, les récepteurs de prostacycline ou encore des protéines impliquées dans la localisation, le transport et la sécrétion des granules dans l'organisme pouvaient être incriminés. Cependant cette étude soulignait certaines limites partagées par l'étude de Gorski¹³⁵, notamment l'absence de recherche d'anomalies génétiques délétères dans les régions non codantes des gènes plaquettaires ciblés, la limitation des recherches à un panel de gènes ou encore certains mécanismes génétiques non détectés par la technique de séquençage de l'exome, tels que la variation du nombre de copies, les grandes insertions ou délétions ou d'autres variantes structurelles du génome.

La caractérisation moléculaire des anomalies n'a pas été réalisée dans cette étude. La prochaine étape de ce travail serait de cibler spécifiquement quelques gènes candidats sur une plus grande cohorte afin d'essayer de trouver des mutations communes aux différents profils plaquettaires et hémorragiques des patients.

VI. Conclusion

L'étude PLATOON est une étude de cohorte, monocentrique, prospective, dont l'objectif était de préciser les mécanismes physiopathologiques responsables de troubles héréditaires des fonctions plaquettaires mineurs chez des patients présentant une agrégation plaquettaire retrouvée pathologique à deux reprises et sur deux agonistes plaquettaires différents. Nous avons aussi réalisé le score hémorragique proposé par l'ISTH-SSC et validé dans les thrombopathie afin d'essayer de mettre en évidence une ou plusieurs analyse(s) biologique(s) associée(s) à un score hémorragique pathologique.

Les résultats de l'agrégation plaquettaire, de la cytométrie en flux et du dosage de la sérotonine intra plaquettaire orientaient en majorité vers des défauts des voies de signalisation de la protéine G α i ainsi que des anomalies mineures et des anomalies complexes de l'agrégation plaquettaire. Un seul patient présentait des résultats en faveur d'anomalies dans les voies de sécrétion des granules denses. Aucun paramètre de l'agrégation plaquettaire ou de la cytométrie en flux n'était associé à un score hémorragique supérieur à la normale.

Le dosage du facteur II résiduel en revanche était significativement plus élevé dans le groupe ISTH-BAT pathologique comparé au groupe ISTH-BAT normal.

Références

1. Ogawa, M. Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells. *Blood* **81**, 2844–2853 (1993).
2. Shivdasani, R. A. Molecular and transcriptional regulation of megakaryocyte differentiation. *Stem Cells* **19**, 397–407 (2001).
3. Vitrat, N. *et al.* Endomitosis of human megakaryocytes are due to abortive mitosis. *Blood* **91**, 3711–3723 (1998).
4. Raslova, H. *et al.* Megakaryocyte polyploidization is associated with a functional gene amplification. *Blood* **101**, 541–544 (2003).
5. Youssefian, T. & Cramer, E. M. Megakaryocyte dense granule components are sorted in multivesicular bodies. *Blood* **95**, 4004–4007 (2000).
6. Patel, S. R. *et al.* Differential roles of microtubule assembly and sliding in proplatelet formation by megakaryocytes. *Blood* **106**, 4076–4085 (2005).
7. Rojnuckarin, P. & Kaushansky, K. Actin reorganization and proplatelet formation in murine megakaryocytes: the role of protein kinase calpha. *Blood* **97**, 154–161 (2001).
8. Thon, J. N. *et al.* Cytoskeletal mechanics of proplatelet maturation and platelet release. *J. Cell Biol.* **191**, 861–874 (2010).
9. Machlus, K. R. & Italiano, J. E. J. The incredible journey: From megakaryocyte development to platelet formation. *J. Cell Biol.* **201**, 785–796 (2013).
10. Long, M. W. Megakaryocyte differentiation events. *Semin. Hematol.* **35**, 192–199 (1998).
11. Lefrançais, E. *et al.* The lung is a site of platelet biogenesis and a reservoir for haematopoietic progenitors. *Nature* **544**, 105–109 (2017).
12. Pedersen, N. T. Occurrence of megakaryocytes in various vessels and their retention in the pulmonary capillaries in man. *Scand. J. Haematol.* **21**, 369–375 (1978).
13. Mason, K. D. *et al.* Programmed anuclear cell death delimits platelet life span. *Cell* **128**, 1173–1186 (2007).
14. Grozovsky, R. *et al.* The Ashwell-Morell receptor regulates hepatic thrombopoietin production via JAK2-STAT3 signaling. *Nat. Med.* **21**, 47–54 (2015).
15. Collier, B. S. Biochemical and electrostatic considerations in primary platelet aggregation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **416**, 693–708 (1983).
16. O'Donnell, V. B., Murphy, R. C. & Watson, S. P. Platelet lipidomics: modern day perspective on lipid discovery and characterization in platelets. *Circ. Res.* **114**, 1185–1203 (2014).
17. Fadeel, B. & Xue, D. The ins and outs of phospholipid asymmetry in the plasma membrane: roles in health and disease. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **44**, 264–277 (2009).
18. Jin, W. *et al.* A role for glycosphingolipid-enriched microdomains in platelet glycoprotein Ib-mediated platelet activation. *J. Thromb. Haemost.* **5**, 1034–1040 (2007).
19. Clemetson, K. J. & Clemetson, J. M. Platelet receptors. in *Platelets, 4th edition* 169–192 (2019).
20. Burkhart, J. M. *et al.* The first comprehensive and quantitative analysis of human platelet

- protein composition allows the comparative analysis of structural and functional pathways. *Blood* **120**, e73-82 (2012).
21. Du, X. & Ginsberg, M. H. Integrin alpha IIb beta 3 and platelet function. *Thromb. Haemost.* **78**, 96–100 (1997).
 22. Escolar, G. & White, J. G. The platelet open canalicular system: a final common pathway. *Blood Cells* **17**, 467–495 (1991).
 23. Brass, L. F. Ca²⁺ homeostasis in unstimulated platelets. *J. Biol. Chem.* **259**, 12563–12570 (1984).
 24. Carey, F., Menashi, S. & Crawford, N. Localization of cyclo-oxygenase and thromboxane synthetase in human platelet intracellular membranes. *Biochem. J.* **204**, 847–851 (1982).
 25. King, S. M. & Reed, G. L. Development of platelet secretory granules. *Semin. Cell Dev. Biol.* **13**, 293–302 (2002).
 26. Harrison, P., Savidge, G. F. & Cramer, E. M. The origin and physiological relevance of alpha-granule adhesive proteins. *Br. J. Haematol.* **74**, 125–130 (1990).
 27. McNicol, A. & Israels, S. J. Platelet dense granules: structure, function and implications for haemostasis. *Thromb. Res.* **95**, 1–18 (1999).
 28. Heijnen, H. & van der Sluijs, P. Platelet secretory behaviour: as diverse as the granules ... or not? *J. Thromb. Haemost.* **13**, 2141–2151 (2015).
 29. Di Michele, M. *et al.* An integrated proteomics and genomics analysis to unravel a heterogeneous platelet secretion defect. *J. Proteomics* **74**, 902–913 (2011).
 30. Mills, E. W., Green, R. & Ingolia, N. T. Slowed decay of mRNAs enhances platelet specific translation. *Blood* **129**, e38–e48 (2017).
 31. Allam, O. *et al.* Differential synthesis and release of IL-18 and IL-18 Binding Protein from human platelets and their implications for HIV infection. *Cytokine* **90**, 144–154 (2017).
 32. Harrison, P. Platelet function analysis. *Blood Rev.* **19**, 111–123 (2005).
 33. Archer, S. L. *et al.* Nitric oxide and cGMP cause vasorelaxation by activation of a charybdotoxin-sensitive K channel by cGMP-dependent protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 7583–7587 (1994).
 34. Schwarz, U. R., Walter, U. & Eigenthaler, M. Taming platelets with cyclic nucleotides. *Biochem. Pharmacol.* **62**, 1153–1161 (2001).
 35. Moncada, S., Gryglewski, R., Bunting, S. & Vane, J. R. An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. *Nature* **263**, 663–665 (1976).
 36. Marcus, A. J. & Safier, L. B. Thromboregulation: multicellular modulation of platelet reactivity in hemostasis and thrombosis. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **7**, 516–522 (1993).
 37. Picker, S. M. In-vitro assessment of platelet function. *Transfus. Apher. Sci. Off. J. World Apher. Assoc. Off. J. Eur. Soc. Haemapheresis* **44**, 305–319 (2011).
 38. Lenting, P. J., Casari, C., Christophe, O. D. & Denis, C. V. von Willebrand factor: the old, the new and the unknown. *J. Thromb. Haemost.* **10**, 2428–2437 (2012).
 39. Induruwa, I. *et al.* Platelet collagen receptor Glycoprotein VI-dimer recognizes fibrinogen and fibrin through their D-domains, contributing to platelet adhesion and activation during thrombus formation. *J. Thromb. Haemost.* **16**, 389–404 (2018).

40. Gross, B. S., Melford, S. K. & Watson, S. P. Evidence that phospholipase C-gamma2 interacts with SLP-76, Syk, Lyn, LAT and the Fc receptor gamma-chain after stimulation of the collagen receptor glycoprotein VI in human platelets. *Eur. J. Biochem.* **263**, 612–623 (1999).
41. Neer, E. J. Heterotrimeric G proteins: organizers of transmembrane signals. *Cell* **80**, 249–257 (1995).
42. Stalker, T. J., Newman, D. K., Ma, P., Wannemacher, K. M. & Brass, L. F. Platelet signaling. *Handb. Exp. Pharmacol.* 59–85 (2012) doi:10.1007/978-3-642-29423-5_3.
43. Varga-Szabo, D., Braun, A. & Nieswandt, B. STIM and Orai in platelet function. *Cell Calcium* **50**, 270–278 (2011).
44. Shattil, S. J., Kim, C. & Ginsberg, M. H. The final steps of integrin activation: the end game. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**, 288–300 (2010).
45. Crittenden, J. R. *et al.* CalDAG-GEFI integrates signaling for platelet aggregation and thrombus formation. *Nat. Med.* **10**, 982–986 (2004).
46. Yada, Y., Ozeki, T., Kanoh, H. & Nozawa, Y. Purification and characterization of cytosolic diacylglycerol kinases of human platelets. *J. Biol. Chem.* **265**, 19237–19243 (1990).
47. Dorsam, R. T., Kim, S., Jin, J. & Kunapuli, S. P. Coordinated signaling through both G12/13 and G(i) pathways is sufficient to activate GPIIb/IIIa in human platelets. *J. Biol. Chem.* **277**, 47588–47595 (2002).
48. Woulfe, D., Jiang, H., Mortensen, R., Yang, J. & Brass, L. F. Activation of Rap1B by G(i) family members in platelets. *J. Biol. Chem.* **277**, 23382–23390 (2002).
49. Min, S. H. & Abrams, C. S. Regulation of platelet plug formation by phosphoinositide metabolism. *Blood* **122**, 1358–1365 (2013).
50. Börsch-Haubold, A. G. *et al.* Phosphorylation of cytosolic phospholipase A2 in platelets is mediated by multiple stress-activated protein kinase pathways. *Eur. J. Biochem.* **265**, 195–203 (1999).
51. Cavallini, L., Coassin, M., Borean, A. & Alexandre, A. Prostacyclin and sodium nitroprusside inhibit the activity of the platelet inositol 1,4,5-trisphosphate receptor and promote its phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **271**, 5545–5551 (1996).
52. Mellion, B. T. *et al.* Evidence for the inhibitory role of guanosine 3', 5'-monophosphate in ADP-induced human platelet aggregation in the presence of nitric oxide and related vasodilators. *Blood* **57**, 946–955 (1981).
53. Rendu, F. & Brohard-Bohn, B. The platelet release reaction: granules' constituents, secretion and functions. *Platelets* **12**, 261–273 (2001).
54. Ruggeri, Z. M., Dent, J. A. & Saldívar, E. Contribution of distinct adhesive interactions to platelet aggregation in flowing blood. *Blood* **94**, 172–178 (1999).
55. Walsh, P. N. Platelet coagulation-protein interactions. *Semin. Thromb. Hemost.* **30**, 461–471 (2004).
56. Semple, J. W., Italiano, J. E. J. & Freedman, J. Platelets and the immune continuum. *Nat. Rev. Immunol.* **11**, 264–274 (2011).
57. Schrottmaier, W. C., Kral, J. B., Badrnya, S. & Assinger, A. Aspirin and P2Y12 Inhibitors in platelet-mediated activation of neutrophils and monocytes. *Thromb. Haemost.* **114**, 478–489 (2015).
58. Mammadova-Bach, E. *et al.* Platelet glycoprotein VI promotes metastasis through interaction

- with cancer cell-derived galectin-3. *Blood* **135**, 1146–1160 (2020).
59. Massberg, S. *et al.* A critical role of platelet adhesion in the initiation of atherosclerotic lesion formation. *J. Exp. Med.* **196**, 887–896 (2002).
 60. Rodeghiero, F. *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.* **8**, 2063–2065 (2010).
 61. Fogarty, P. F., Tarantino, M. D., Brainsky, A., Signorovitch, J. & Grotzinger, K. M. Selective validation of the WHO Bleeding Scale in patients with chronic immune thrombocytopenia. *Curr. Med. Res. Opin.* **28**, 79–87 (2012).
 62. Gresele, P. *et al.* Validation of the ISTH/SSC bleeding assessment tool for inherited platelet disorders: A communication from the Platelet Physiology SSC. *J. Thromb. Haemost.* **18**, 732–739 (2020).
 63. Zhu, W., He, W., Guo, L., Wang, X. & Hong, K. The HAS-BLED Score for Predicting Major Bleeding Risk in Anticoagulated Patients With Atrial Fibrillation: A Systematic Review and Meta-analysis. *Clin. Cardiol.* **38**, 555–561 (2015).
 64. Higham, J. M., O'Brien, P. M. & Shaw, R. W. Assessment of menstrual blood loss using a pictorial chart. *Br. J. Obstet. Gynaecol.* **97**, 734–739 (1990).
 65. Salignac, S., Latger-Cannard, V., Schlegel, N. & Lecompte, T. P. Platelet counting. *Methods Mol. Biol.* **992**, 193–205 (2013).
 66. Hoffmann, J. J. M. L. Reference range of mean platelet volume. *Thrombosis research* vol. 129 534–535 (2012).
 67. Kienast, J. & Schmitz, G. Flow cytometric analysis of thiazole orange uptake by platelets: a diagnostic aid in the evaluation of thrombocytopenic disorders. *Blood* **75**, 116–121 (1990).
 68. Buttarello, M., Mezzapelle, G., Freguglia, F. & Plebani, M. Reticulated platelets and immature platelet fraction: Clinical applications and method limitations. *Int. J. Lab. Hematol.* **42**, 363–370 (2020).
 69. Latger-Cannard, V., Fenneteau, O., Salignac, S., Lecompte, T. P. & Schlegel, N. Platelet morphology analysis. *Methods Mol. Biol.* **992**, 207–225 (2013).
 70. Stevenson, W. S. *et al.* Paris-Trousseau thrombocytopenia is phenocopied by the autosomal recessive inheritance of a DNA-binding domain mutation in FLI1. *Blood* **126**, 2027–2030 (2015).
 71. Kundu, S. K. *et al.* Description of an in vitro platelet function analyzer--PFA-100. *Semin. Thromb. Hemost.* **21 Suppl 2**, 106–112 (1995).
 72. Favaloro, E. J. Utility of the platelet function analyser (PFA-100/200) for exclusion or detection of von Willebrand disease: A study 22 years in the making. *Thromb. Res.* **188**, 17–24 (2020).
 73. Harrison, P. *et al.* Guidelines for the laboratory investigation of heritable disorders of platelet function. *Br. J. Haematol.* **155**, 30–44 (2011).
 74. Born, G. V. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature* **194**, 927–929 (1962).
 75. Gresele, P. Diagnosis of inherited platelet function disorders: guidance from the SSC of the ISTH. *J. Thromb. Haemost.* **13**, 314–322 (2015).
 76. Cattaneo, M. *et al.* Recommendations for the Standardization of Light Transmission

- Aggregometry: A Consensus of the Working Party from the Platelet Physiology Subcommittee of SSC/ISTH. *J. Thromb. Haemost.* (2013) doi:10.1111/jth.12231.
77. Hayward, C. P. M. *et al.* Development of North American consensus guidelines for medical laboratories that perform and interpret platelet function testing using light transmission aggregometry. *Am. J. Clin. Pathol.* **134**, 955–963 (2010).
 78. Hayward, C. P. M. Diagnostic evaluation of platelet function disorders. *Blood Rev.* **25**, 169–173 (2011).
 79. Cattaneo, M. *et al.* Results of a worldwide survey on the assessment of platelet function by light transmission aggregometry: a report from the platelet physiology subcommittee of the SSC of the ISTH. *J. Thromb. Haemost.* **7**, 1029 (2009).
 80. Lages, B. & Weiss, H. J. Biphasic aggregation responses to ADP and epinephrine in some storage pool deficient platelets: relationship to the role of endogenous ADP in platelet aggregation and secretion. *Thromb. Haemost.* **43**, 147–153 (1980).
 81. Cattaneo, M. Light transmission aggregometry and ATP release for the diagnostic assessment of platelet function. *Semin. Thromb. Hemost.* **35**, 158–167 (2009).
 82. Dawood, B. B. *et al.* Evaluation of participants with suspected heritable platelet function disorders including recommendation and validation of a streamlined agonist panel. *Blood* **120**, 5041–5049 (2012).
 83. Dawood, B. B., Wilde, J. & Watson, S. P. Reference curves for aggregation and ATP secretion to aid diagnose of platelet-based bleeding disorders: effect of inhibition of ADP and thromboxane A(2) pathways. *Platelets* **18**, 329–345 (2007).
 84. Adler, M., Kaufmann, J., Alberio, L. & Nagler, M. Diagnostic utility of the ISTH bleeding assessment tool in patients with suspected platelet function disorders. *J. Thromb. Haemost.* **17**, 1104–1112 (2019).
 85. Quiroga, T. *et al.* High prevalence of bleeders of unknown cause among patients with inherited mucocutaneous bleeding. A prospective study of 280 patients and 299 controls. *Haematologica* **92**, 357–365 (2007).
 86. Lin, T.-M., Lin, J.-S., Tseng, J.-Y., Wu, S.-Y. & Chen, T.-Y. Impaired responsiveness of platelets to epinephrine due to α 2A adrenoreceptor deficiency in Male Chinese. *Platelets* **27**, 149–154 (2016).
 87. Rubak, P., Nissen, P. H., Kristensen, S. D. & Hvas, A.-M. Investigation of platelet function and platelet disorders using flow cytometry. *Platelets* **27**, 66–74 (2016).
 88. van Asten, I. *et al.* Validation of flow cytometric analysis of platelet function in patients with a suspected platelet function defect. *J. Thromb. Haemost.* **16**, 689–698 (2018).
 89. van Asten, I., Schutgens, R. E. G. & Urbanus, R. T. Toward Flow Cytometry Based Platelet Function Diagnostics. *Semin. Thromb. Hemost.* **44**, 197–205 (2018).
 90. Andres, O. *et al.* Diagnosis of platelet function disorders: A standardized, rational, and modular flow cytometric approach. *Platelets* **29**, 347–356 (2018).
 91. Gresele, P., Bury, L., Mezzasoma, A. M. & Falcinelli, E. Platelet function assays in diagnosis: an update. *Expert Rev. Hematol.* **12**, 29–46 (2019).
 92. Fouassier, M., Babuty, A., Debord, C. & Béné, M. C. Platelet immunophenotyping in health and inherited bleeding disorders, a review and practical hints. *Cytometry B. Clin. Cytom.* **98**, 464–475 (2020).
 93. van Asten, I. *et al.* Flow cytometric mepacrine fluorescence can be used for the exclusion of

- platelet dense granule deficiency. *J. Thromb. Haemost.* **18**, 706–713 (2020).
94. Halliez, M. *et al.* Detection of phosphatidyl serine on activated platelets' surface by flow cytometry in whole blood: a simpler test for the diagnosis of Scott syndrome. *British journal of haematology* vol. 171 290–292 (2015).
 95. Skaer, R. J., Flemans, R. J. & McQuilkan, S. Mepacrine stains the dense bodies of human platelets and not platelet lysosomes. *Br. J. Haematol.* **49**, 435–438 (1981).
 96. Cai, H. *et al.* Usefulness of Flow Cytometric Mepacrine Uptake/Release Combined with CD63 Assay in Diagnosis of Patients with Suspected Platelet Dense Granule Disorder. *Semin. Thromb. Hemost.* **42**, 282–291 (2016).
 97. Coleman, J. R. *et al.* Rapid TEG efficiently guides hemostatic resuscitation in trauma patients. *Surgery* **164**, 489–493 (2018).
 98. Dargaud, Y., Wolberg, A. S., Gray, E., Negrier, C. & Hemker, H. C. Proposal for standardized preanalytical and analytical conditions for measuring thrombin generation in hemophilia: communication from the SSC of the ISTH. *J. Thromb. Haemost.* **15**, 1704–1707 (2017).
 99. Brunet, J. G. *et al.* Thrombin generation abnormalities in Quebec platelet disorder. *Int. J. Lab. Hematol.* **42**, 801–809 (2020).
 100. Boisseau, P. *et al.* A new mutation of ANO6 in two familial cases of Scott syndrome. *Br. J. Haematol.* **180**, 750–752 (2018).
 101. Owen, C. A. J. & Thompson, J. H. J. Soybean phosphatides in prothrombin-consumption and thromboplastin-generation tests: their use in recognizing 'thrombasthenic hemophilia'. *Am. J. Clin. Pathol.* **33**, 197–208 (1960).
 102. Weiss, H. J., Vivic, W. J., Lages, B. A. & Rogers, J. Isolated deficiency of platelet procoagulant activity. *Am. J. Med.* **67**, 206–213 (1979).
 103. Weiss, H. J. Impaired platelet procoagulant mechanisms in patients with bleeding disorders. *Semin. Thromb. Hemost.* **35**, 233–241 (2009).
 104. Satta, N., Toti, F., Fressinaud, E., Meyer, D. & Freyssinet, J. M. Scott syndrome: an inherited defect of the procoagulant activity of platelets. *Platelets* **8**, 117–124 (1997).
 105. Kluge, H. *et al.* Serotonin in platelets: Comparative analyses using new enzyme immunoassay and HPLC test kits and the traditional fluorimetric procedure. *J Lab Med* **23**, 360–364 (1999).
 106. Harrison, P. *et al.* Uptake of plasma fibrinogen into the alpha granules of human megakaryocytes and platelets. *J. Clin. Invest.* **84**, 1320–1324 (1989).
 107. Vadivel, K. *et al.* Platelets contain tissue factor pathway inhibitor-2 derived from megakaryocytes and inhibits fibrinolysis. *J. Biol. Chem.* **289**, 31647–31661 (2014).
 108. Huizing, M. *et al.* Hermansky-Pudlak syndrome: Mutation update. *Hum. Mutat.* **41**, 543–580 (2020).
 109. Zhang, M. Y. *et al.* Germline ETV6 mutations in familial thrombocytopenia and hematologic malignancy. *Nat. Genet.* **47**, 180–185 (2015).
 110. Noris, P. *et al.* Mutations in ANKRD26 are responsible for a frequent form of inherited thrombocytopenia: analysis of 78 patients from 21 families. *Blood* **117**, 6673–6680 (2011).
 111. Heather, J. M. & Chain, B. The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. *Genomics* **107**, 1–8 (2016).
 112. Albers, C. A. *et al.* Exome sequencing identifies NBEAL2 as the causative gene for gray platelet syndrome. *Nat. Genet.* **43**, 735–737 (2011).

113. Jones, M. L. *et al.* Rapid genetic diagnosis of heritable platelet function disorders with next-generation sequencing: proof-of-principle with Hermansky-Pudlak syndrome. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* vol. 10 306–309 (2012).
114. Sivapalaratnam, S. *et al.* Rare variants in GP1BB are responsible for autosomal dominant macrothrombocytopenia. *Blood* **129**, 520–524 (2017).
115. Serebruany, V. L. Selective serotonin reuptake inhibitors and increased bleeding risk: are we missing something? *Am. J. Med.* **119**, 113–116 (2006).
116. Royer, D. J., George, J. N. & Terrell, D. R. Thrombocytopenia as an adverse effect of complementary and alternative medicines, herbal remedies, nutritional supplements, foods, and beverages. *Eur. J. Haematol.* **84**, 421–429 (2010).
117. Papadakis, E., Hoffman, R. & Brenner, B. Thrombohemorrhagic complications of myeloproliferative disorders. *Blood Rev.* **24**, 227–232 (2010).
118. Pietrzak, I., Komarnicki, M. & Zaremba-Drobnik, D. Platelet aggregation and prostaglandin metabolism in uremic patients. *Am. J. kidney Dis. Off. J. Natl. Kidney Found.* **38**, S111–4 (2001).
119. Podda, G., Femia, E. A., Pugliano, M. & Cattaneo, M. Congenital defects of platelet function. *Platelets* **23**, 552–563 (2012).
120. Masliah-Planchon, J., Darnige, L. & Bellucci, S. Molecular determinants of platelet delta storage pool deficiencies: an update. *Br. J. Haematol.* **160**, 5–11 (2013).
121. Israels, S. J., El-Ekiaby, M., Quiroga, T. & Mezzano, D. Inherited disorders of platelet function and challenges to diagnosis of mucocutaneous bleeding. *Haemophilia* **16 Suppl 5**, 152–159 (2010).
122. Nurden, A. T. & Nurden, P. Congenital platelet disorders and understanding of platelet function. *Br. J. Haematol.* **165**, 165–178 (2014).
123. Dupuis, A., Bordet, J.-C., Eckly, A. & Gachet, C. Platelet δ -Storage Pool Disease: An Update. *J. Clin. Med.* **9**, (2020).
124. Fouassier, M., Bourgerette, E., Libert, F., Pouplard, C. & Marques-Verdier, A. Determination of serotonin release from platelets by HPLC and ELISA in the diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia: comparison with reference method by [3 H]-serotonin release assay. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* vol. 4 1136–1139 (2006).
125. Tosetto, A. *et al.* A quantitative analysis of bleeding symptoms in type 1 von Willebrand disease: results from a multicenter European study (MCMDM-1 VWD). *J. Thromb. Haemost.* **4**, 766–773 (2006).
126. Lowe, G. C., Lordkipanidzé, M. & Watson, S. P. Utility of the ISTH bleeding assessment tool in predicting platelet defects in participants with suspected inherited platelet function disorders. *J. Thromb. Haemost.* **11**, 1663–1668 (2013).
127. Gomez, K. *et al.* Clinical and laboratory diagnosis of heritable platelet disorders in adults and children. *British journal of haematology* (2021) doi:10.1111/bjh.17690.
128. Syrovatkina, V., Alegre, K. O., Dey, R. & Huang, X.-Y. Regulation, Signaling, and Physiological Functions of G-Proteins. *J. Mol. Biol.* **428**, 3850–3868 (2016).
129. Busuttill-Crellin, X. *et al.* Guidelines for panel design, optimization, and performance of whole blood multi-color flow cytometry of platelet surface markers. *Platelets* **31**, 845–852 (2020).
130. Kaur, H. *et al.* The utility of International Society on Thrombosis and Haemostasis-Bleeding Assessment Tool and other bleeding questionnaires in assessing the bleeding phenotype in two

- platelet function defects. *Blood Coagul. fibrinolysis an Int. J. Haemost. Thromb.* **27**, 589–593 (2016).
131. Rashid, A. *et al.* Use of ISTH bleeding assessment tool to predict inherited platelet dysfunction in resource constrained settings. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **76**, 373–378 (2016).
 132. Quick, A. J. The prothrombin consumption time as a determinant of platelet function. *Am. J. Clin. Pathol.* **61**, 449–457 (1974).
 133. Weiss, H. J. & Lages, B. Platelet prothrombinase activity and intracellular calcium responses in patients with storage pool deficiency, glycoprotein IIb-IIIa deficiency, or impaired platelet coagulant activity--a comparison with Scott syndrome. *Blood* **89**, 1599–1611 (1997).
 134. Leo, V. C. *et al.* Use of next-generation sequencing and candidate gene analysis to identify underlying defects in patients with inherited platelet function disorders. *J. Thromb. Haemost.* **13**, 643–650 (2015).
 135. Gorski, M. M. *et al.* Complications of whole-exome sequencing for causal gene discovery in primary platelet secretion defects. *Haematologica* **104**, 2084–2090 (2019).

Annexes

Annexe 1 : Score hémorragique ISTH-SCC

Symptoms	Assigned score
Epistaxis	0 = no or trivial 1 = > 5/year or more than 10 minutes 2 = medical consultation 3 = packing/cauterization or antifibrinolytic 4 = blood transfusion/replacement therapy/desmopressin
Cutaneous	0 = no or trivial 1 = bruises 5 or more (> 1cm) in exposed areas 2 = medical consultation 3 = extensive 4 = spontaneous hematoma requiring blood transfusion
Minor wounds	0 = no or trivial 1 = > 5/year or more than 10 minutes 2 = medical consultation 3 = surgical hemostasis 4 = blood transfusion/replacement therapy/desmopressin
Oral cavity	0 = no or trivial 1 = present 2 = medical consultation 3 = surgical hemostasis or antifibrinolytic 4 = blood transfusion/replacement therapy/desmopressin
Gastrointestinal Bleeding	0 = no or trivial 1 = present 2 = medical consultation 3 = surgical hemostasis or antifibrinolytic 4 = blood transfusion/replacement therapy/desmopressin
Hematuria	0 = no or trivial 1 = present 2 = medical consultation 3 = surgical hemostasis, iron therapy 4 = blood transfusion/replacement therapy/desmopressin
Tooth extraction	0 = no/trivial or none done 1 = bleeding in <25% of all procedures, no intervention 2 = bleeding in >25% of all procedures, no intervention 3 = Resuturing or packing 4 = blood transfusion/replacement therapy/desmopressin
Surgery	0 = no/trivial or none done 1 = bleeding in <25% of all procedures, no intervention 2 = bleeding in >25% of all procedures, no intervention 3 = surgical hemostasis or antifibrinolytic 4 = blood transfusion/replacement therapy/desmopressin
Menorrhagia	0 = no or trivial 1 = medical consultation/frequent changing pads/ clots 2 = time off work/school > 2/year or antifibrinolytics /hormonal/ iron therapy 3 = antifibrinolytics and hormonal therapy or since menarche and > 12 months 4= hospitalization/ blood transfusion/replacement therapy/curretage or hysterectomy
Post-partum hemorrhage	0 = no/trivial/no deliveries 1 = consultation /syntocin/lochia > 6 weeks 2 = iron therapy/antifibrinolytics 3 = blood transfusion/replacement therapy/desmopressin 4= surgical intervention
Muscle hematomas	0 = never 1 = post trauma, no therapy 2 = spontaneous, no therapy 3 = replacement therapy/desmopressin 4= surgical intervention/blood transfusion
Hemarthrosis	0 = never 1 = post trauma, no therapy 2 = spontaneous, no therapy 3 = replacement therapy/desmopressin 4= surgical intervention/blood transfusion
Central nervous system bleeding	0 = never 1 = - 2 = - 3 = subdural, intervention 4= intracerebral, intervention
Other bleeding (circumcision/cephalohematoma/umbilical stump, venipuncture)	0 = no/trivial 1 = present 2 = medical consultation 3 = surgical hemostasis, antifibrinolytics 4= blood transfusion/ replacement therapy/desmopressin

Annexe 2 : Avis du Groupe Nantais d’Ethique dans le Domaine de la Santé (GNEDS)

AVIS Groupe Nantais d’Ethique dans le Domaine de la Santé (GNEDS)

Nom du protocole Code et versioning	PLATOON, Troubles héréditaires des fonctions plaquettaires : physiopathologie et évaluation de l'intérêt diagnostique de nouveaux paramètres.
----------------------------------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Investigateur principal	Dr Marc Fouassier (laboratoire d'hématologie)
Lieu de l'étude	CHU de Nantes
Type de l'étude	Non interventionnelle, sur biocollection
Type patients/participants	Patients présentant un test fonctionnel d'agrégation plaquettaire pathologique (groupe THSP) Témoins : sujets sains
Nombre de patients/participants prévus	Groupe THSP : 30 Groupe témoin : 30
Objectif principal	Evaluer la physiopathologie des thrombopathies mineures constitutionnelles
Objectif secondaire	Préciser le potentiel hémorragique de ces pathologies Evaluer la pertinence des examens biologiques

Documents communiqués

Justification de l'étude	Oui
Méthodologie	Oui
Lettre d'information et lettre de consentement	Oui / Oui

Remarque générale

Le GNEDS formule d'abord la remarque qu'il n'a pas pour mission de donner un avis sur les aspects scientifiques du protocole, en particulier sur l'adéquation de la méthodologie aux objectifs poursuivis par l'étude. Il ne tient compte des données d'ordre scientifique et méthodologique que dans la mesure où elles ont des implications d'ordre éthique. Dans le cas présent, il se bornera à constater que les objectifs de cette étude et sa méthodologie sont conformes aux principes de l'éthique.

Confidentialité

Confidentialité	Oui. Par codage
Anonymat	Non précisé
CNIL	Oui, Biocollection OK CNIL

Commentaires :

Information et consentement

Consentement :

Recueil nécessaire	Oui. Pour la biocollection, pas spécifiquement pour PLATOON.
Type consentement préférable	Ecrit
Traçabilité dans le dossier	Non précisé

Annexe 2 : Avis du Groupe Nantais d’Ethique dans le Domaine de la Santé (GNEDS) (2)

va de même pour la note d’information. L’étude PLATOON, pour laquelle un avis est demandé, sera effectuée à partir de cette biocollectio, mais ne bénéficie apparemment pas de documents d’informations / de consentement spécifiques.

Lettre information précisant :

Titre de l’étude	Programme de recherche « hémopathies » pour constitution de la biocollectio, mais pas spécifiquement PLATOON.
But de l’étude	Vaguement car cite des « recherches s’intéressant à la biologie des maladies du sang »
Déroulement de l’étude	Non spécifié
Prise en charge courante inchangée	Oui + « il pourra vous être proposé un prélèvement de sang supplémentaire »
Possibilité de refus de transmission des résultats	Oui
Possibilité de recevoir résultats de l’étude	Oui
Traçabilité dans le dossier	Non

Commentaires :

Conclusion

Avis favorable	Oui
Révision nécessaire selon commentaires	
Avis défavorable	

Unité Recherche-Gneds : Professeur Paul BARRIERE

Date : 20.09.19.

WS - -

Annexe 3 : Note d'information étude PLATOON

«Troubles héréditaires des fonctions plaquettaires : évaluation de l'intérêt diagnostique de nouveaux paramètres»

(Etude PLATOON)

Investigateurs principaux : Dr FOUASSIER Marc/Mr Babuty Antoine

Promoteur : CHU de Nantes.

Madame, Monsieur,

Le laboratoire d'hématologie-hémostase du CHU de Nantes est actuellement promoteur d'une étude de recherche clinique visant à étudier les plaquettes (cellules du sang participant à la coagulation sanguine).

L'objectif de cette étude est d'analyser de nouveaux paramètres plaquettaires chez des patients présentant une thrombopathie (anomalies qualitatives des plaquettes), mais aussi chez des patients témoins.

Peuvent être inclus dans cette étude :

- Les patients présentant une thrombopathie, c'est-à-dire des patients ayant présenté des anomalies de l'agrégation plaquettaire sur au moins deux inducteurs, à deux reprises.
- Les patients « témoins », ne présentant pas de thrombopathie.

Ne peuvent pas participer à cette étude, les patients mineurs ou sous tutelle/curatelle, les femmes enceintes et allaitantes, les patients ayant reçu un traitement par antiagrégant plaquettaire, par AINS (anti-inflammatoire non stéroïdien), par inhibiteur sélectif de la recapture de la sérotonine ou une transfusion plaquettaire dans les 14 jours précédant le prélèvement.

C'est dans ce cadre que nous vous proposons de participer à cette étude.

L'objectif principal est de préciser les mécanismes physiopathologiques responsables des anomalies plaquettaires. L'amélioration des connaissances dans ce domaine pourrait permettre une meilleure prise en charge diagnostique et thérapeutique des patients dans votre cas.

La participation à l'étude nécessite le prélèvement chez vous de plusieurs tubes de sang supplémentaires, au cours d'une prise de sang réalisée dans le cadre du soin courant.

Le prélèvement sera réalisé sur plusieurs tubes de sang particulier : 6 tubes citratés et 1 tube EDTA.

Il n'existe aucun risque particulier pour vous dans le cadre de cette étude, hormis les effets indésirables habituels liés à une prise de sang. Il n'est pas nécessaire au cours de cette étude de réaliser un suivi particulier, ni d'autres prises de sang complémentaires.

L'analyse de la formule sanguine sera réalisée sur automate, l'étude des paramètres plaquettaires (protéines de surface, capacité d'agrégation, contenu granulaire) sera effectuée à l'aide de techniques spécialisées disponibles au laboratoire d'hématologie du CHU de Nantes. Aucune autre analyse biologique, y compris génétique, ne sera réalisée sur ce prélèvement. Votre prélèvement sera stocké au laboratoire d'hématologie-hémostase du CHU de Nantes pendant toute la durée de l'étude, puis sera détruit.

Les résultats des paramètres mesurés ne seront pas communiqués aux médecins vous prenant en charge. Il n'y aura donc aucune influence sur votre prise en charge ou bien votre suivi.

Les données issues de ce prélèvement seront anonymisées, afin de respecter la confidentialité et l'anonymat nécessaire à toute étude de recherche clinique. Vos données ne seront consultables que par l'investigateur et son équipe médicale, des personnes mandatées par le promoteur et soumises au secret professionnel, et des personnes mandatées par les autorités sanitaires et judiciaires.

Vous êtes libre de refuser de participer, et vous pouvez retirer votre consentement à tout moment au cours de cette étude sans avoir à le justifier, et sans conséquence sur la suite de la prise en charge. D'après l'article L1121-1 du code de la santé publique, aucune recherche ne peut être pratiquée sur une personne lorsqu'elle s'y est opposée.

La signature de votre consentement ne décharge pas les organisateurs de la recherche de leurs responsabilités et vous conservez tous vos droits garantis par la loi.

Annexe 4: Consentement pour la constitution de la bio collection

 <p>CENTRE HOSPITALIER UNIVERSITAIRE DE NANTES</p>	<p>Information sur la constitution d'une collection d'échantillons biologiques humains pour un programme de recherches intitulé Hémopathies</p>	<p>Date d'application: 06/05/2015 Page 1 sur 2</p>
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	------------------------------------------------------------

Madame, Monsieur,

Votre prise en charge peut nécessiter des **prélèvements** (prise de sang, biopsies...). Après avoir été utilisés pour votre diagnostic ou votre traitement, vos échantillons peuvent présenter un intérêt pour la recherche. Il peut s'agir de recherches liées à votre pathologie ou à d'autres domaines médicaux.

Il va ainsi vous être proposé de participer au **programme de recherches intitulé « Hémopathies »** qui s'intéresse à la biologie des maladies du sang. Vous serez libre d'accepter ou de refuser d'y participer, sans avoir à vous justifier.

Pour les besoins de ce programme de recherches et dans la mesure où il ne comporte que **des risques négligeables**, il pourra vous être proposé un **prélèvement de sang supplémentaire**.

Ce programme de recherches nécessitera le recueil de certaines de vos **données de santé**, y compris vos origines ethniques ou raciales/géographiques, mais seulement si celles-ci présentent un intérêt justifié.

Le programme de recherches « Hémopathies » pourra comprendre l'examen de vos caractéristiques génétiques. Mais cet examen ne constituera pas une consultation de génétique et ne servira pas à adapter votre prise en charge, ni celle de votre famille. Il ne visera pas à diagnostiquer ou confirmer une maladie génétique, mais à rechercher les caractéristiques d'un ou plusieurs gènes inconnus susceptibles d'être à l'origine d'une maladie.

De manière générale, les résultats produits par ces recherches n'apporteront pas d'informations pertinentes pour votre santé en particulier ni celle de votre famille. L'objectif de ce programme de recherches est de favoriser le développement des connaissances dans le domaine de la santé. Les résultats des recherches devront ensuite être confirmés par des études cliniques complémentaires, afin d'aboutir à de nouvelles méthodes de diagnostic, de nouveaux traitements médicaux ou chirurgicaux.

Si vous le souhaitez, vous pourrez contacter votre médecin pour être informé des **résultats globaux** de cette recherche. Bien que cela n'en soit pas l'objectif, il peut toutefois arriver que les travaux de recherche mettent en évidence de nouveaux résultats intéressant votre santé. Vous pourrez refuser d'en être tenu(e) informé(e).

La réalisation des recherches

Les travaux de recherche seront conduits par les équipes du CHU de Nantes seules, ou en collaboration avec d'autres structures de recherche. Ces équipes pourront être **publiques** (ex : l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale - INSERM), **privées, industrielles, françaises ou étrangères**. Des recherches pourront aussi être conduites par ces organismes en dehors de toute collaboration avec le CHU de Nantes. Selon votre choix, le CHU de Nantes pourra ainsi transférer gratuitement et de manière confidentielle, en France ou à l'étranger, vos échantillons et les données de santé associées.

Les recherches du CHU de Nantes sont réalisées dans des conditions strictes de confidentialité conformes à la réglementation. Tous les échantillons et les données associées sont systématiquement codés ou anonymisés.

L'encadrement des recherches

Les programmes de recherches du CHU de Nantes sont déclarés au Ministère en charge de la recherche et soumis à l'avis favorable du Comité de Protection des Personnes compétent. Le traitement automatisé de vos données de santé a fait l'objet de démarches réglementaires auprès de la **Commission Nationale Informatique et Liberté (CNIL)**.

Votre information et le recueil de votre consentement

La conservation, l'utilisation des échantillons et des données médicales collectés et leur éventuelle cession à des fins scientifiques nécessitent votre autorisation, en vertu des lois dites de « Bioéthique » et de la loi « Informatique et liberté » du 6 janvier 1978 modifiée. Vous disposez à cet égard d'un droit d'accès, d'opposition, et de rectification des données enregistrées sur informatique à tout moment, par l'intermédiaire du médecin.

Vous pouvez poser toutes les questions nécessaires à votre médecin.

Lorsque vous nous aurez fait part de votre décision, vous pourrez changer d'avis à tout moment sans que cela ne modifie votre prise en charge et ses conditions.



**Consentement pour la constitution d'une collection
d'échantillons biologiques humains pour un programme de
recherches intitulé Hémopathies**

Date
d'application: 06/05/2015
Page 2 sur 2

Le CHU de Nantes réalise un programme de recherches sur les maladies du sang. Son but est d'améliorer les connaissances sur la biologie de ces maladies. Ces recherches sont réalisées à partir des échantillons disponibles au cours de votre prise en charge, ou grâce à la réalisation d'un prélèvement de sang ne comportant que des risques négligeables. Les recherches pourront également comprendre l'examen de vos caractéristiques génétiques et nécessiteront le recueil de données médicales vous concernant, y compris des informations d'origine ethnique ou raciale/géographique si les recherches le justifient. Afin de respecter la réglementation, ces données confidentielles seront codées. Sans votre consentement, vos échantillons seront détruits et aucun prélèvement de sang ne sera réalisé.

Merci d'indiquer votre décision en complétant/annotant et signant ce document

Je déclare avoir compris le but et les modalités de ce programme de recherches détaillé dans la lettre d'information jointe et expliqué par le médecin

Je soussigné(e), la personne prélevée: Mme M.
 Nom de famille :
 Nom de jeune fille :
 Prénom :
 né(e) le : [] [] / [] [] / [] [] [] []
 A (lieu de naissance) :

précise :

- être majeur et ne bénéficier d'aucune mesure de protection légale (tutelle, curatelle, sauvegarde de justice)
- être mineur*
- bénéficier d'une mesure de protection légale : Tutelle, Curatelle, Sauvegarde de justice

Si vous êtes le ou les représentants légaux (pour les mineurs, et personnes protégées par la loi), la personne de confiance désignée ou un membre de la famille (pour les situations d'urgence), merci d'indiquer votre décision en **complétant/annotant et signant** ce document :

<input type="checkbox"/> Mme <input type="checkbox"/> M.	<input type="checkbox"/> Mme <input type="checkbox"/> M.
Nom de famille :	Nom de famille :
Prénom :	Prénom :
Nom de jeune fille :	Nom de jeune fille :
Né(e) le : [] [] / [] [] / [] [] [] []	Né(e) le : [] [] / [] [] / [] [] [] []
A (lieu de naissance) :	A (lieu de naissance) :

Je suis libre de refuser ou d'accepter ma participation à ce programme de recherches et à l'utilisation des données associées à mes échantillons. **Ma décision n'aura aucun effet sur ma prise en charge médicale.**

Merci d'indiquer votre décision en cochant la ou les cases correspondant à votre choix

J'accepte de faire don de mes échantillons et des données associées codées pour le programme de recherches « Hémopathies », mené par le CHU de Nantes seul ou avec ses partenaires.

J'accepte ou je refuse que mes échantillons et les données associées codées soient utilisés pour la recherche en dehors du CHU de Nantes et laissés à l'usage de tiers publics ou privés, en France ou à l'étranger, dans le respect de la réglementation pour les recherches du programme « Hémopathies ».

Je ne souhaite pas être informé(e) dans le cas où les travaux de recherche mettraient en évidence de nouveaux résultats intéressants ma santé. Le médecin jugera par ailleurs de l'opportunité de m'en informer.

Date :

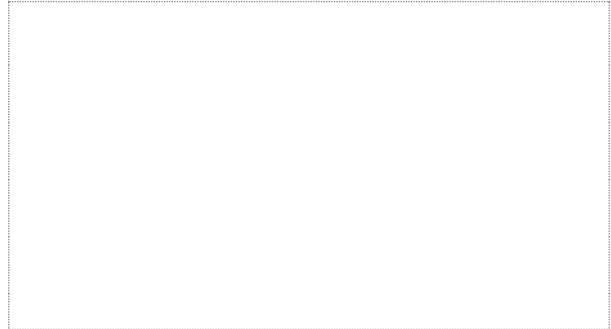
Signature de la personne prélevée :	Signature du médecin :	Signature des représentants légaux* :

*Pour les mineurs : si la mère ou le père signe seul, il s'engage à avoir obtenu l'accord de l'autre parent

Je dispose d'un droit d'accès, d'opposition, et de rectification des données enregistrées sur informatique à tout moment, par l'intermédiaire de mon médecin.
 Je suis libre de revenir sur ma décision en le signifiant au secrétariat de la direction de la recherche, 5 allée de l'île Gloriette, 44 093 NANTES cedex 01 ; par téléphone : 02 53 48 28 35 ; ou par e-mail : rderecherche@chu-nantes.fr. Préciser dans la demande de retrait de consentement le service et le nom du programme de recherche (titre en haut de page). **Ma décision n'aura aucun effet sur ma prise en charge.**

Vu, le Président du Jury,

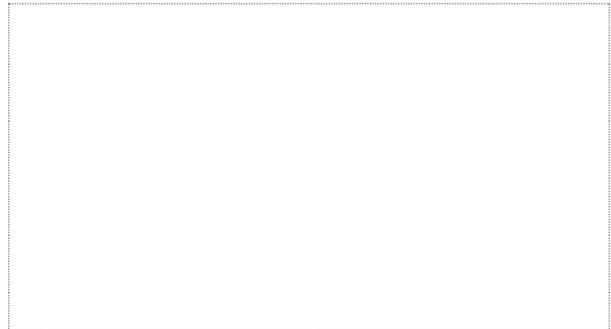
(tampon et signature)



Professeur Marie-Christine Béné

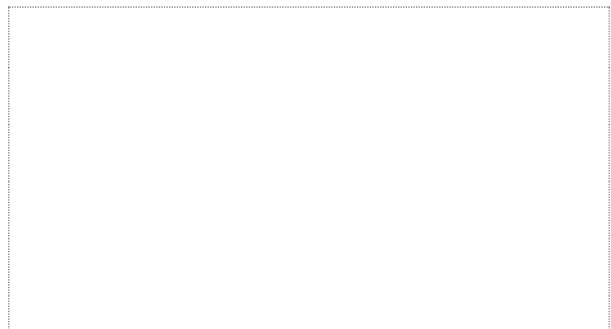
Vu, le Directeur de Thèse,

(tampon et signature)



Docteur Marc Fouassier

Vu, le Doyen de la Faculté,



Professeur Pascale JOLLIET

Titre de Thèse : Troubles héréditaires des fonctions plaquettaires : évaluation de l'intérêt diagnostique de nouveaux paramètres (Etude PLATOON)

RESUME

L'étude PLATOON est une étude de cohorte monocentrique dont l'objectif était de préciser les mécanismes physiopathologiques responsables de troubles héréditaires des fonctions plaquettaires chez vingt patients présentant une agrégation plaquettaire retrouvée pathologique à deux reprises et sur deux agonistes plaquettaires. Le score hémorragique de l'ISTH-SSC validé dans les thrombopathies était également réalisé afin d'essayer de mettre en évidence une ou plusieurs analyse(s) biologique(s) associée(s) à un score hémorragique pathologique.

Les patients présentaient en majorité des anomalies plaquettaires à type de défaut des voies de signalisation de la protéine G α i, des anomalies mineures, des anomalies complexes et un patient présentait des anomalies dans les voies de sécrétion des granules denses. Aucun paramètre d'agrégation plaquettaire ou de cytométrie en flux n'était associé à un score hémorragique supérieur à la normale. Le dosage du facteur II résiduel en revanche était significativement plus élevé dans le groupe ISTH-BAT pathologique comparé au groupe ISTH-BAT normal.

L'agrégation plaquettaire par agrégométrie optique couplée à la cytométrie en flux permet d'établir un diagnostic assez précis des anomalies plaquettaires sans pour autant pouvoir prédire le risque hémorragique des patients atteints de THFP mineurs. Dans cette population, ce travail est le premier à mettre en évidence l'association entre un score hémorragique pathologique et l'augmentation du facteur II résiduel.

MOTS-CLES

Plaquettes ; Agrégation Plaquettaire ; Bleeding Score ; Cytométrie en Flux ; Voies de Signalisation Plaquettaire ; Thrombopathies.