

Année 2017/2018

N°

Mémoire de Diplôme d'études spécialisées
spécialité Biologie Médicale
tenant lieu de thèse d'exercice

Pour le

DOCTORAT EN MEDECINE

Diplôme d'État

par

Nicolas André Alfred DRILLAUD

Né le 08/11/1990 à La Rochelle (17000)

Thrombopathie constitutionnelle avec anomalie d'exposition des phospholipides membranaires : A propos d'une famille explorée sur quatre générations.

Présentée et soutenue publiquement le **mercredi 17 octobre 2018** devant un jury composé de :

Président du Jury : Professeur Yves GRUEL, Hématologie, Transfusion, Faculté de Médecine - Tours

Membres du Jury :

Professeur Emmanuel GYAN, Hématologie et Thérapie Cellulaire, Faculté de Médecine - Tours
Professeur François MAILLOT, Médecine Interne, Faculté de Médecine - Tours

Directeur de thèse : Professeur Claire POUPLARD, Biologie Médicale, Hématologie, Faculté de Pharmacie - Tours

UNIVERSITE DE TOURS
FACULTE DE MEDECINE DE TOURS

DOYEN

Pr Patrice DIOT

VICE-DOYEN

Pr Henri MARRET

ASSESEURS

Pr Denis ANGOULVANT, *Pédagogie*
Pr Mathias BUCHLER, *Relations internationales*
Pr Hubert LARDY, *Moyens – relations avec l'Université*
Pr Anne-Marie LEHR-DRYLEWICZ, *Médecine générale*
Pr François MAILLOT, *Formation Médicale Continue*
Pr Patrick VOURC'H, *Recherche*

RESPONSABLE ADMINISTRATIVE

Mme Fanny BOBLETER

DOYENS HONORAIRES

Pr Emile ARON (†) – 1962-1966
Directeur de l'Ecole de Médecine - 1947-1962
Pr Georges DESBUQUOIS (†) - 1966-1972
Pr André GOUAZE - 1972-1994
Pr Jean-Claude ROLLAND – 1994-2004
Pr Dominique PERROTIN – 2004-2014

PROFESSEURS EMERITES

Pr Daniel ALISON
Pr Philippe ARBEILLE
Pr Catherine BARTHELEMY
Pr Christian BONNARD
Pr Philippe BOUGNOUX
Pr Alain CHANTEPIE
Pr Pierre COSNAY
Pr Etienne DANQUECHIN-DORVAL
Pr Lo c DE LA LANDE DE CALAN
Pr Alain GOUDEAU
Pr No l HUTEN
Pr Olivier LE FLOCH
Pr Yvon LEBRANCHU
Pr Elisabeth LECA
Pr Anne-Marie LEHR-DRYLEWICZ
Pr Gérard LORETTE
Pr Roland QUENTIN
Pr Alain ROBIER
Pr Elie SALIBA

PROFESSEURS HONORAIRES

P. ANTHONIOZ – A. AUDURIER – A. AUTRET – P. BAGROS – P. BARDOS – J.L. BAULIEU – C. BERGER – JC. BESNARD – P. BEUTTER – P. BONNET – M. BROCHIER – P. BURDIN – L. CASTELLANI – B. CHARBONNIER – P. CHOUTET – T. CONSTANS – C. COUET – J.P. FAUCHIER – F. FETISSOF – J. FUSCIARDI – P. GAILLARD – G. GINIES – A. GOUAZE – J.L. GUILMOT – M. JAN – J.P. LAMAGNERE – F. LAMISSE – Y. LANSON – J. LAUGIER – P. LECOMTE – E. LEMARIE – G. LEROY – Y. LHUINTE – M. MARCHAND – C. MAURAGE – C. MERCIER – J. MOLINE – C. MORAIN – J.P. MUH – J. MURAT – H. NIVET – L. POURCELOT – P. RAYNAUD – D. RICHARD-LENOBLE – J.C. ROLLAND – D. ROYERE – A. SAINDELLE – J.J. SANTINI – D. SAUVAGE – D. SIRINELLI – B. TOUMIEUX – J. WEILL

PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS

ANDRES Christian.....	Biochimie et biologie moléculaire
ANGOULVANT Denis	Cardiologie
AUPART Michel.....	Chirurgie thoracique et cardiovasculaire
BABUTY Dominique	Cardiologie
BALLON Nicolas.....	Psychiatrie ; addictologie
BARILLOT Isabelle	Cancérologie ; radiothérapie
BARON Christophe	Immunologie
BEJAN-ANGOULVANT Théodora	Pharmacologie clinique
BERNARD Anne	Cardiologie
BERNARD Louis	Maladies infectieuses et maladies tropicales
BLANCHARD-LAUMONNIER Emmanuelle	Biologie cellulaire
BLASCO Hélène.....	Biochimie et biologie moléculaire
BODY Gilles	Gynécologie et obstétrique
BONNET-BRILHAULT Frédérique	Physiologie
BRILHAULT Jean.....	Chirurgie orthopédique et traumatologique
BRUNEREAU Laurent	Radiologie et imagerie médicale
BRUYERE Franck.....	Urologie
BUCHLER Matthias.....	Néphrologie
CALAIS Gilles.....	Cancérologie, radiothérapie
CAMUS Vincent	Psychiatrie d'adultes
CHANDENIER Jacques.....	Parasitologie, mycologie
COLOMBAT Philippe.....	Hématologie, transfusion
CORCIA Philippe.....	Neurologie
COTTIER Jean-Philippe	Radiologie et imagerie médicale
DE TOFFOL Bertrand	Neurologie
DEQUIN Pierre-François.....	Thérapeutique
DESOUBEAUX Guillaume.....	Parasitologie et mycologie
DESTRIEUX Christophe	Anatomie
DIOT Patrice.....	Pneumologie
DU BOUEXIC de PINIEUX Gonzague	Anatomie & cytologie pathologiques
DUCLUZEAU Pierre-Henri.....	Endocrinologie, diabétologie, et nutrition
DUMONT Pascal.....	Chirurgie thoracique et cardiovasculaire
EL HAGE Wissam.....	Psychiatrie adultes
EHRMANN Stephan	Réanimation
FAUCHIER Laurent	Cardiologie
FAVARD Luc.....	Chirurgie orthopédique et traumatologique
FOUGERE Bertrand	Gériatrie
FOUQUET Bernard.....	Médecine physique et de réadaptation
FRANCOIS Patrick.....	Neurochirurgie
FROMONT-HANKARD Gaëlle	Anatomie & cytologie pathologiques
GAUDY-GRAFFIN Catherine.....	Bactériologie-virologie, hygiène hospitalière
GOGA Dominique	Chirurgie maxillo-faciale et stomatologie
GOUPILLE Philippe	Rhumatologie
GRUEL Yves.....	Hématologie, transfusion
GUERIF Fabrice	Biologie et médecine du développement et de la reproduction
GUYETANT Serge	Anatomie et cytologie pathologiques
GYAN Emmanuel.....	Hématologie, transfusion
HAILLOT Olivier	Urologie
HALIMI Jean-Michel.....	Thérapeutique
HANKARD Régis.....	Pédiatrie
HERAULT Olivier	Hématologie, transfusion
HERBRETEAU Denis	Radiologie et imagerie médicale
HOURIOUX Christophe.....	Biologie cellulaire
LABARTHE François	Pédiatrie
LAFFON Marc	Anesthésiologie et réanimation chirurgicale, médecine d'urgence
LARDY Hubert.....	Chirurgie infantile
LARIBI Saïd.....	Médecine d'urgence
LARTIGUE Marie-Frédérique	Bactériologie-virologie
LAURE Boris.....	Chirurgie maxillo-faciale et stomatologie
LECOMTE Thierry.....	Gastroentérologie, hépatologie
LESCANNE Emmanuel.....	Oto-rhino-laryngologie
LINASSIER Claude	Cancérologie, radiothérapie
MACHET Laurent	Dermato-vénérologie
MAILLOT François	Médecine interne
MARCHAND-ADAM Sylvain	Pneumologie

MARRET Henri	Gynécologie-obstétrique
MARUANI Annabel	Dermatologie-vénérologie
MEREGHETTI Laurent	Bactériologie-virologie ; hygiène hospitalière
MORINIERE Sylvain	Oto-rhino-laryngologie
MOUSSATA Driffa	Gastro-entérologie
MULLEMAN Denis	Rhumatologie
ODENT Thierry	Chirurgie infantile
OUAISSI Mehdi	Chirurgie digestive
OULDAMER Lobna	Gynécologie-obstétrique
PAGES Jean-Christophe	Biochimie et biologie moléculaire
PAINTAUD Gilles	Pharmacologie fondamentale, pharmacologie clinique
PATAT Frédéric	Biophysique et médecine nucléaire
PERROTIN Dominique	Réanimation médicale, médecine d'urgence
PERROTIN Franck	Gynécologie-obstétrique
PISELLA Pierre-Jean	Ophthalmologie
PLANTIER Laurent	Physiologie
QUENTIN Roland	Bactériologie-virologie, hygiène hospitalière
REMERAND Francis	Anesthésiologie et réanimation, médecine d'urgence
ROINGEARD Philippe	Biologie cellulaire
ROSSET Philippe	Chirurgie orthopédique et traumatologique
RUSCH Emmanuel	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
SAINT-MARTIN Pauline	Médecine légale et droit de la santé
SALAME Ephrem	Chirurgie digestive
SAMIMI Mahtab	Dermatologie-vénérologie
SANTIAGO-RIBEIRO Maria	Biophysique et médecine nucléaire
THOMAS-CASTELNAU Pierre	Pédiatrie
TOUTAIN Annick	Génétique
VAILLANT Loïc	Dermato-vénérologie
VELUT Stéphane	Anatomie
VOURC'H Patrick	Biochimie et biologie moléculaire
WATIER Hervé	Immunologie

PROFESSEUR DES UNIVERSITES DE MEDECINE GENERALE

LEBEAU Jean-Pierre

PROFESSEURS ASSOCIES

MALLET Donatien	Soins palliatifs
POTIER Alain	Médecine Générale
ROBERT Jean	Médecine Générale

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS

BAKHOS David	Physiologie
BARBIER Louise	Chirurgie digestive
BERHOUET Julien	Chirurgie orthopédique et traumatologique
BERTRAND Philippe	Biostat., informatique médical et technologies de communication
BRUNAUT Paul	Psychiatrie d'adultes, addictologie
CAILLE Agnès	Biostat., informatique médical et technologies de communication
CLEMENTY Nicolas	Cardiologie
DOMELIER Anne-Sophie	Bactériologie-virologie, hygiène hospitalière
DUFOUR Diane	Biophysique et médecine nucléaire
FAVRAIS Géraldine	Pédiatrie
FOUQUET-BERGEMER Anne-Marie	Anatomie et cytologie pathologiques
GATAULT Philippe	Néphrologie
GOUILLEUX Valérie	Immunologie
GUILLON Antoine	Réanimation
GUILLON-GRAMMATICO Leslie	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
HOARAU Cyrille	Immunologie
IVANES Fabrice	Physiologie
LE GUELLEC Chantal	Pharmacologie fondamentale, pharmacologie clinique
MACHET Marie-Christine	Anatomie et cytologie pathologiques
MOREL Baptiste	Radiologie pédiatrique

PIVER Éric.....	Biochimie et biologie moléculaire
REROLLE Camille.....	Médecine légale
ROUMY Jérôme	Biophysique et médecine nucléaire
SAUTENET Bénédicte	Néphrologie
TERNANT David.....	Pharmacologie fondamentale, pharmacologie clinique
ZEMMOURA Ilyess	Neurochirurgie

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES

AGUILLON-HERNANDEZ Nadia.....	Neurosciences
BOREL Stéphanie.....	Orthophonie
DIBAO-DINA Clarisse	Médecine Générale
MONJAUZE Cécile	Sciences du langage - orthophonie
PATIENT Romuald.....	Biologie cellulaire
RENOUX-JACQUET Cécile	Médecine Générale

CHERCHEURS INSERM - CNRS - INRA

BOUAKAZ Ayache	Directeur de Recherche INSERM – UMR INSERM 1253
CHALON Sylvie	Directeur de Recherche INSERM – UMR INSERM 1253
COURTY Yves	Chargé de Recherche CNRS – UMR INSERM 1100
DE ROCQUIGNY Hugues	Chargé de Recherche INSERM – UMR INSERM 1259
ESCOFFRE Jean-Michel.....	Chargé de Recherche INSERM – UMR INSERM 1253
GILOT Philippe.....	Chargé de Recherche INRA – UMR INRA 1282
GOUILLEUX Fabrice	Directeur de Recherche CNRS – UMR CNRS 7001
GOMOT Marie.....	Chargée de Recherche INSERM – UMR INSERM 1253
HEUZE-VOURCH Nathalie.....	Chargée de Recherche INSERM – UMR INSERM 1100
KORKMAZ Brice.....	Chargé de Recherche INSERM – UMR INSERM 1100
LAUMONNIER Frédéric	Chargé de Recherche INSERM - UMR INSERM 1253
LE PAPE Alain.....	Directeur de Recherche CNRS – UMR INSERM 1100
MAZURIER Frédéric.....	Directeur de Recherche INSERM – UMR CNRS 7001
MEUNIER Jean-Christophe	Chargé de Recherche INSERM – UMR INSERM 1259
PAGET Christophe	Chargé de Recherche INSERM – UMR INSERM 1100
RAOUL William	Chargé de Recherche INSERM – UMR CNRS 7001
SI TAHAR Mustapha.....	Directeur de Recherche INSERM – UMR INSERM 1100
WARDAK Claire.....	Chargée de Recherche INSERM – UMR INSERM 1253

CHARGES D'ENSEIGNEMENT

Pour l'Ecole d'Orthophonie

DELORE Claire	Orthophoniste
GOUIN Jean-Marie.....	Praticien Hospitalier
PERRIER Danièle	Orthophoniste

Pour l'Ecole d'Orthoptie

LALA Emmanuelle.....	Praticien Hospitalier
MAJZOUB Samuel.....	Praticien Hospitalier

Pour l'Ethique Médicale

BIRMELE Béatrice.....	Praticien Hospitalier
-----------------------	-----------------------

Remerciements

En premier lieu, je remercie l'ensemble des membres du jury, les Pr Claire POUPLARD, Yves GRUEL, Emmanuel GYAN et François MAILLOT d'avoir accepté d'évaluer ce travail clôturant l'ensemble de mes années d'études de médecine.

Je tiens à remercier tout particulièrement ma directrice de thèse, le Pr Claire POUPLARD, pour son encadrement et sa grande disponibilité au quotidien. Je remercie également le Pr Yves GRUEL d'avoir accepté de présider ce jury.

Je tiens tout particulièrement à remercier l'équipe orléanaise qui m'a fait aimer l'hématologie, Éric LEGAC, Sophie IQUEL, Julien DECKER et Thomas BRUNGS.

Mais aussi à tous les autres, Thomas GUERRY, Thomas FRANCIA, Jérôme GUINARD, sans qui ces 12 mois à Orléans auraient été beaucoup moins fun.

Merci à l'équipe d'hémostase de Tours pour votre pédagogie et votre dévouement. Merci à Eve-Anne, Caroline, Laurent et Jean-Baptiste pour votre disponibilité.

Je remercie le Pr Yves GRUEL et les docteurs Laurent ARDILLON et Jean-Baptiste VALENTIN pour m'avoir énormément appris en consultation.

Merci à Alex, Séverine et Olivier pour votre bonne humeur au quotidien qui rend ce stage tellement plus agréable.

Un remerciement tout particulier au hardeur et son ami Pascal. Nos discussions philosophiques resteront à jamais gravées dans ma mémoire.

Un gros bisou à toutes les belles rencontres pictaviennes, à Willy, Ben, Joub ...

Merci à mes co-internes Tourangeaux.

Merci Thomas et Liston de m'accompagner dans ces repas toujours plus pimentés.

Une bise à ce bon vieux Cédric et ce rastaquouère de Pierre. Des colloc's qui m'ont permis de mener une vie saine et équilibrée ...

Merci JB, pour ton humour, pour les baguettes chinoises, pour les soirées bagarre, et toutes ces verres (bouteilles) partagés. J'espère qu'on restera en contact.

Merci Anne-Margaux de m'avoir épaulé au quotidien. De m'avoir supporté et réchauffé. Sans toi la vie Tourangelle n'aurait pas été aussi belle.

Un gros bisou à mes copaos Stéphane, Arnaud, Maxime et Matthieu. Les vrais amis ne se comptent que sur les doigts d'une seule main.

Je remercie toute ma famille pour m'avoir accompagné et soutenu durant toutes ces années. Merci à papi Michel sans qui cette thèse serait remplie de fautes d'orthographe. Merci ma petite mamie de m'avoir chouchouté durant toutes ces années

Merci Anne. Merci d'être cette fille pleine de joie et d'optimisme, qui ne se laisse jamais abattre et toujours va de l'avant, sache que je t'admire pour cela. Je te souhaite de profiter de la vie au maximum.

Merci Papa d'avoir été aussi présent, de m'avoir soutenu dans les moments les plus difficiles. Merci d'avoir cru en moi et de m'avoir encouragé au quotidien. Merci pour tes conseils, merci pour ton aide, merci pour tout l'amour que tu m'as donné. Merci d'être celui que tu es. Merci.

Maman, tu as toujours été un modèle pour moi. Merci de m'avoir accompagné et encouragé dans mes activités sportives et musicales, toi ma plus grande fan. Merci pour toutes ces vacances à la montagne. Merci d'avoir été cette mère qui m'a noyé d'amour au quotidien. Merci de m'avoir tiré vers le haut. Merci pour tous les moments passé avec toi. Maman, je t'aime.

Thrombopathie constitutionnelle avec anomalie d'exposition des phospholipides membranaires : A propos d'une famille explorée sur quatre générations

Les thrombopathies englobent un groupe hétérogène de pathologies hémorragiques parmi lesquelles de nombreux mécanismes physiopathologiques sont impliqués. De diagnostic parfois difficile, elles doivent être suspectées devant toute symptomatologie hémorragique cutanéomuqueuse.

Dans les années 1990, nous avons diagnostiqué un syndrome de Scott chez plusieurs membres d'une même famille en raison de tests de consommation de la prothrombine anormaux.

Dans les années 2000, on retrouve chez un patient, des anomalies franches des fonctions plaquettaires en réponse à deux agonistes (analogues du TXA2 et acide arachidonique) qui nous font évoquer une thrombopathie peut être associée au syndrome de Scott. Plusieurs membres de la famille sont revus en 2018 et tous présentent un indice de consommation de la prothrombine allongé en méthode Parry mais un facteur II résiduel normal. L'étude par cytométrie en flux retrouve une diminution modérée de la fixation de l'annexine V chez deux patients très symptomatiques. Des anomalies des fonctions plaquettaires sont plus fréquemment observées à partir de la 4^{ème} génération et en réponse à plusieurs agonistes (ADP, collagène, acide arachidonique, analogues du TXA2, adrénaline). Cependant, les profils biologiques diffèrent d'un patient à l'autre et ne corrélaient pas toujours au phénotype hémorragique. Enfin, on retrouve une diminution de la libération d'ATP par les granules denses chez les patients symptomatiques.

Ces résultats semblent suggérer une anomalie liée à un défaut des voies de signalisation, de sécrétion des granules ou de flux calcique. L'identification d'une ou plusieurs mutations génétiques nous permettrait de mieux comprendre cette thrombopathie.

Mots clés :

Thrombopathies, exposition des phospholipides, syndrome de Scott, hémorragie, plaquettes

Inherited platelet disease with phospholipid exposure's dysfunction: About a family explored over four generations

Inherited platelet diseases cover a number of hemorrhagic diseases and among them there are many mechanisms involved. The diagnostic, sometimes complicated, must be evocated in all mucocutaneous symptomatology.

In the 90's, we identified a Scott syndrome in several members of a family because of reduced prothrombin consumption with the Parry's method.

In the 2000's, we discovered great platelet's function abnormality for a patient in response to two agonists (TXA2's analog and arachidonic acid). Therefore, this represents an inherited platelet disease associate to the Scott syndrome.

Several patients are convocated in 2018 and they all have reduced prothrombin consumption but normal residual serum prothrombin. Annexin-V binding measurement by flow cytometry showed moderate labelling in two symptomatic patients. Platelet function defects are mostly observed with the fourth generation in response to several agonists (ADP, collagen, arachidonic acid, TXA2's analog, epinephrine). However, the biologic profiles are different between the patients and are not always correlated with hemorrhagic phenotype. Finally, we find a reduce ATP release by the dense granules in symptomatic patients.

Those results appear to be a defect of platelet signaling or granule's secretion or calcium flux. The identification of one or several genetic mutations allowed us to understand better this inherited platelet disease.

Key words:

Inherited platelet disease, phospholipid exposure, Scott syndrome, bleeding, platelet

SERMENT D'HIPPOCRATE

En présence des Maîtres de cette Faculté, de mes chers condisciples et selon la tradition d'Hippocrate, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la Médecine.

Je donnerai mes soins gratuits à l'indigent, et n'exigerai jamais un salaire au-dessus de mon travail.

Admis dans l'intérieur des maisons, mes yeux ne verront pas ce qui s'y passe, ma langue taira les secrets qui me seront confiés et mon état ne servira pas à corrompre les mœurs ni à favoriser le crime.

Respectueux et reconnaissant envers mes Maîtres, je rendrai à leurs enfants l'instruction que j'ai reçue de leurs pères.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.

Table des matières

Remerciements

Résumé

Abstract

Table des matières

Liste des figures

Liste des tableaux

Abréviations

1 ^{ère} partie : synthèse sur les plaquettes et leurs anomalies de fonctionnement	19
A. Généralités sur les plaquettes	19
I. Introduction.....	19
II. Mégacaryopoïèse et thrombopoïèse	19
III. Morphologie et structure	24
IV. Les voies de signalisation plaquettaire.....	34
V. Fonctions	37
B. Les thrombopathies.....	49
I. Définition et présentation clinique	49
II. Les thrombopathies acquises	51
III. Les thrombopathies constitutionnelles.....	52
C. Méthodes d'exploration des thrombopathies	57
I. Les tests de routine et de dépistage	57
II. Les tests spécialisés de confirmation	60
2 ^{ème} partie : travaux de recherche pour la caractérisation d'une thrombopathie familiale au CHRU de Tours.....	68
A. Présentation de la famille B/D	68

I.	Présentation clinique.....	68
II.	Examens d'hémostase réalisés afin de caractériser la pathologie hémorragique de la famille B/D.....	71
B.	Résultats	77
I.	Analyse des résultats biologique obtenus dans les années 1990	77
II.	15 ans après.....	82
III.	Analyse des résultats biologiques réalisés en 2018	84
C.	Discussion	91
	Références bibliographiques	94

Liste des figures

Figure 1 : Différents stades de maturation des mégacaryocytes médullaires colorés au May-Grünwal-Giemsa

Figure 2 : Schéma d'une membrane plaquettaire

Figure 3 : Métabolisme de l'acide arachidonique

Figure 4 : Principales voies de l'activation plaquettaire

Figure 5 : Principaux récepteurs plaquettaires et leurs ligands

Figure 6 : Schéma d'une plaquette

Figure 7 : Principales voies de signalisation « inside-out » et « outside-in » de l'intégrine $\alpha IIb\beta 3$ (GpIIb/IIIa).

Figure 8 : Schéma de l'adhésion plaquettaire

Figure 9 : Transporteurs lipidiques transmembranaires

Figure 10 : Schéma de l'agrégation plaquettaire et des principales voies de signalisations

Figure 11 : Schéma de la coagulation plasmatique in vivo

Figure 12 : Aspect schématique de la fonction translocase et canal ionique d'ANO6

Figure 13 : Principe de l'agrégométrie par variation de la transmission lumineuse

Figure 14 : Tracé d'un test d'agrégation plaquettaire

Figure 15 : Etude de la fixation d'annexine-V à la surface des plaquettes par cytométrie en flux

Figure 16 : Ultrastructure de plaquette en microscopie électronique à transmission

Figure 17 : Arbre généalogique de la famille étudiée

Figure 18 : Schéma traduisant le principe de chimiluminescence permettant d'étudier la libération d'ATP par les plaquettes grâce au complexe luciférine/luciférase

Figure 19 : Exposition des phosphatidylsérines par les érythrocytes après stimulation par l'ionophore A23187 en milieux calcique 2 mM et 10 mM

Figure 20 Exploration des fonctions plaquettares chez IV:3

Figure 21 Résultats de la fixation de l'annexine V à la surface des phospholipides plaquettares

Figure 22 : Résultats de la fixation du CD62P chez la mère du propositus

Figure 23 : Résultats d'agrégométrie de madame CB III :2

Liste des tableaux

Tableau I : Contenu des granules plaquettaires

Tableau II : Score de Tosetto

Tableau III : Médicaments et aliments pouvant interagir avec les fonctions plaquettaires

Tableau IV : Résultats des tests standards d'hémostase pratiqués sur la famille dans les années 90.

Tableau V : Résultats des facteurs II résiduels et de consommation de la prothrombine pratiqués sur cette famille dans les années 90.

Tableau VI : Estimation de la vésiculation des érythrocytes par cytométrie en flux.

Tableau VII : Score de Tosetto calculé en 2018

Tableau VIII : résultats des tests standards d'hémostase réalisés en 2018.

Tableau IX : Résultats du facteur II résiduel et des consommations de la prothrombine en méthode classique et de PARRY réalisés en 2018.

Tableau X : Résultats des tests fonctionnels d'agrégation plaquettaire, de la numération plaquettaire et du frottis sanguin

Tableau XI : Résultats des tests fonctionnels de libération d'ATP par les granules denses.

Abréviations

AC : adénylate cyclase

ADP : Adénosine diphosphate

Akt : protéine kinase B

AMP : Adénosine monophosphate

ANO6 : Anoctamin 6

BFU-E : *Burst Forming Unit* Erythroblastique

BFU-MK : *Burst Forming Unit* mégacaryocytaire

BSS : syndrome de Bernard et Soulier

CD : *clusters of differentiation*

CFU – GEMM : *Colony Forming Unit* Granulocytaire Erythroblastique Mégacaryocytaire et Monocytaire

CFU – GM : *Colony Forming Unit* granulocytaire et monocytaire

CFU-MK : *Colony Forming Unit* Mégacaryocytaire

CMF : cytométrie en flux

COX : *cyclo-oxygénase*

DAG : diacylglycerol

EPO : érythropoïétine

FAK : *Focal Adhesion Kinase*

FcR-Y : Recepteur au Fragment constant des IgG

FP4 : facteur plaquettaire 4

FT : facteur tissulaire

G12/13 : Protéine G à sous unité $\alpha_{12/13}$

GDP : guanosine diphosphate

Gi : Protéine G à sous unité α i

GM-CSF : granulocyte macrophage *colony stimulating factor*

GP : glycoprotéine

Gq : Protéine G à sous unité α q

GTP : guanosine triphosphate

IL : interleukine

IP3 : l'inositol 1, 4 5, triphosphate

ITAM : *Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif*

LAT : T lymphocyte adaptator protein

Lyn : Lyn tyrosine kinase

MEP : progéniteur commun érythroblastique mégacaryocytaire

MGG : May-Grünwald Giemsa

PAI : *plasminogen activator inhibitor*

PAI : *plasminogen activator inhibitor*

PAR : protease-activated receptor

PC : phosphatidylcholine

PDGF : *platelet derived growth factor*

PE : phosphatidyléthanolamines

PFA : *Platelet Function Analyzer*

PG : prostaglandine

PI : phosphatidylinositols

PI-3-K : phosphoinositide-3kinase

PI3KB : phosphoinositide 3 kinase béta

PLA2 : phospholipase A2

PLC- γ : phospholipaseC- γ

PLC- β : phospholipaseC- β

PRP : plasma riche en plaquette

PS : phosphatidylsérines

RCPG : récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés aux protéines G

RhoGEF : Rho guanine nucléotide exchange factor

RIAM : Rap1-GTP-*interacting adaptor molecule*

SM : sphingomyélines

Src : Src family kinase

STD : système tubulaire dense

Syk : Spleen tyrosine kinase

TAFI : *thrombin activatable fibrinolysis inhibitor*

TCA : temps de céphaline avec activateur

TGF β : *transforming growth factor beta*

TIH : thrombopénie induite à l'héparine

TLR : *toll-like receptor*

TNF : *tumor necrosis factor*

TOP : temps d'occlusion plaquettaire

TP : Récepteur du TxA2 receptor

TP : taux de prothrombine

tPA : activateur tissulaire du plasminogène

TRAP : *thrombin receptor activating peptide*

TxA2 : thromboxane A2

VASP : *VAsodilator Stimulated Phosphoprotein*

VWF : facteur Von Willebrand

1^{ère} partie : synthèse sur les plaquettes et leurs anomalies de fonctionnement

A. Généralités sur les plaquettes

I. Introduction

Les plaquettes, avec leur taille allant de 2 à 3 μm de diamètre, représentent les plus petits éléments figurés du sang. Ce sont des particules anucléées et discoïdes, issues de la fragmentation du cytoplasme de grandes cellules de la moelle osseuse appelées mégacaryocytes. Leur durée de vie varie entre 7 et 10 jours, leur volume moyen de 7 à 12 fl et leur numération de 150 à 400 G/L.

Eléments majeurs de l'hémostase, les plaquettes interviennent dans d'autres processus physiopathologiques tel que l'inflammation, l'angiogenèse ou encore la lutte anti-infectieuse.

II. Mégacaryopoïèse et thrombopoïèse

1. Les progéniteurs

Chez l'adulte, la mégacaryopoïèse, ou différenciation des mégacaryocytes, a lieu essentiellement au sein de la moelle osseuse, mais également au niveau des poumons et de la rate⁽¹⁾. La thrombopoïèse, quant à elle, est en partie sanguine et pulmonaire.

La cellule souche hématopoïétique se différencie d'une part en CFU – GEMM (*Colony Forming Unit* Granulocytaire Erythroblastique Mégacaryocytaire et Monocytaire) et d'autre part en progéniteur lymphoïde. Par la suite la CFU – GEMM va se différencier en progéniteur commun érythroblastique mégacaryocytaire (MEP) sous l'influence de facteurs de transcription de type GATA-1 et 2, et en CFU – GM (*Colony Forming Unit* granulocytaire et monocytaire). Le MEP va ensuite se différencier progéniteur mégacaryocytaire précoce ou BFU-MK (*Burst Forming Unit* mégacaryocytaire), et en

progéniteur érythroblastique précoce ou BFU-E (*Burst Forming Unit* Erythroblastique). L'hyperexpression de GATA-2 dans le MEP oriente vers la mégacaryopoïèse tandis que l'hyperexpression de GATA-1 oriente vers l'érythropoïèse. Le BFU-MK se différencie ensuite en progéniteur mégacaryocytaire tardif ou CFU-MK (*Colony Forming Unit* Mégacaryocytaire) qui va à son tour se différencier en promégacaryoblaste, ce qui donnera lieu au cycle cellulaire endomitotique.

2. Le cycle cellulaire endomitotique

Au stade de promégacaryoblaste, le noyau entre en phase S puis M, mais l'anaphase et la séparation des cellules filles n'a pas lieu. Le nombre des copies des chromosomes augmente alors par un processus d'endomitoses qui entraîne un doublement de l'information génétique à chaque cycle cellulaire ($2^{(1+x)} N$ où N correspond au nombre de cycles d'endomitoses), et peut atteindre 128N de manière classique et aller jusqu'à 512N dans certains cas exceptionnels⁽²⁾. Cette augmentation des copies des chromosomes s'appelle la polyplôidie.

Le promégacaryoblaste possède un niveau de ploïdie faible, 2N à 4N chromosomes. Il va donner suite au mégacaryoblaste (4N à 8N chromosomes), puis le mégacaryocyte basophile (16N chromosomes), le mégacaryocyte granuleux (32N à 64N chromosomes) et enfin le mégacaryocyte mature (128N chromosomes). Les tailles du noyau, ainsi que du cytoplasme des mégacaryocytes, vont augmenter en parallèle de l'augmentation de la ploïdie (figure 1). RUNX1 agit sur la polyplôidisation et la formation de proplaquettes en régulant l'expression de MYH9, MYL9 et MYH10. En parallèle, GATA-1 régule d'une part la polyplôidisation, en régulant l'expression de la cycline D1 (CCND1). D'autre part l'expression du facteur de transcription NFE2 qui régule la formation de la tubuline des microtubules et est indispensables à la formation des proplaquettes.

Les mégacaryocytes sont localisés au sein de la niche hématopoïétique, puis migrent vers les sinusoides médullaires. Une fois le stade de mégacaryocyte mature atteint, celui-ci se colle à la paroi interne des sinusoides médullaires et émet des prolongements cytoplasmiques dans la lumière des sinusoides, formant ainsi les proplaquettes qui vont se fragmenter en plaquettes. Environ 30 % de la thrombopoïèse se termine dans le

torrent circulatoire par fragmentation des proplaquettes et du cytoplasme des mégacaryocytes matures qui terminent leur vie dans le sang puis dans le lit pulmonaire.

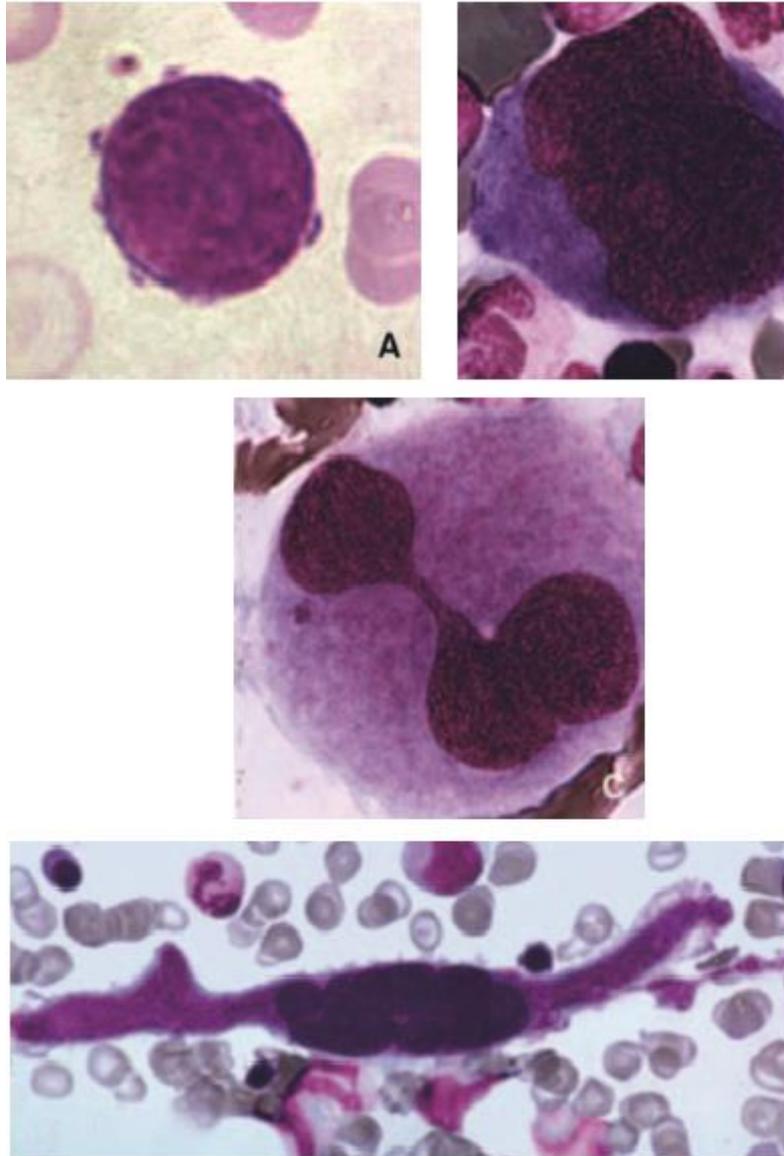


Figure 1 : Différents stades de maturation des mégacaryocytes médullaires colorés au May-Grünwald-Giemsa. A. Le mégacaryoblaste. B. Le mégacaryocyte basophile. C. Le mégacaryocyte granuleux. D. Le mégacaryocyte mature, qui est capable de se déformer et de s'allonger pour migrer dans sa totalité à travers la barrière des sinusoides dans la circulation sanguine (d'après Cramer-Bordé, EMC Elsevier Masson SAS, Paris, Hématologie, 13-019-A-40, 2008)

3. Les marqueurs mégacaryocytaires

La microscopie électronique a permis d'identifier le premier marqueur caractérisant les progéniteurs mégacaryocytaires : la peroxydase plaquettaire. Cette enzyme persiste tout au long de la différenciation mégacaryocytaire ainsi que dans les plaquettes sanguines, Elle correspond à une cyclooxygénase du métabolisme des prostaglandines, localisée dans le réticulum endoplasmique lisse. Par la suite, les cytomètres de flux ont permis de rechercher l'expression des antigènes membranaires et/ou cytoplasmiques grâce à de anticorps monoclonaux spécifiques. La majorité de ces antigènes sont classés en « *clusters of differentiation* » ou CD. Les clusters de différenciation sont des glycoprotéines membranaires, classées selon une nomenclature utilisée pour l'identification et l'immunophénotypage cellulaire.

Ainsi, les progéniteurs mégacaryocytaires sont caractérisés par l'expression de marqueurs antigéniques d'immaturité : CD34, CD31 et CD133. L'expression de HLA-DR (récepteur de surface du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II) ⁽³⁾, du CD33 et du CD38 permettent de différencier les BFU-MK, chez les quels ces marqueurs ne seront pas exprimés, des CFU-MK, chez qui ils seront présents. Le CD117, présent à la surface des BFU-MK, disparaît chez les CFU-MK qui vont exprimer la glycoprotéine IIb (GPIIb) ou CD41a. Les promégacaryoblastes commencent à perdre l'expression du CD34 tandis qu'ils vont exprimer la GPIIb-IIIa ou CD41. Les mégacaryocytes perdent totalement l'expression du CD34 et expriment, en plus du CD41, le CD42 (GPIb) et le CD36 (GPVI).

4. Régulation

La thrombopoïétine est le facteur de croissance le plus important de la mégacaryopoïèse. Synthétisée essentiellement par le foie, elle agit en se fixant à son récepteur : c-mpl^(4,5), afin d'orienter la différenciation des progéniteurs pluripotents vers la production de BFU-MK, stimuler la croissance des progéniteurs primitifs multipotents, favoriser la croissance et la différenciation des mégacaryocytes et

augmenter la production des plaquettes. La thrombopoïétine agit également comme un facteur de survie des progéniteurs pluripotents mais aussi des progéniteurs érythroïdes. c-mpl est un récepteur de type tyrosine kinase. Après avoir fixé la thrombopoïétine, celui-ci se dimérise puis va activer par phosphorylation les molécules JAK (Janus kinase) puis STAT (*signal transducers and activators of transcription*). Ce dernier, une fois phosphorylé, va se dimériser afin de pouvoir moduler l'activation transcriptionnelle.

La synthèse de la thrombopoïétine n'est pas influencée par le nombre de plaquettes en circulation. Cependant, en cas de thrombocytose, la majorité de la thrombopoïétine se fixe sur le c-mpl des plaquettes, et sera internalisée puis dégradée. Ce phénomène diminue la quantité de thrombopoïétine libre pour stimuler les mégacaryocytes. A l'inverse, en cas de thrombopénie, une grande quantité de thrombopoïétine est libre afin de stimuler les mégacaryocytes.

D'autres cytokines permettent également de stimuler les mégacaryocytes. Des interleukines : IL3, IL8 et IL11, le GM-CSF (granulocyte macrophage *colony stimulating factor*), le SCF (*stem cell factor*) et le LIF (*leukemia inhibitory factor*) orientent la différenciation des progéniteurs. Le GM-CSF, IL8 et IL11 orientent la différenciation des CFU-MK. IL11 favorise la différenciation des mégacaryocytes. L'érythropoïétine (EPO) agit également avec la thrombopoïétine pour orienter les progéniteurs vers la mégacaryopoïèse et agit sur la maturation des mégacaryocytes.

En parallèle, les plaquettes produisent des composants permettant d'inhiber la prolifération et la maturation des progéniteurs et des mégacaryocytes. Ces derniers, contenus dans les granules alpha plaquettaires, comprennent le *platelet derived growth factor* (PDGF), le *transforming growth factor beta* (TGF β), la β Thromboglobuline (β -TG), le facteur plaquettaire 4 (FP4) et le *connective tissue activating peptide III* (CTAP III).

D'autres molécules sont des inhibiteurs non spécifiques et inhibent également la croissance d'autres progéniteurs hématopoïétiques. C'est le cas des interférons alpha et gamma, et le *tumor necrosis factor* (TNF).

III. Morphologie et structure

1. La membrane externe

La membrane plaquettaire présente une structure trilaminaire classique. Sa bi-couche phospholipidique permet de maintenir une couche riche en glycoprotéines (figure 2).

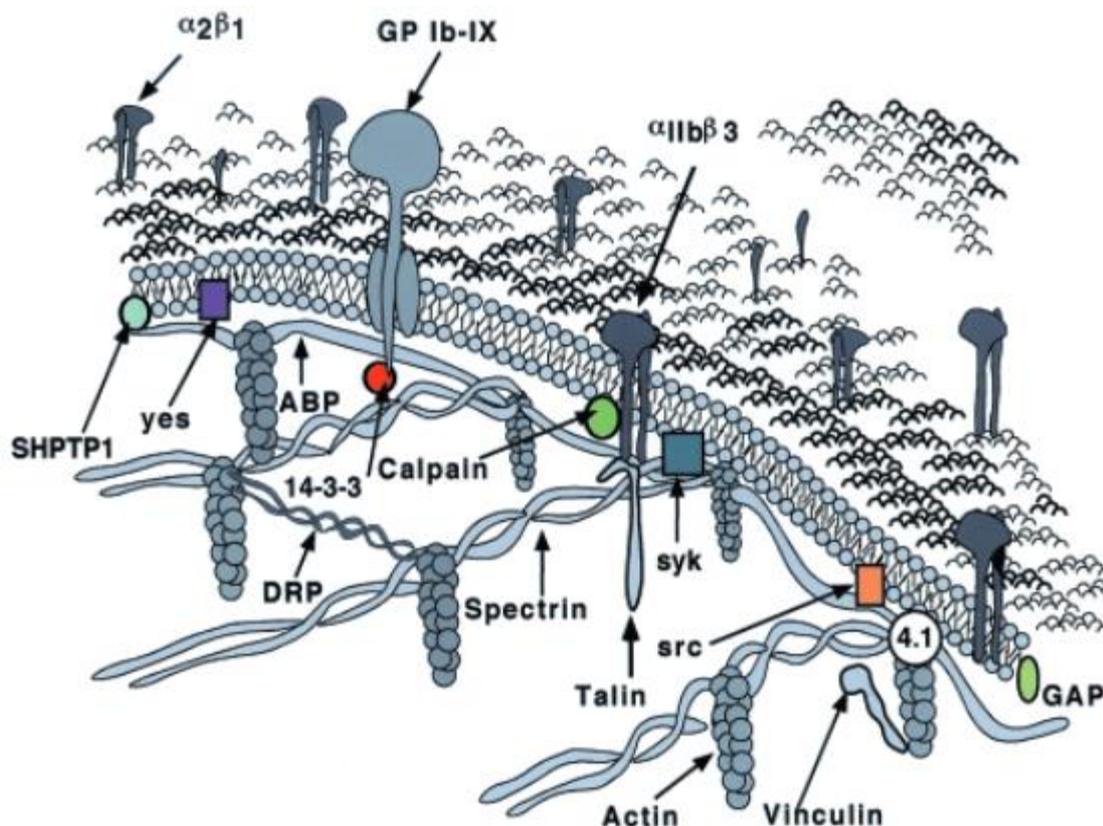


Figure 2 : Schéma d'une membrane plaquettaire. ABP : filamine ; DRP : Dystrophin related protein ; SHPTP1 : src homology domain containing protein tyrosine phosphatase 1 ; GAP : p21ras GTPase activating protein (d'après FOX, J.E. et al, *Thrombosis and Hemostasis*. 86, 198-213 (2001))

a. Les Lipides

Les lipides membranaires sont constitués à 80% de phospholipides. Les phosphatidylcholine (PC) et sphingomyélines (SM) sont majoritairement situés dans le feuillet externe, tandis que les phosphatidyléthanolamines (PE), les phosphatidylsérines (PS) et les phosphatidylinositols (PI) sont majoritairement situés dans le feuillet interne.

Les lipides membranaires sont répartis de façon asymétrique, les charges négatives étant essentiellement réparties sur le feuillet interne. Cette répartition est essentielle pour la physiologie de la coagulation, point que nous aborderons plus tard. La composition en acides gras des phospholipides est particulièrement riche en acide arachidonique. Ces derniers jouent un rôle important lors de l'activation plaquettaire en participant à la synthèse du thromboxane A2 mais aussi dans la régulation de l'hémostase primaire via la synthèse de prostacyclines (figure 3). Enfin, on retrouve également des lipides neutres, surtout du cholestérol, qui permettent de stabiliser la membrane plaquettaire. Ces divers lipides constituent une base autour de laquelle se réalise l'activation des facteurs de la coagulation.

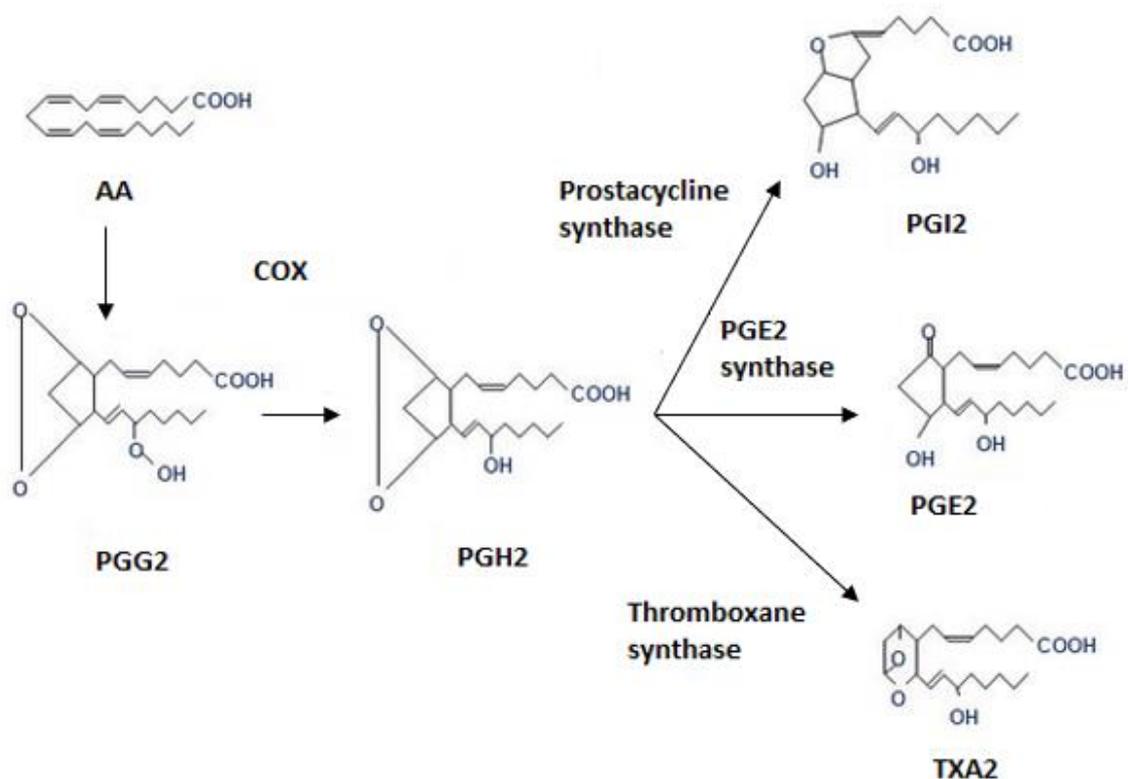


Figure 3 : Métabolisme de l'acide arachidonique. Le thromboxane A2 est un élément clé de l'activation plaquettaire tandis que les prostaglandines E2 et I2 sont des inhibiteurs de l'hémostase primaire. AA : Acide arachidonique, COX : cyclooxygénase, PGG2 : prostaglandine G2, PGH2 : prostaglandine H2, PGE2 : prostaglandine E2, PGI2 : prostaglandine I2, TXA2 : thromboxane A2.

b. Les récepteurs protéiques

i. Les intégrines

Les intégrines, ou glycoprotéines (GP), sont des récepteurs d'adhésion cellulaire, c'est-à-dire des protéines transmembranaires dont l'une des extrémités interagit en général avec des protéines de la matrice extracellulaire situées à l'extérieur de la cellule, l'autre extrémité interagissant avec des constituants intracellulaires, notamment des molécules de signalisation contrôlant la migration, la survie, la prolifération et la différenciation .

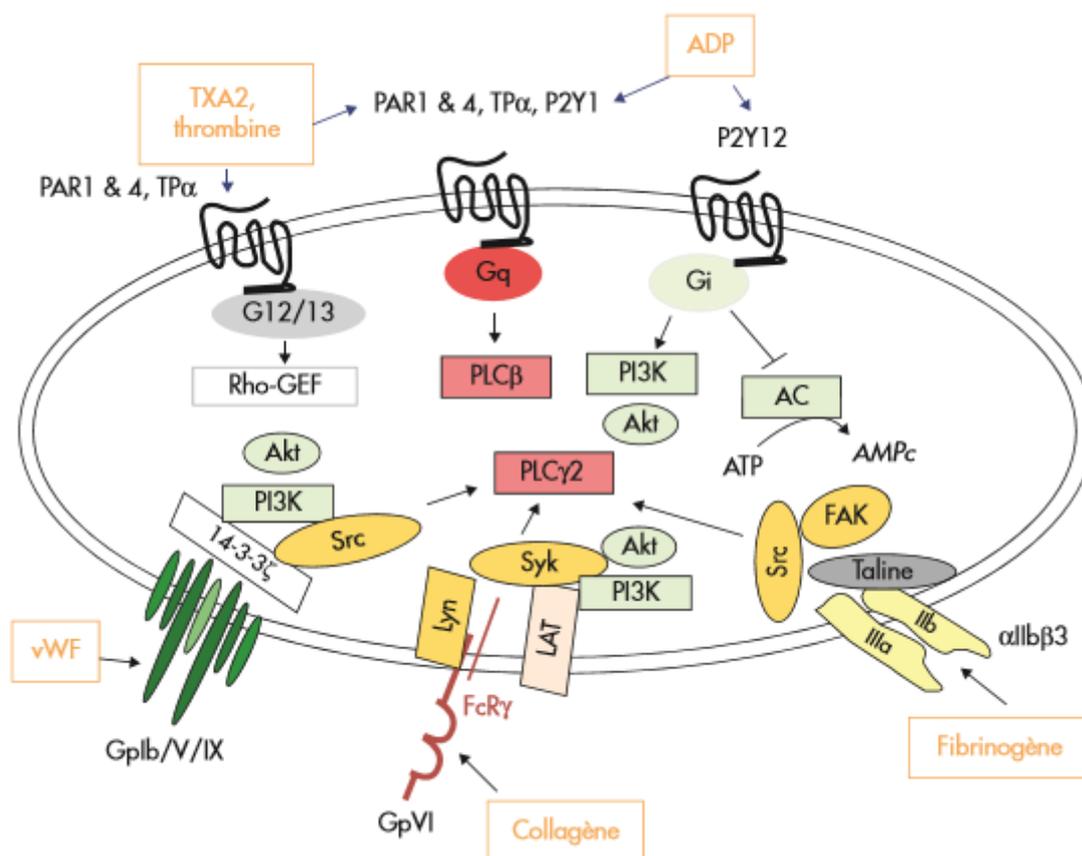


Figure 4 : Principales voies de l'activation plaquettaire. G12/13, Protéine G à sous unité $\alpha_{12/13}$; Gq, Protéine G à sous unité α_q ; Gi Protéine G à sous unité α_i ; ADP, Adénosine diphosphate; TxA2, thromboxane A2; TP, récepteur du TxA2; PAR, protease-activated receptor; P2Y1/P2Y12, récepteurs purinergiques; RhoGEF, Rho guanine nucléotide exchange factor; PLC- β , phospholipase C- β ; PLC- γ , phospholipase C- γ ; PI-3-K, phosphoinositide-3-kinase; Akt, protéine kinase B ; AC, adénylatecyclase; FAK, Focal Adhesion Kinase ; Src, Src family kinase ; LAT, T lymphocyte adaptor protein Syk, Spleen tyrosine kinase ; Lyn, Lyn tyrosine kinase ; FcR- γ , Recepteur au Fc gamma ; 14-3-3z protéine 14-3-3 (d'après Payrastra et al., Hématologie 2014; 20 : 20-35)

Il existe deux systèmes de dénomination permettant de classer les intégrines. Le premier les classe selon leur structure hétérodimérique. Celle-ci est composée d'une sous-unité alpha et une sous-unité bêta (exemple : GP α IIb β 3). La sous-unité bêta définit la classe des intégrines, tandis que la sous-unité alpha définit le type de ligand qui se fixe au récepteur. En hémostasie primaire, seule deux classe d'intégrines interviennent, les Béta 1 et les Béta 3 intégrines. Le deuxième système de classement consiste à les classer selon leur ordre de séparation en gel SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) (exemple : GPIIbIIIa) (figure 4).

Le complexe GPIb-IX-V (GPIb ou CD42) est une sialoglycoprotéine composée de deux molécules de GPIb (alpha et bêta), deux molécules de GPIX et une molécule de GPV. Il en existe environ 25 000 copies par plaquettes. Elle constitue le récepteur principal du facteur Von Willebrand (VWF), qui induit l'adhésion des plaquettes au collagène du sous-endothélium vasculaire. Les sites de liaison pour le facteur Willebrand sont situés sur la portion globulaire N-terminale de la GPIb alpha, qui reconnaît une autre protéine adhésive la thrombospondine⁽⁶⁾. La formation du complexe GPIb-Facteur Willebrand active *l'acting binding protein*, ce qui induit la polymérisation de l'actine du cytosquelette plaquettaire. La GPIb constitue également un site de fixation pour la thrombine.

Le complexe GPIIbIIIa (α IIb β 3 ou CD41a) constitue le récepteur des protéines adhésives jouant un rôle capital dans l'agrégation plaquettaire. On en retrouve environ 80 000 à la surface des plaquettes, auxquelles s'ajoutent environ 30 000 autres contenues dans les granules alpha⁽⁷⁾. Afin d'être effectrice, la GPIIbIIIa a besoin d'être activée par des mécanismes dit *inside-out* car provenant de l'intérieur de la plaquette. Sa structure de base requiert du calcium et reconnaît les protéines ayant une structure composée d'une succession de trois acides aminés : arginine, glycine, acide aspartique (RGD)⁽⁸⁾. Elle va donc pouvoir se lier au fibrinogène mais aussi au facteur Von Willebrand, à la fibronectine et à la thrombospondine. A l'état normal, la paquette incorpore divers composants plasmatiques dans ses granulations, et le complexe GPIIbIIIa participe au transport du fibrinogène vers les granules alpha.

La GPIa (CD49b) est le récepteur pour le collagène, il intervient à la phase initiale de l'adhésion au sous-endothélium. La GPIIa (CD29) forme un complexe avec la GPIc (CD49e) et constitue le récepteur pour la fibronectine. La GPIIa constitue également, avec la GPId (CD49f), le récepteur de la laminine.

La GPIV (CD36 ou GPIIb) est le récepteur pour le collagène et la thrombospondine.

La GPVI, associée à la chaîne FcγRIIa plaquettaire constitue un récepteur pour le collagène.

ii. Les récepteurs à 7 domaines transmembranaires

Composants majeurs de l'activation plaquettaire, ils sont constitués de sept domaines hydrophobes qui traversent successivement la membrane plaquettaire. Les acides aminés situés entre ces domaines forment trois boucles sur chaque face de la membrane. L'extrémité N-terminale et les boucles extracellulaires forment le site de liaison du ligand. La plupart de ces récepteurs sont couplés aux protéines G. Ces protéines utilisent l'échange de GTP en GDP pour déclencher ou inhiber la transduction du signal (Figure 5).

Les récepteurs PAR (*protease activated receptor*) sont des récepteurs de la thrombine. Cette dernière, après fixation au PAR1 et/ou au PAR4, va entraîner le clivage de la région N-terminale du récepteur et ainsi dévoiler une nouvelle séquence d'acides aminés : SFLLRN chez PAR1 et GYPGQV chez PAR4⁽⁹⁾. Ce nouveau peptide permet de stimuler directement le récepteur PAR_{1/4}. Son activation va entraîner toute une cascade de réactions permettant l'activation plaquettaire que nous verrons plus tard.

Le récepteur P2Y1, récepteur de l'ADP, est un récepteur couplé à une protéine Gq (responsable de l'activation de la phospholipase C)⁽¹⁰⁾. Il participe à l'activation plaquettaire via les mêmes voies de signalisation que les récepteurs PAR_{1/4}.

Le récepteur P2Y₁₂, récepteur à l'ADP, est couplé à une protéine Gi (inhibitrice). Il joue un rôle important dans l'activation plaquettaire et permet aussi la sécrétion des granules alpha⁽¹¹⁾.

Le récepteur P2Y₁ fonctionne comme un canal calcique, activé par l'ATP mais aussi par des récepteurs couplés à des tyrosines kinases tel FcγRII⁽¹²⁾.

Les Récepteurs TPa du thromboxane A₂ sont des récepteurs appartenant à la classe des prostanoïdes. Ces récepteurs sont couplés à des protéines G de type Gq et G_{12/13}, responsables de la mobilisation du calcium intracellulaire et de l'activation de la GTPase RhoA responsable notamment des phénomènes contractiles plaquettaires⁽¹³⁾.

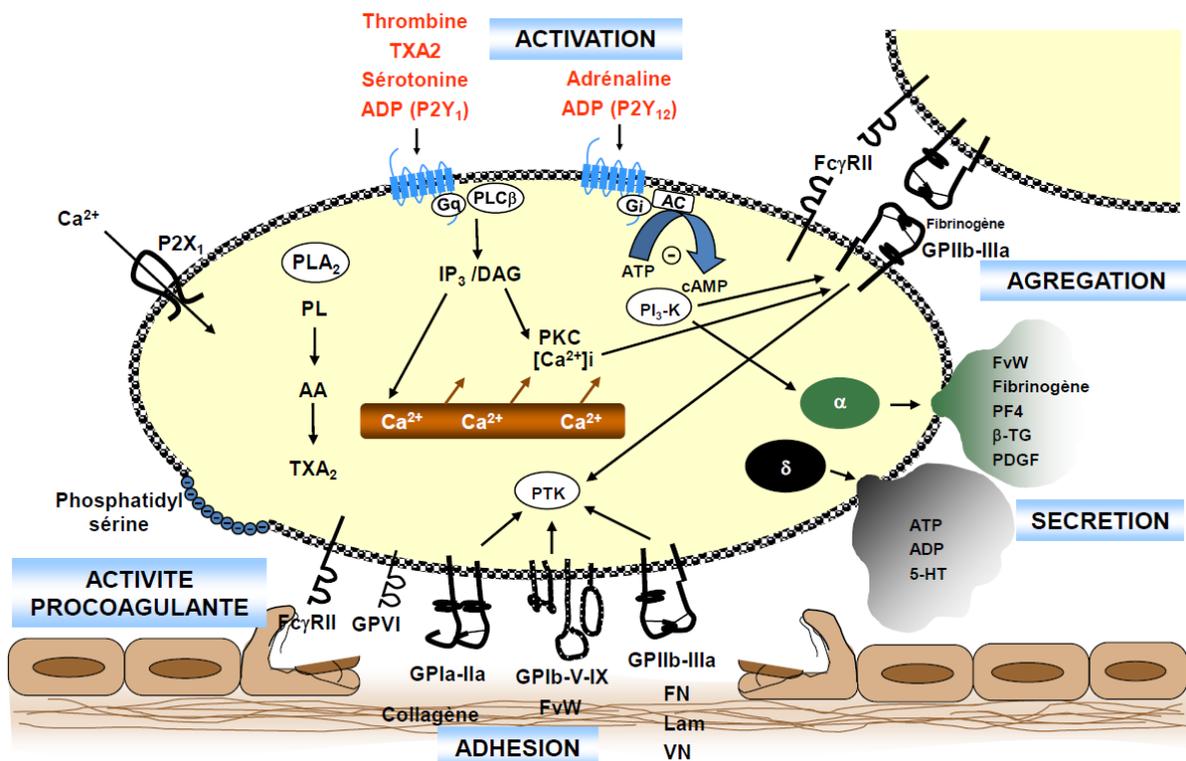


Figure 5 : Principaux récepteurs plaquettaires et leurs ligands. TXA₂ : thromboxane A₂ ; FN : fibronectine ; Lam : laminine ; VN : vitronectine ; FvW : facteur Von Willebrand ; PF4 : facteur plaquettaire 4 ; β-TG : bêta thromboglobuline ; 5-HT : sérotonine (d'après Véronique Baccini)

2. Les systèmes membranaires internes

a. Le système canaliculaire ouvert

Outre la membrane externe, il existe un système canaliculaire connecté à la surface (ouvert) correspondant à des invaginations profondes de la membrane externe au travers du cytoplasme, qui permet à la plaquette de disposer d'une surface membranaire importante en contact avec l'extérieur. Ces invaginations facilitent l'étalement des plaquettes et fournissent un plus grand nombre de glycoprotéines accessibles en surface lors de l'activation plaquettaire.

b. Le système tubulaire dense

Un système de membranes non connecté à la surface, le système tubulaire dense, correspond à du réticulum endoplasmique lisse résiduel du mégacaryocyte. Il contient les enzymes du métabolisme lipidique comme la peroxydase plaquettaire, mais aussi des ATPases calcium et magnésium dépendantes pour la régulation du transport calcique intracellulaire. Il constitue un réservoir de calcium à l'intérieur de la plaquette.

3. Le cytosquelette

Le cytosquelette des plaquettes est essentiellement composé de filaments cytoplasmiques d'actine, auxquels se lient d'autres protéines comme la myosine, la vinculine, l'alpha-actinine, la gelsoline, la tropomyosine et l'actin binding protein.

Un réseau de microtubules en périphérie interne permet de maintenir la forme discoïde de la plaquette.

Au cours de l'activation plaquettaire, les protéines du cytosquelette se redistribuent et les filaments d'actine se réorganisent de façon à s'associer à la myosine. Ainsi la plaquette émet des filopodes et peut mobiliser le contenu de ses granules.

4. Les organites cytoplasmiques

a. Les granules alpha

Les granules alpha sont les granules prédominant à l'intérieur des plaquettes à raison de 8 à 10 par plaquette. Synthétisés par les mégacaryocytes, ils présentent plusieurs zones de contraste en microscopie électronique, résultant de la compartimentation des protéines stockées^(14,15). Ces dernières sont nombreuses et comprennent des facteurs de la coagulation, des protéines adhésives, des facteurs de croissance, des inhibiteurs de protéase ou encore des protéoglycans (Tableau 1).

b. Les granules denses

Les granules denses sont appelés ainsi car ils apparaissent denses en microscopie électronique du fait de leur richesse en calcium⁽¹⁶⁾. On en distingue 4 à 5 par plaquettes. En plus du calcium, ils contiennent d'autres composés non protéiques comme de la sérotonine, de l'histamine, des pyrophosphates et des nucléotides (ATP, ADP) ⁽¹⁷⁾. (Tableau 1).

c. Les lysosomes

Les lysosomes renferment de nombreuses enzymes comme la cathepsine, la béta-hexosaminidase ou l'héparinase (Tableau I). Leur aspect en microscopie électronique est similaire aux granules alpha.

d. Les autres organites : microperoxyosome, mitochondries et amas de glycogène

Les plaquettes contiennent d'autres organites tels des microperoxyosomes et des mitochondries. Ces derniers sont des sites essentiels pour l'utilisation du dioxygène. Les microperoxyosomes sont également impliqués dans la métabolisation des acides gras et des acides aminés. Enfin, de nombreuses particules de glycogène sont observables en microscopie électronique et constituent une importante réserve énergétique (figure 6).

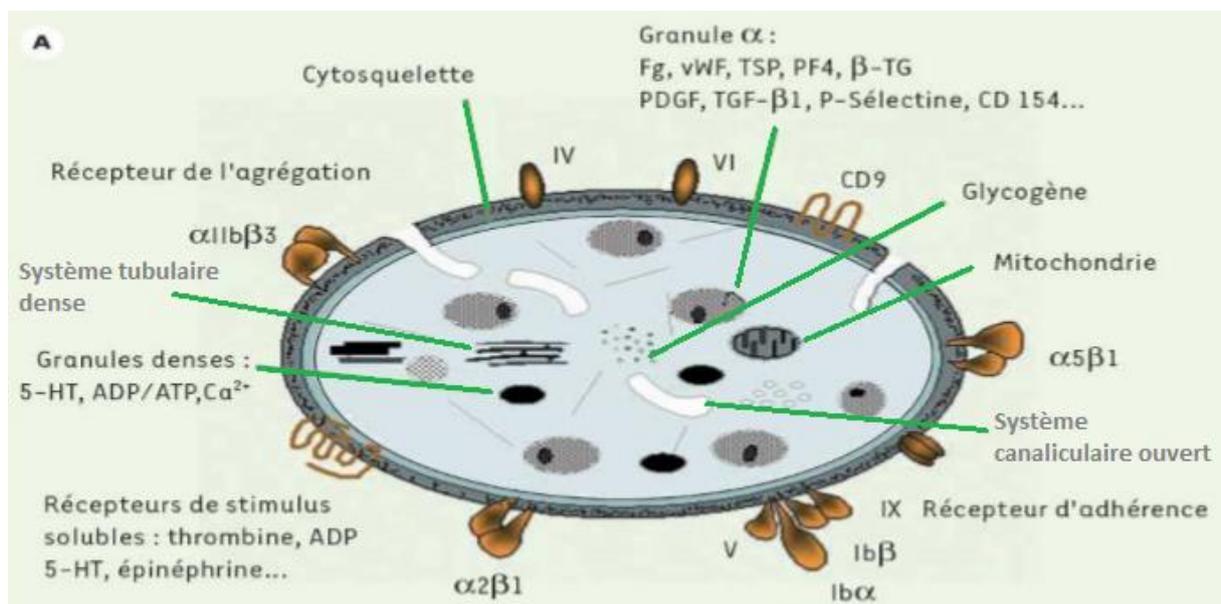


Figure 6 : Schéma d'une plaquette (d'après A et P Nurden. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 2005; 8 : 1773 – 82)

Tableau I : Contenu des granules plaquettaires

McNicol, A. & Israels, S. J. Platelet dense granules: structure, function and implications for haemostasis. *Thromb. Res.* 95, 1–18 (1999).

Granules α	Granules Denses	Lysosomes
Albumine	Sérotonine	Cathepsine D
Fibrinogène	ATP	Cathepsine E
Fibronectine	ADP	Carboxypeptidase A
Vitronectine	Calcium	Carboxypeptidase B
Ostéonectine	Pyrophosphate	Proline carboxypeptidase
Facteur Willebrand		β -N-acétyl-D-hexosaminidase
Propeptide Willebrand		β -D-glucuronidase
Thrombospondine		β -D-galactosidase
Facteur Plaquettaire 4		α -D-mannosidase
IgG, IgA, IgM		α -L-arabinofuranosidase
Inhibiteur de la C1 estérase		α -D-galactosidase
Plasminogène		α -L-fucosidase
PAI1		β -L-fucosidase
Inhibiteur de collagénase dérivé des plaquettes		β -D-glucosidase
Kininogène de haut poids moléculaire		Phosphatase acide
Protéine S		Arylsulphatase
α2-antitrypsine		
α2-macroglobuline		
α2-antiplasmine		
Multimérine		
Platelet Basic Protein		
β-Thromboglobuline		
HRG (Histidine-Rich Protein)		
CTAP3 (Connective tissue-activating protein III)		
NAP2 (Neutrophil-activating protein II)		
PDGF		
TGFβ		
VEGF		
Facteur V de la coagulation		
Facteur VIII de la coagulation		

IV. Les voies de signalisation plaquettaire

1. Les protéines G et leurs régulateurs ; signalisation de l'intérieur vers l'extérieure (*inside-out*)

Parmi les récepteurs à 7 domaines transmembranaires, certains sont couplés à des protéines G hétérotrimériques (RCPG). Ces protéines G sont composées de trois sous-unités: $G\alpha$, $G\beta$ et $G\gamma$. La sous-unité $G\alpha$ lie le GDP ou le GTP et possède une activité GTPase⁽¹⁸⁾. Les récepteurs $PAR_{1/4}$, $P2Y1$, les récepteurs du thromboxane A2, les récepteurs PAF-1 (facteur d'activation plaquettaire), les récepteurs à la vasopressine V1 et les récepteurs à la sérotonine 5HT2A sont couplés à des protéines $G\alpha_q$. La fixation de leurs agonistes va entraîner l'activation de la phospholipase $C\beta_2$ (PLCB2). Celle-ci hydrolyse le phosphatidylinositol 4, 5 biphosphate, phospholipide membranaire, ce qui va donner naissance au diacylglycérol (DAG) et à l'inositol 1, 4 5, triphosphate (IP3)⁽¹⁹⁾. L'IP3 entraîne la libération de calcium par le système tubulaire dense qui, avec la calmoduline, stimule la kinase de la chaîne légère de la myosine permettant la phosphorylation de la myosine. L'IP3 permet aussi l'activation de la voie de CalDAG-GEFI, facteur d'échange GDP/GTP spécifique des petites protéines G : RAP. L'interaction Rap1-GTP avec RIAM (*Rap1-GTP-interacting adaptor molecule*) stimule la fixation de la taline sur les béta intégrines tel GPIIbIIIa, permettant ainsi son activation⁽²⁰⁾. En parallèle, la kindline 3 participe à l'activation des béta intégrines en se liant à sa portion cytoplasmique.

Quant à lui, le DAG stimule la protéine kinase C qui permet d'activer la GPIIbIIIa. Par ailleurs, l'augmentation de la concentration intracellulaire de calcium permet l'activation de la phospholipase A2 qui va hydrolyser les phospholipides membranaires libérant ainsi de l'acide arachidonique Ce dernier, grâce à la cyclooxygénase, va produire deux endoperoxydes, la prostaglandine G2 puis la prostaglandine H2 qui à l'aide de la thromboxane synthase va donner naissance au thromboxane A2. Ce dernier joue un rôle majeur dans l'amplification de l'agrégation plaquettaire en se fixant à son récepteur situé dans la membrane plaquettaire.

Le récepteur $P2Y_{12}$ quant à lui est couplé à une protéine G_i (inhibitrice), qui, après fixation de son agoniste va inhiber l'adénylate cyclase empêchant l'accumulation d'AMP

cyclique (inhibiteur de l'activation plaquettaire) à l'intérieur de la plaquette. Cette protéine G_i possède une deuxième fonction, celle de stimuler la phosphoinositide 3 kinase bêta (PI3KB) qui va entraîner la production de phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate qui active une sérine/thréonine kinase Akt (qui entraîne la sécrétion des granules), ERK2 (*Extracellular signal Regulated Kinase-2*), Rap1b et mobilise le calcium intracellulaire. Le récepteur P2Y₁₂ joue un rôle essentiel dans l'amplification de l'agrégation plaquettaire⁽²¹⁾.

Les récepteurs PAR_{1/4} et TP α du thromboxane A₂ sont aussi associés à des protéines G_{12/13}. Celles-ci activent RhoGEF (*Rho guanine nucleotide exchange factor*), ce qui va aboutir à la phosphorylation de la chaîne légère de la myosine et ainsi participer au changement de forme du cytosquelette des plaquettes⁽²²⁾.

Il existe également un système de contrôle négatif via le récepteur de la prostaglandine I₂, le récepteur de l'adénosine A_{2a} et le récepteur de la prostaglandine D₂. Ces récepteurs sont couplés à une protéine G α_s qui stimule l'adénylate cyclase et augmente donc le taux d'AMP cyclique qui inhibe l'activation plaquettaire par activation de la protéine kinase A (figure 7).

2. Signalisation de l'extérieur vers l'intérieur (*outside-in*)

Suite à l'activation de la GPIIb/IIIa, celle-ci va interagir avec le fibrinogène, ce qui aura comme conséquences l'activation de nombreuses réponses cellulaires dites *outside-in*.

Cela aboutit à une deuxième vague d'agrégation plaquettaire, la vésiculation membranaire libérant des microparticules procoagulantes, la réorganisation du cytosquelette et la rétraction des caillots de fibrine. Trois grandes voies sont mises en jeu. Celle des MAP kinases, des tyrosines kinases et de la phosphatidylinositol 3 kinase. Les MAP kinases jouent un rôle important dans la prolifération et la différenciation cellulaire via l'activation des MAP kinase kinase, des Jun kinases et de la P 38 MAP kinase. La P 38 MAP kinase est essentielle pour l'activation de la phospholipase A₂⁽²³⁾.

La phosphorylation sur résidus tyrosine est médiée par trois familles de tyrosines kinases : Src, Syk et FAK. Elles jouent un rôle majeur lors de l'activation plaquettaire et

semblent jouer un rôle dans la réorganisation du cytosquelette plaquettaire. La phosphatidylinositol 3 kinase permet l'activation prolongée de la GPIIb/IIIa et la stabilisation des agrégats (figure 7).

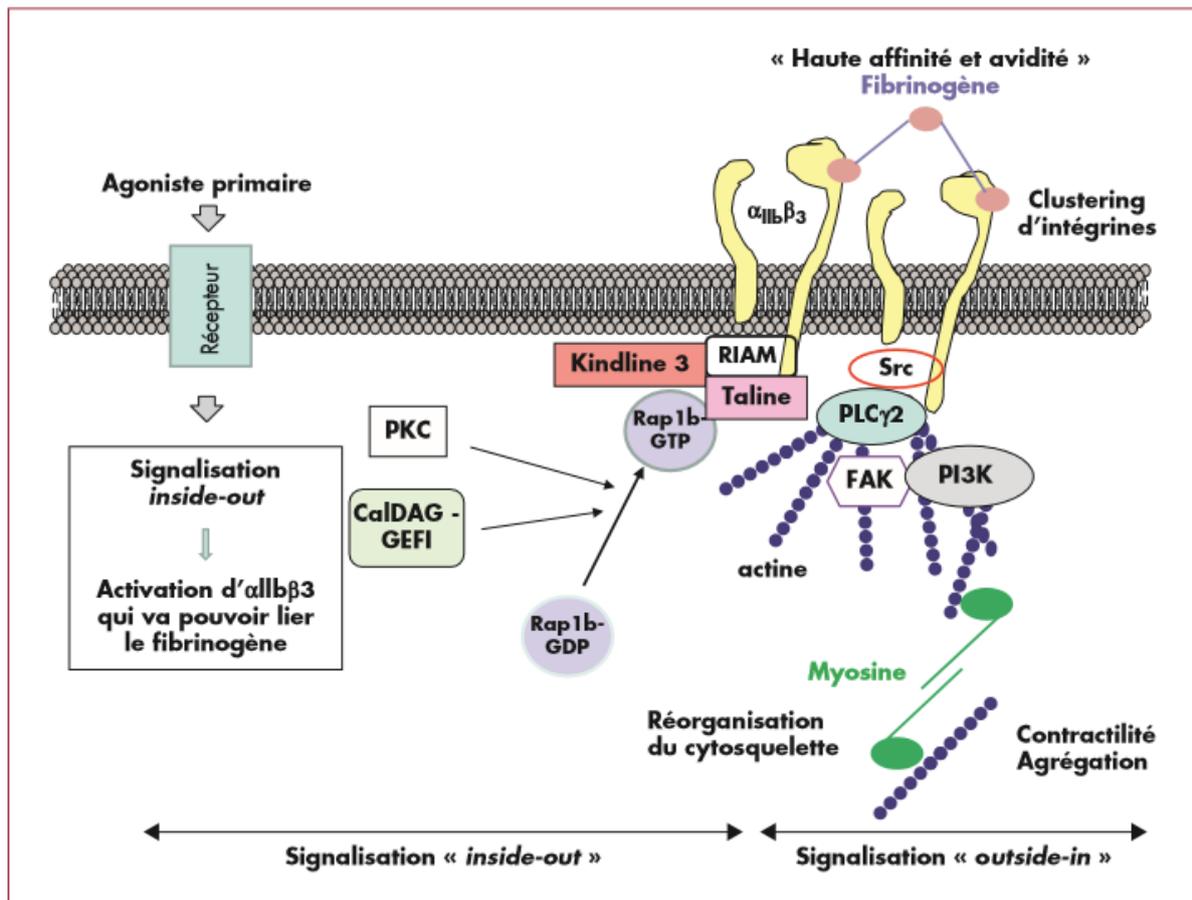


Figure 7 : Principales voies de signalisation « inside-out » et « outside-in » de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ (GPIIb/IIIa). L'activation des récepteurs membranaires et d'un certain nombre de voies de signalisation en aval va conduire à un changement conformationnel de l'intégrine (signalisation dite inside-out) lui permettant de lier le fibrinogène ce qui va créer des ponts entre les plaquettes et le phénomène d'agrégation. Lorsque l'intégrine est engagée, elle va induire une signalisation dite outside-in qui va mettre en jeu différents acteurs de signalisation et permettre l'activité contractile des plaquettes, la croissance du thrombus plaquettaire et sa stabilité. Abréviations : PLC : phospholipase C ; PKC : protéine kinase C ; CalDAG-GEF1 : diacylglycerol-regulated guanine-nucleotide-exchange factor 1 ; RIAM : Rap1-GTP-Interacting Adaptator Molecule ; FAK : Focal Adhesion kinase ; SHIP1 : Src homology 2 (SH2) domain-containing inositol 5-phosphatase 1 (d'après Payrastra B, et Al, *Hématologie*, 2014, 20 : 20-35)

3. Les sérines/thréonines protéines phosphatases

Les sérines/thréonines protéines phosphatases (PP) contiennent 4 sous-types : PP1, PP2A, PP2B ou calcineurine et PP2C. Elles permettent l'agrégation plaquettaire en présence de thrombine, la liaison du fibrinogène à la GPIIb/IIIa, la sécrétion des granules et la synthèse des thromboxanes.

4. Les tyrosines phosphatases

A l'inverse des sérines/thréonines phosphatases, les tyrosines phosphatases permettent de limiter l'activation plaquettaire intempestive ou les ramener à un état de repos.

V. Fonctions

Les fonctions plaquettaires sont nombreuses. Elles sont impliquées dans les processus de lutte anti-infectieuse, d'angiogenèse et au cours de l'inflammation. Mais leur rôle principal est d'agir comme le pivot central du processus hémostatique, mécanisme permettant de maintenir le sang à l'intérieur des vaisseaux que l'on appelle hémostase primaire.

1. Fonctions hémostatiques

En temps normal, les plaquettes n'interagissent pas avec l'endothélium vasculaire. Cependant, en cas de brèche, la matrice extracellulaire du sous-endothélium vasculaire est exposé et va être à l'origine d'un processus complexe visant à colmater cette brèche. Ce processus s'appelle l'hémostase, et il est divisé en trois parties : l'hémostase primaire, la coagulation et la fibrinolyse.

a. L'hémostase primaire

i. L'adhésion plaquettaire

Le processus initial d'adhésion plaquettaire au sous-endothélium vasculaire est étroitement lié aux conditions rhéologiques. Ainsi, il dépend de la taille et du type de vaisseau (artère ou veine), mais aussi de l'hématocrite, car les hématies favorisent le contact des plaquettes sur les parois du vaisseau (rôle mécanique). De ce fait, dans les conditions où les forces de cisaillement sont faibles (comme dans les veines ou les grosses artères), l'adhésion des plaquettes sur la paroi des vaisseaux est principalement due à leur liaison au collagène, la fibronectine et à la laminine. Tandis qu'en cas de forces de cisaillement élevées (petites artères, microcirculation, athérosclérose, sténose vasculaire), le rôle du facteur Willebrand, liant d'une part le collagène sous-endothélial et d'autre part la GPIb plaquettaire, devient un élément clé de l'adhésion plaquettaire⁽²⁴⁾. Le VWF est une glycoprotéine multimérique synthétisée par les cellules endothéliales et les mégacaryocytes. On en retrouve au sein des granules alpha plaquettaires, des corps de Weibel Palade, organites de stockage au sein des cellules endothéliales, mais aussi dans la circulation sanguine, dont le rôle est de lier et protéger le facteur VIII. En cas de brèche vasculaire, le VWF circulant, initialement sous forme globulaire, change de forme du fait des forces de cisaillement élevées et se lie au collagène du sous-endothélium via ses domaines A1 et A3^(25,26). Une fois stabilisé, les plaquettes viennent se fixer à son domaine A1 via la GPIb. Sous forme globulaire, le domaine A1 du VWF est cryptique, et les plaquettes ne peuvent s'y fixer⁽²⁷⁾. La GPIb se lie également à la P-Selectine contenue dans les corps de Weibel Palade et va permettre à la plaquette de rouler à la surface des cellules endothéliales activées⁽²⁸⁾. Par la suite via la GPVI et la GPIIb/IIIa ($\alpha 2\beta 1$), les plaquettes se lient au collagène du sous-endothélium. La fixation de ces deux glycoprotéines au collagène va permettre de déclencher des voies de transduction du signal permettant l'activation plaquettaire. L'étape finale de l'adhésion plaquettaire nécessite leur activation, augmentant ainsi l'affinité pour leurs ligands des Béta1 et Béta3 intégrines. La GPIIb/IIIa est de loin la plus abondante à la surface des plaquettes, elle permet de lier le VWF et stabiliser le fibrinogène⁽²⁹⁾.

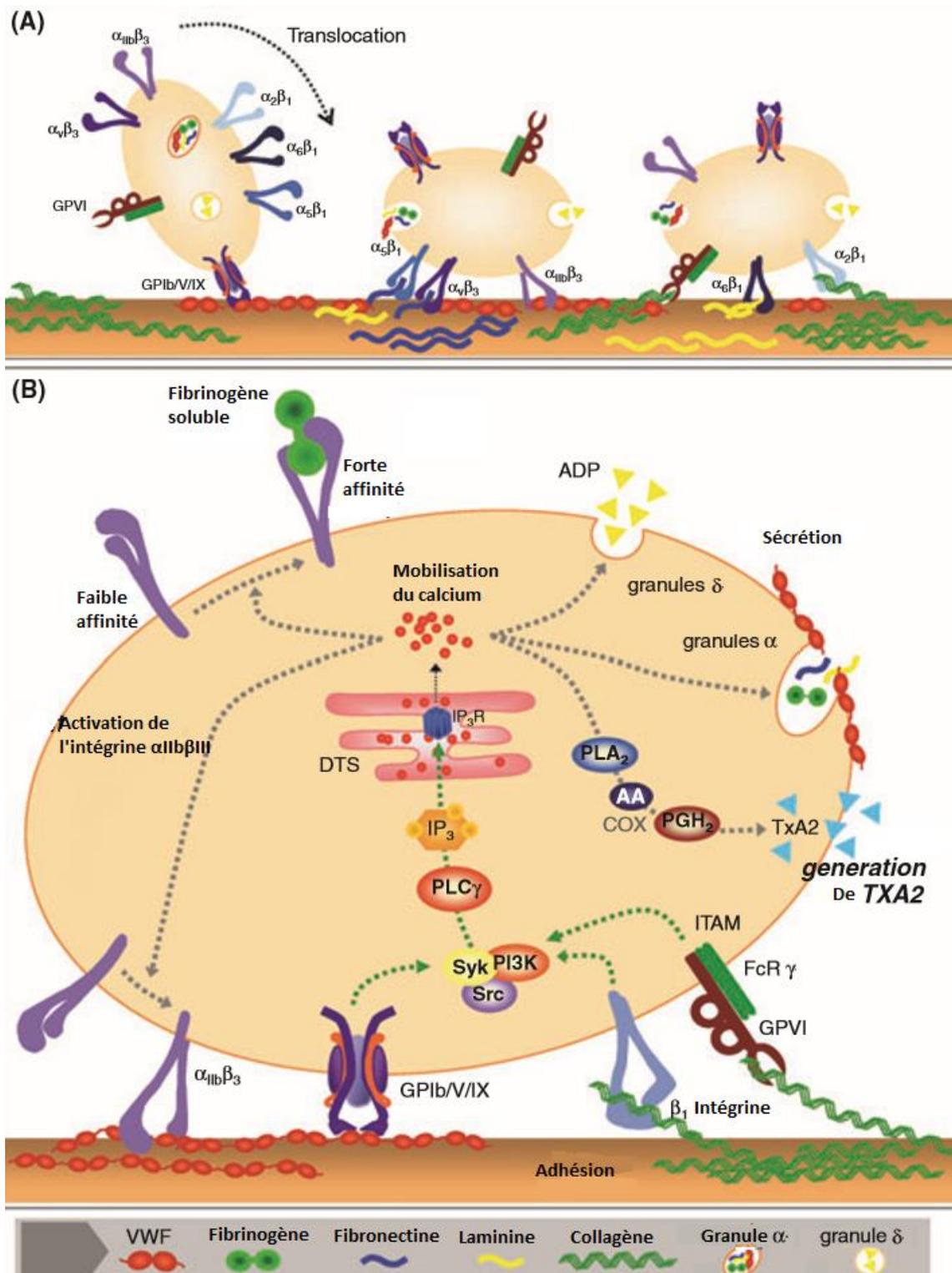


Figure 8 : Schéma de l'adhésion plaquettaire. La fixation des différentes glycoprotéines à leurs ligands déclenche des voies de signalisation comprenant les Src kinases (Src), Syk et PI 3-Kinase (PI3K) permettant ainsi l'activation de la phospholipase C gamma (PLC γ) et l'hydrolyse des phospholipides membranaires générant ainsi de l'inositol (1,4,5) triphosphate (IP $_3$). La fixation de l'IP $_3$ sur son récepteur (IP $_3$ R) permet la mobilisation du calcium par le système tubulaire dense (DTS). Le calcium ainsi libéré permet la génération de thromboxane A $_2$ (TXA $_2$), la sécrétion des granules et l'augmentation de l'affinité de la GPIIb/IIIa pour le VWF et le fibrinogène (d'après Andrew H. Wei et al, British Journal of Haematology, 2009, 147 : 415-430)

La GPIIb/IIIa constitue un récepteur majeur de l'agrégation plaquettaire. D'autres intégrines jouent un rôle moins certain au cours de l'adhésion plaquettaire. Il s'agit de l'intégrine $\alpha V\beta 3$ (lie la vitronectine), l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ (lie la fibronectine) et l'intégrine $\alpha 6\beta 1$ (lie la laminine) (Figure 8).

ii. L'activation plaquettaire

Une fois la plaquette fixée au sous-endothélium, de nombreuses voies de signalisation se déclenchent permettant l'activation plaquettaire.

La fixation de ligands spécifiques (tel le VWF⁽³⁰⁾, le collagène⁽³¹⁾, Gas6⁽³²⁾, la podoplanine⁽³³⁾ ou d'anticorps complexes) sur leurs récepteurs plaquettaires entraîne l'activation de Src tyrosine kinases, Fyn et Lyn, permettant la phosphorylation des ITAM (*Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif*) situés sur la chaîne de FcR γ . Cela va permettre de recruter la tyrosine kinase Syk et entraîner une cascade de réactions appelée signalosome aboutissant à l'activation de la phospholipase $\text{C}\gamma 2$ (PLCG2) par phosphorylation sur résidus tyrosine de son domaine SH2. Cette PLCG2, comme la PLCB2, va permettre la mobilisation du calcium du système tubulaire dense (STD) via l'IP3 et activer la GPIIb/IIIa grâce à l'activation de la PKC. Par ailleurs, la mobilisation du calcium va permettre l'activation de la phospholipase A2 (PLA2), le changement de forme du cytosquelette plaquettaire, la sécrétion des granules, l'agrégation plaquettaire et le réarrangement des phospholipides de la membrane plaquettaire. En effet, au repos, les phospholipides anioniques, procoagulants, sont situés majoritairement au niveau du feuillet interne de la membrane plaquettaire. L'organisation des phospholipides membranaires est assurée par le biais de **flipases**, qui maintiennent les phospholipides au niveau du feuillet interne, de **flopases**, qui maintiennent les phospholipides sur le feuillet externe et de **translocases** (figure 9) qui permettent de switcher les phospholipides du feuillet interne au feuillet externe, et *vice versa* (« flip-flop »)⁽³⁴⁾. Lors de l'activation plaquettaire, les phospholipides anioniques tels les phosphatidylsérines, vont passer du feuillet interne au feuillet externe, permettant de créer une surface procoagulante propice à la fixation des facteurs de la coagulation et de leurs cofacteurs mais aussi à l'émission de microparticules procoagulantes^(35,36). Ce phénomène de flip

flop est assurée par une protéine à 8 domaines transmembranaires TMEM16F (ou ANO6 Anoctamin 6) ^(37,38).

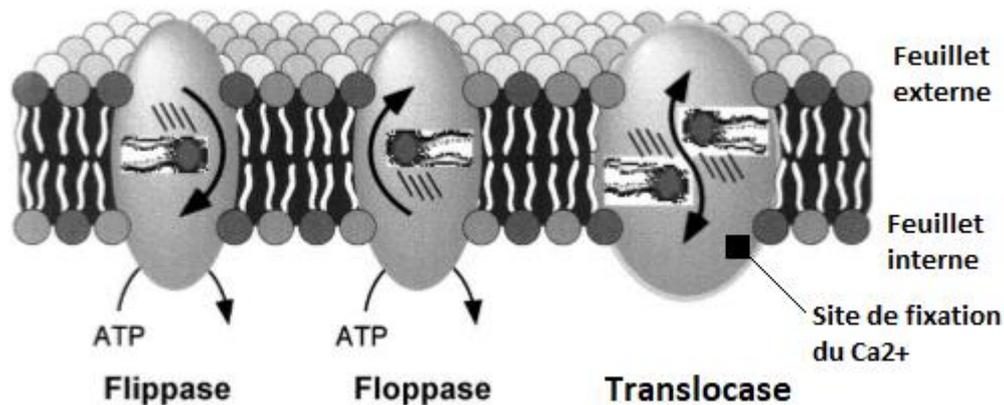


Figure 9 : Transporteurs lipidiques transmembranaires. Les flippases permettent de maintenir les phospholipides au niveau du feuillet interne de la cellule tandis que les floppases permettent le contraire. Ces dernières sont ATP-dépendantes et participent au maintien de l'asymétrie membranaire. En présence de calcium, la translocase permet un transfert bidirectionnel des phospholipides (d'après Robert F.A. Zwaal et Al, *Biochimica et Biophysica Acta* 2004, 1636 : 119–128)

La mobilisation du calcium, en partenariat avec la P38MAP Kinase, active la PLA2⁽²³⁾ qui dégrade les acides gras membranaires et permet la libération d'acide arachidonique. Grâce à une cyclo-oxygénase (COX 1 dans les plaquettes), l'acide arachidonique va donner naissance à la prostaglandine G2 puis H2 qui, grâce à la thromboxane synthase, va produire le thromboxane A2. Ce dernier joue un rôle très important dans l'amplification de l'activation plaquettaire en se fixant à son récepteur transmembranaire TP α .

Les récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés aux protéines G (RCPG) PAR_{1/4}, P2Y1, 5HT2A et V1 sont couplés à une protéine G α_q . Leur activation via la fixation de leur agoniste permet l'activation de la PLCB2, qui, comme on l'a vu précédemment permet la mobilisation calcique du STD et l'activation de la GPIIbIIIa (figure 10). Les récepteurs PAR_{1/4} et TP α sont également couplés à une protéine G_{12/13}. Sont activation stimule Rho-GEF et mène à la phosphorylation de la chaîne légère de la myosine⁽³⁹⁾.

Le récepteur P2Y12 quant à lui, est couplé à une protéine G_i qui va inhiber l'adénylate cyclase et activer la PI3 kinase bêta qui produit du phosphatidylinositol-3 ,4,5-triphosphate qui stimule Akt, ERK2, Rap1b et mobilise le calcium du STD⁽⁴⁰⁾.

L'IP3 et l'augmentation du calcium intracytoplasmique permet également l'activation de la voie CalDAG-GEFI ^(41,42) qui stimule Rap1b qui, en se liant à RIAM, permet le réarrangement du cytosquelette et d'activer la GPIIbIIIa, aidé par la taline.

On note également la kindline 3, protéine du cytosquelette plaquettaire, qui permet l'activation de la GPIIbIIIa.

Lors de l'activation plaquettaire, le contenu des granules va être sécrété, ce qui va donner lieu à une boucle d'amplification du signal, majorant ainsi l'activation.

Les granules alpha sécrètent du VWF de haut poids moléculaire⁽⁴³⁾ et du fibrinogène renforçant ainsi l'adhésion plaquettaire au sous-endothélium et les interactions plaquettes-plaquettes. Ils vont également sécréter des facteurs de la coagulation et des inhibiteurs de la fibrinolyse. Enfin, leur membrane contient également des glycoprotéines GPVI, GPIb et GPIIbIIIa⁽⁴⁴⁾ qui vont fusionner avec la membrane plaquettaire augmentant ainsi le nombre de récepteurs actifs.

Les granules denses sécrètent de l'ADP qui va se fixer au P2Y12 et P2Y1, majorant ces voies de signalisation. Mais également de la sérotonine qui se lie au 5HTA2 et au P2Y1, de l'ATP qui se fixe à P2X1 et des polyphosphates qui activent le facteur XII et a un effet pro-inflammatoire et procoagulant⁽⁴⁵⁾.

i. L'agrégation plaquettaire

L'adhésion et l'activation des plaquettes donnent naissance à l'agrégation plaquettaire, qui va aboutir à la formation d'un thrombus plaquettaire secondaire consolidé par un réseau de fibrine. Les mécanismes physiologiques vont varier en fonction des forces de cisaillement.

En cas de forces de cisaillement faibles ($<1000 \text{ s}^{-1}$), l'agrégation plaquettaire a lieu uniquement par le biais de la GPIIb/IIIa. C'est le cas des veinules et des grosses veines. Le changement de conformation de la GPIIb/IIIa, passant d'une forme pliée à une forme étendue, va permettre son interaction avec le fibrinogène^(46,47), indépendamment du VWF ou de la fibronectine⁽⁴⁸⁾.

En cas de forces de cisaillement comprises en 1000 et $10\,000 \text{ s}^{-1}$, l'agrégation plaquettaire se fait en deux temps. Lors de la première étape, les plaquettes se déplacent sur le thrombus sous forme discoïde non activées et vont se lier entre elles grâce à des fines attaches membranaires^(49,50). Ces attaches se font grâce à la GPIb et la GPIIb/IIIa via le VWF et le fibrinogène. Le déplacement plaquettaire est également régulé par l'action coopérative de la GPIb et la GPIIb/IIIa menant à l'activation réversible de la GPIIb/IIIa^(51,52). Ces attaches membranaires vont fournir un environnement protecteur favorisant l'accumulation des agonistes (ADP, thrombine, thromboxane A₂) et faciliter ainsi l'activation, cette-fois irréversible, de la GPIIb/IIIa. Dans un deuxième temps l'agrégation devient irréversible⁽⁵³⁾ via la GPIIb/IIIa qui se fixe au fibrinogène, au VWF et à la fibronectine.

En cas de forces de cisaillement très élevés ($>10\,000 \text{ s}^{-1}$), comme dans les sténoses artérielles^(54,55), l'agrégation est indépendante de l'activation plaquettaire, et fait intervenir le VWF créant une agrégation instable par roulement des plaquettes à la surface du VWF via la GPIb.

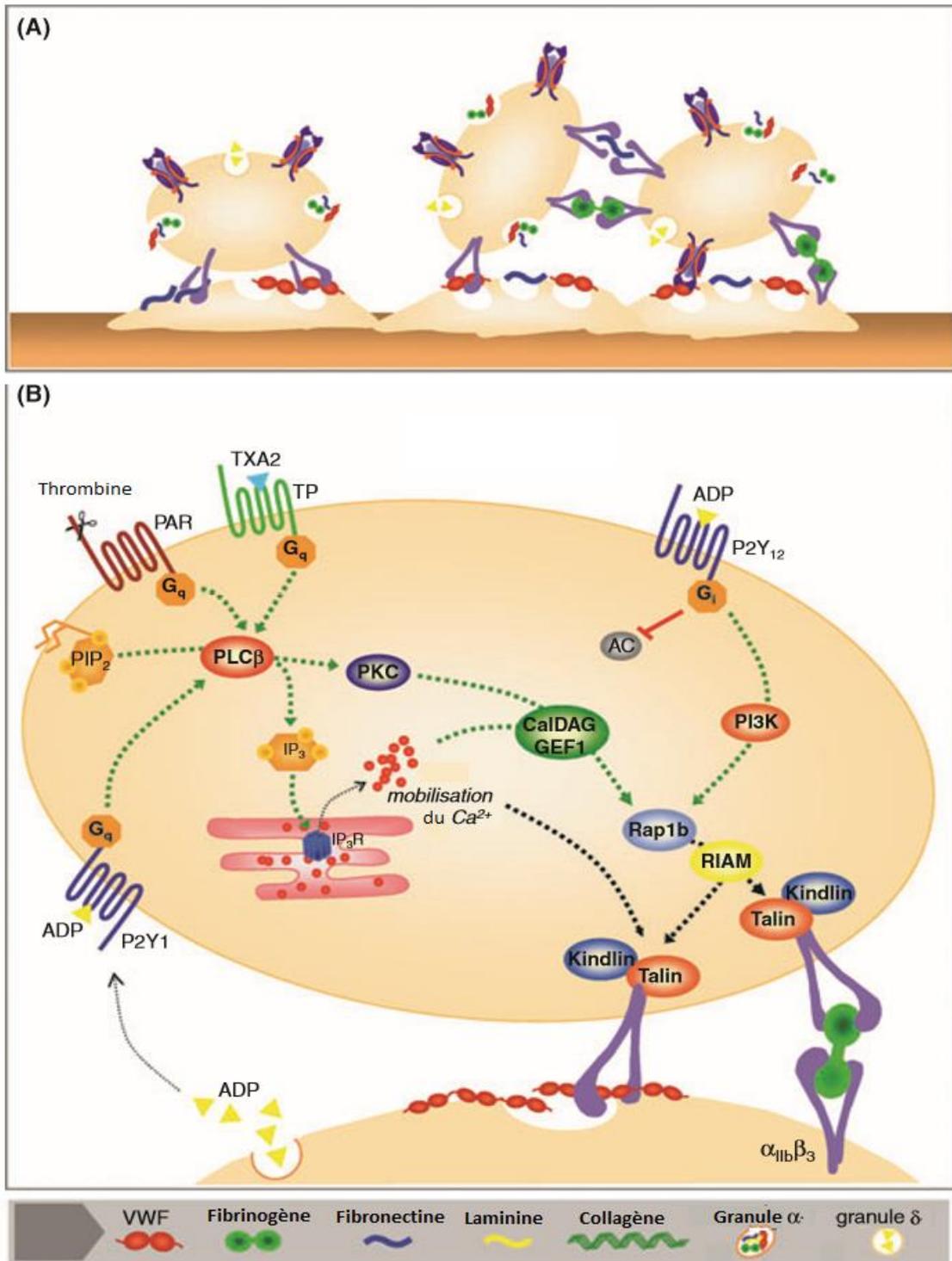


Figure 10 : Schéma de l'agrégation plaquettaire et des principales voies de signalisations. Les agonistes plaquettaire tel l'ADP, le TXA2 et la thrombine vont se fixer à leurs récepteurs couplés aux protéines G (P2Y1, P2Y12, TP, PAR1 et PAR4) amplifiant ainsi l'activation plaquettaire et maintenant la GPIIb/IIIa dans un état d'hyperaffinité pour le VWF et le fibrinogène. Le TXA2 et l'ADP couplés à leurs récepteurs entraînent l'activation de la PLCβ et l'hydrolyse des phospholipides membranaires générant ainsi du IP3 et du diacylglycérol (DAG). Cela aboutit à la mobilisation du calcium et l'activation de la protéine kinase C (PKC). La fixation de l'ADP au P2Y12 inhibe l'adénylate cyclase (AC) et stimule la PI3K permettant d'activer une GTPase (Rap1b) qui interagit avec RIAM puis se lie à la taline qui, couplée à la kindline, active la GPIIb/IIIa (d'après Andrew H. Wei et Al, British Journal of Haematology, 2009, 147 : 415-430)

ii. Régulation négative

Afin d'éviter les situations d'ischémie, un système de régulation négative de l'hémostase primaire intervient aussi bien lors de l'adhésion que de l'activation et de l'agrégation plaquettaire. Ces inhibiteurs comprennent l'oxyde nitrique et des prostaglandines. Les prostacyclines sont classées en 4 types : la PGD_2 , PGE_2 , $PGF_{2\alpha}$ et PGI_2 . Elles se fixent chacune à un récepteur spécifique couplé aux protéines G⁽⁵⁶⁾. La prostacycline PGI_2 est synthétisée par conversion de l'acide arachidonique via la $COX-2$ ⁽⁵⁷⁾ dans les cellules endothéliales. Cela mène à la stimulation de l'adénylate cyclase et ainsi l'augmentation de l'AMP cyclique à l'intérieur de la plaquette qui active la protéine kinase A (PKA). La PKA active le *VAsodilator Stimulated Phosphoprotein* (VASP) qui entrave les filaments d'actine empêchant ainsi la réorganisation du cytosquelette⁽⁵⁸⁾. Le VASP permet également d'inhiber les voies d'activation de la GPIIb/IIIa ainsi que la liaison du fibrinogène et l'agrégation⁽⁵⁹⁾.

b. La coagulation plasmatique

La coagulation fait suite à l'hémostase primaire et est entièrement dépendante de l'activation plaquettaire. En effet celle-ci ne peut avoir lieu si la plaquette n'a pas transloqué ses phospholipides anioniques, initialement situés sur son feuillet interne, vers son feuillet externe. L'exposition des phospholipides anioniques (majoritairement la phosphatidylsérine) permet de créer une surface procoagulante permettant aux différents facteurs de la coagulation de s'y fixer. Les plaquettes participent également au bon déroulement de la coagulation par le biais de ses granules alpha qui contiennent différents facteurs de la coagulation (facteur V, VIII, XI, XIII et fibrinogène).

L'élément déclenchant de la coagulation *in vivo* (**voie d'initiation**) est l'expression à la surface des cellules d'une protéine membranaire appelée facteur tissulaire (FT). Celui-ci est exprimé par les monocytes et les cellules endothéliales activés mais aussi de façon permanente par certaines cellules périvasculaires comme les fibroblastes, les myocytes et les cellules mésenchymateuses. Le FT fixe le facteur VII circulant (proconvertine), qu'il soit inactif (FVII) ou actif (FVIIa). En effet il existe chez toute personne une petite

quantité de FVII déjà activé. Celui-ci, en présence de FT et de calcium, clive le FVII complexé au FT créant ainsi un complexe permettant d'activer le facteur X (Stuart). Ce complexe est appelé prothrombinase, et comprend des phospholipides, du calcium, le FT, le FVIIa, le FXa et le FVa. Ce dernier a pour but d'activer le facteur II (prothrombine) en facteur IIa (thrombine) qui va à son tour transformer le fibrinogène en fibrine mais également activer le facteur VIII (anti hémophilique A), le facteur V (proaccélélerine), le facteur XI (Rosenthal), le facteur XIII et les plaquettes. Ce qui nous mène à la **voie d'amplification**. Le complexe FT-FVIIa active également le FIX (antihémophilique B) en FIXa qui, grâce à son cofacteur, le FVIIa, et en présence de calcium et de phospholipides, active le facteur X. Ce complexe activateur du FX est appelé complexe tenase. Les premières traces de thrombine vont engendrer plusieurs boucles de rétroaction positives en activant le FVIII, le FV et le FXI. Ce qui va considérablement augmenter la génération de thrombine et ainsi consolider le caillot de fibrine, c'est la **phase de propagation** (figure 11).

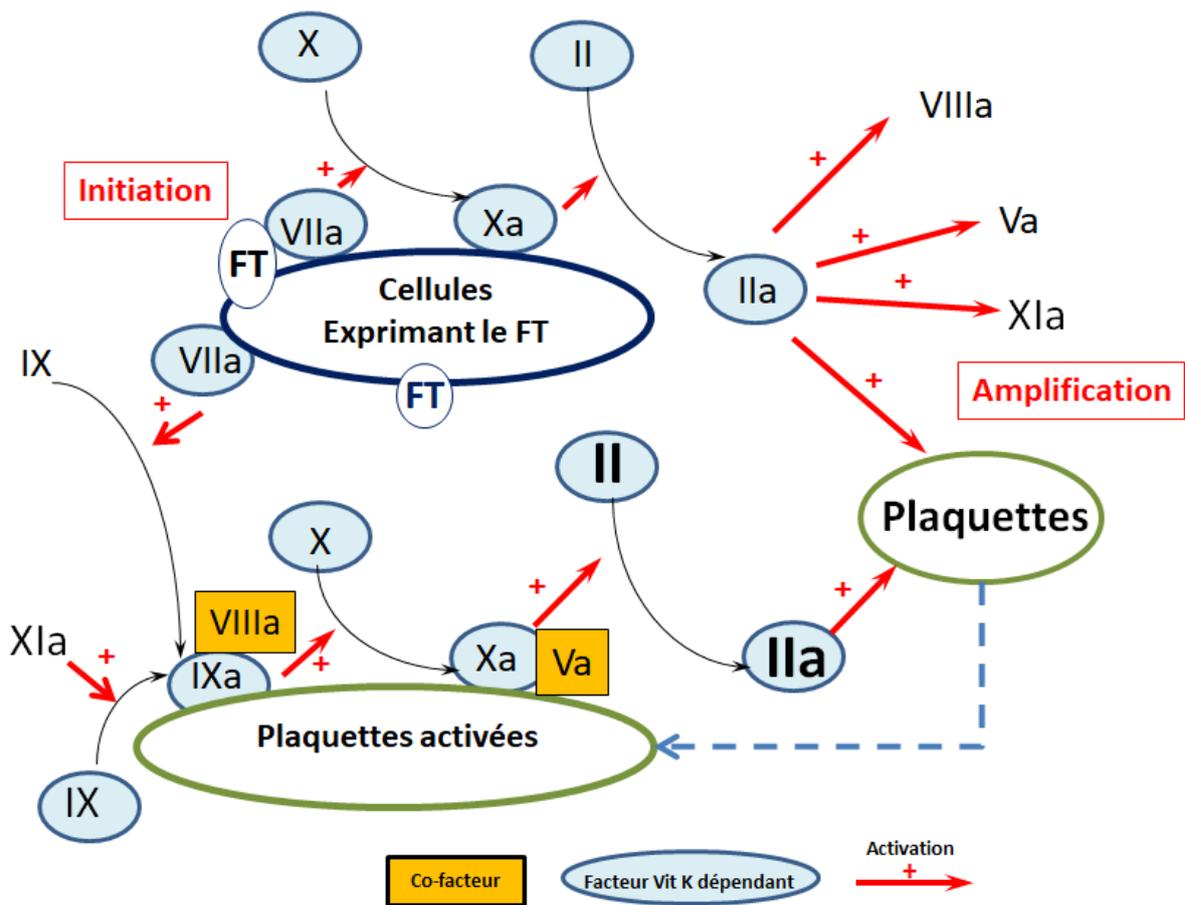


Figure 11 : Schéma de la coagulation plasmatique in vivo (d'après Le référentiel des collèges, Hématologie, Elsevier Masson, P 237)

c. La fibrinolyse

La fibrinolyse est l'ultime processus de l'hémostase permettant de dégrader le caillot de fibrine, l'empêchant ainsi d'obstruer complètement le vaisseau lésé. L'acteur majeur de ce processus est la plasmine qui provient de l'activation du plasminogène par l'activateur tissulaire du plasminogène (tPA) et l'urokinase. Le facteur XIa, XIIa et la prékallitréine jouent également un rôle plus modéré dans son activation. Il existe plusieurs inhibiteurs, le *plasminogen activator inhibitor 1* et 2 (PAI-1 PAI-2) qui inhibent le tPA et l'urokinase, l'alpha 2 antiplasmine et l'alpha 2 macroglobuline qui inhibent

l'activation du plasminogène et enfin le TAFI (*thrombin activatable fibrinolysis inhibitor*) qui inhibe l'action de la plasmine.

Les plaquettes régulent ce processus par le biais du contenu de ses granules. En effet, au sein des granules alpha on trouve du plasminogène⁽⁶⁰⁾ mais aussi des inhibiteurs de la fibrinolyse comme le PAI-1, l'alpha 2 antiplasmine⁽⁶¹⁾, du *platelet-C1 inhibitor* et des proteases nexine-1. Les granules denses participent aussi puisqu'ils contiennent des polyphosphates qui activent le facteur XII.

2. Autres fonctions : défense anti-infectieuse, angiogénèse, tumorigénèse, inflammation

En plus de leur rôle dans l'hémostase, les plaquettes jouent un rôle dans l'immunité innée puisqu'elles ont la capacité de produire et sécréter divers acteurs anti-infectieux comme des cytokines et des chemokines⁽⁶²⁾. Les plaquettes peuvent interagir avec les leucocytes, sécréter des substances pro et anti-inflammatoires et expriment des récepteurs comme le *toll-like receptor* (TLR), notamment le TLR 4 qui reconnaît les lipopolysaccharides, présent dans la membrane des bactéries à gram négatif⁽⁶³⁾. Les plaquettes participent aussi à la formation de NET (*Neutrophil Extracellular Traps*) qui vont piéger les polynucléaires neutrophiles impliqués dans la lutte anti-infectieuse⁽⁶⁴⁾.

Les plaquettes sont également impliquées dans la tumorigénèse en protégeant les cellules tumorales du système immunitaire notamment vis-à-vis des cellules tueuses NK (*Natural Killer*)^(65,66). Elles favorisent le développement métastatique en facilitant non seulement l'arrêt des cellules tumorales dans la circulation sanguine mais également leur adhésion à l'endothélium⁽⁶⁷⁾. Les plaquettes représentent une source importante d'acide lysophosphatidique qui possède des propriétés similaires aux facteurs de croissance permettant ainsi de stimuler la survie des cellules tumorales⁽⁶⁸⁾.

Les plaquettes contiennent également une source importante de molécules impliquées dans l'angiogénèse. A l'intérieur de leurs granules plaquettaires on peut trouver des agents anti-angiogéniques comme le facteur plaquettaire 4⁽⁶⁹⁾ et la thrombospondine 1⁽⁷⁰⁾ mais aussi des facteurs pro-angiogéniques comme le VEGF⁽⁷¹⁾, le facteur de croissance dérivé des plaquettes, le HGF et le bFGF⁽⁷²⁾.

B. Les thrombopathies

I. Définition et présentation clinique

Les thrombopathies représentent un groupe très hétérogène de pathologies, tant sur le plan physiopathologique que sur leur sévérité. Alors que certaines thrombopathies, comme la thrombasthénie de Glanzmann ou le syndrome de Bernard et Soulier sont aujourd'hui bien identifiées, de nombreuses thrombopathies restent encore méconnues et nécessitent des moyens complexes afin de pouvoir les identifier^(73,74). Les thrombopathies sont majoritairement acquises, secondaires à la prise de médicaments, à des hémopathies malignes, d'une insuffisance rénale ou d'une insuffisance hépatocellulaire.

La présentation clinique varie d'un patient à l'autre. Les anomalies de type purpura, pétéchies, hémorragie gingivale, ecchymoses, ménorragies, saignement gastro-intestinal ou épistaxis orientent fortement vers une pathologie de l'hémostase primaire. A la naissance on peut retrouver des hématomes du scalp ainsi qu'aux points de ponction et, plus rarement, des hémorragies intra crâniennes. Autre point important sur lequel il est nécessaire d'insister lors de l'interrogatoire est de savoir si le patient a déjà subi ou non des interventions chirurgicales. Le caractère hémorragique de celle-ci oriente également sur une anomalie de l'hémostase. L'utilisation d'un score s'avère essentiel afin de préjuger du caractère hémorragique ou non du patient⁽⁷⁵⁾. Le score de l'ISTH (*International Society on Thrombosis and Haemostasis*) est un score complet mais long à réaliser. Celui de Tositto, plus court, et initialement utilisé pour le diagnostic de la maladie de Willebrand, permet également de préjuger de la tendance hémorragique ou non d'un patient (tableau II). Il est important de souligner qu'à ce jour, aucun score évaluant la symptomatologie hémorragique n'est validé dans les thrombopathies. Ce qui contribue à rendre leurs diagnostics peu aisés.

Tableau II : Score de Tosetto.

Symptômes	-1	0	1	2	3	4
Epistaxis	-	Aucun ou < 5	> 5 ou plus que 10'	Cause de consultation	Méchage ou cautérisation ou antifibrinolytiques	Transfusion ou traitement substitutif
Cutanés	-	Aucun ou < 1 cm	> 1 cm et pas de traumatisme	Cause de consultation	-	-
Saignements prolongés de blessures légères	-	Aucun ou < 5	> 5 ou plus que 5'	Cause de consultation	Hémostase chirurgicale	Transfusion ou traitement substitutif
Cavité buccale	-	Non	Au moins une	Cause de consultation	Hémostase chirurgicale ou antifibrinolytique	Transfusion ou traitement substitutif
Saignement gastro-intestinal	-	Non	Associé à un ulcère, HT portale, hémorroïdes, angiodysplasie	Spontané	Hémostase chirurgicale ou transfusion, ou traitement substitutif	-
Extraction dentaire	Pas de saignement dans 2 extractions au moins	0 ou pas de saignement dans 1	Saignement, pas de consultation	Cause de consultation	Reprise chirurgicale ou compression	Transfusion ou traitement substitutif
Chirurgie	Pas de saignement dans 2 chirurgies au moins	0 ou pas de saignement dans 1	Saignement, pas de consultation	Cause de consultation	Reprise chirurgicale ou antifibrinolytiques	Transfusion ou traitement substitutif
Ménorragies	-	Non	Oui ou cause de consultation	Antifibrinolytiques ou pilule	Dilatation & Curetage (D&C), traitement martial	Transfusion ou traitement substitutif ou hystérectomie
Hémorragie du post-partum	Pas de saignement dans au moins 2 délivrances	0 ou saignement dans 1 délivrance	Cause de consultation	D&C, traitement martial, antifibrinolytiques	Transfusion ou traitement substitutif	Hystérectomie
Hématomes musculaires	-	Aucun	Post-traumatiques. Pas de traitement	Spontanés. Pas de traitement	Spontanés ou traumatiques, nécessitant un traitement substitutif	Spontanés ou traumatiques, nécessitant intervention chirurgicale ou transfusion
Hémarthrose	-	Aucun	Post-traumatiques. Pas de traitement	Spontanées. Pas de traitement	Spontanées ou traumatiques, nécessitant un traitement substitutif	Spontanées ou traumatiques, nécessitant intervention chirurgicale ou transfusion
Saignement du SNC	-	Aucun	-	-	Sous-dural, intervention chirurgicale	Intra-cérébral, intervention chirurgicale

Initialement décrit pour la maladie de Willebrand, ce score permet de dépister une tendance hémorragique.

Celui-ci est considéré positif s'il est supérieur à 5 chez les femmes et supérieur à 3 chez les hommes.

II. Les thrombopathies acquises

La grande majorité des thrombopathies sont d'origine acquise. L'interrogatoire s'avère alors primordial puisque l'apparition tardive des symptômes oriente vers cette étiologie. *A contrario*, l'apparition très précoce des symptômes, parfois dès la naissance, oriente vers une thrombopathie d'origine constitutionnelle.

De nombreux médicaments ou aliments peuvent interagir avec les fonctions plaquettaires (tableau III). C'est pourquoi l'interrogatoire est primordial avant toute exploration des fonctions plaquettaires. Parmi les hémopathies se sont surtout les syndromes myéloprolifératifs (thrombocytémie essentielle, polyglobulie de Vaquez, splénomégalie myéloïde chronique et leucémie myéloïde chronique), les syndromes myélodysplasiques, les leucémies aiguës et les dysglobulinémies monoclonales.

Les mécanismes physiopathologiques des thrombopathies associées à l'insuffisance hépatocellulaire et à l'insuffisance rénale sont complexes et impliquent dans les deux cas l'augmentation du NO et des prostacyclines^(76,77).

Durant la CEC, plusieurs mécanismes modifient les fonctions plaquettaires, à commencer par les anesthésiants, mais aussi le contact des plaquettes au circuit extracorporel, le clampage de l'aorte, l'interface entre le sang et l'air, l'hypothermie et les traitements anticoagulants dont la quantité injectée est massive.

Tableau III : Médicaments et aliments pouvant interagir avec les fonctions plaquettaires

Anti-inflammatoires	Inhibiteurs de la COX-1 : aspirine et toute réparations contenant de l'acide acétylsalicylique Anti-inflammatoires non stéroïdiens
Antiagrégants plaquettaires	Inhibiteurs des récepteurs plaquettaires
Inhibiteurs de phosphodiesterase	Dipyridamole, Cilostazole
Anticoagulants	De façon indirecte en inhibant la thrombine
Agents cardiovasculaires	Bêtabloquants, vasodilatateurs, diurétiques, inhibiteurs calciques
Antibiotiques	Beta lactamines, amphotéricine, hydroxychloroquine, quinine, nitrofurantoïne
Chimiothérapie	Asparaginase, vincristine
Psychotropes	Antidépresseurs tricyclique, inhibiteurs spécifiques de la recapture de la sérotonine
Thrombolytiques	Urokinase, streptokinase, activateur tissulaire du plasminogène
Autres médicaments	Clofibrate, produit de contraste radiographique
Nourritures et plantes à forte dose	Alcool, caféine, cumin, ail, oignon, Schweppes, gingembre, ginseng, angélique de Chine, fenugrec, huile de poisson, tamarin, curcuma, épilobe, vitamine C et E, champignons chinois, camomille, canneberge, sauge rouge, chirette verte, ginkgo, thé vert,

III. Les thrombopathies constitutionnelles

1. Défaut d'adhésion plaquettaire

Avec l'arrivée de la biologie moléculaire, de nombreuses mutations responsables de thrombopathies, plus ou moins associées à des thrombopénies, ont pu être identifiées⁽⁷⁸⁾. Ces thrombopathies peuvent s'inscrire dans un tableau syndromique ou bien être isolées.

Le **syndrome de Bernard-Soulier** (BSS) est une pathologie majoritairement autosomique récessive due à un déficit en GPIb, il associe une macro-thrombopénie et une thrombopathie, et entraîne un défaut d'adhésion de la plaquette au VWF⁽⁷⁹⁾. D'exceptionnels cas de transmission autosomique dominante ont été rapportés⁽⁸⁰⁾. Les manifestations cliniques débutent typiquement dans l'enfance par des épistaxis, des hémorragies gingivales et un purpura. L'âge d'apparition des symptômes est corrélé à la sévérité de la pathologie. Par la suite on peut observer des ménorragies ainsi que des hémorragies gastro-intestinales ou génito-urinaires. Les traumatismes et opérations chirurgicales sont également susceptibles d'induire un saignement pouvant être l'origine du diagnostic. La sévérité des symptômes hémorragiques sont extrêmement variables d'un patient à l'autre⁽⁸¹⁾. La GPIb se forme au cours de la mégacaryopoïèse grâce à 4 gènes : GPIB α , GPIB β , GPV et GPIX⁽⁸²⁾. A l'heure actuelle, si des mutations responsables du BSS ont été retrouvées sur les gènes GPIB α , GPIB β et GPIX^(79,83), aucune n'a été découverte dans le gène GPV.

Le **pseudo-Willebrand** est une thrombopathie due à une mutation sur la GPIb α plaquettaire, la rendant ainsi hyperaffine pour le VWF⁽⁸⁴⁾. Il est le diagnostic différentiel de la maladie de Willebrand de type 2 qui elle, se caractérise par une hyperaffinité du VWF pour la GPIb plaquettaire.

Les déficits en GPVI et GPIIb/IIIa sont anecdotiques et de mécanisme physiopathologique pas tout à fait élucidés à l'heure actuelle^(85,86).

2. Défaut d'interaction plaquettes – plaquettes

Les thrombopathies par défaut d'interaction plaquette – plaquette sont largement représentées par la **Thrombasthénie de Glanzmann**. Cette pathologie autosomique récessive est liée à une anomalie quantitative ou qualitative de la GPIIb/IIIa. Son incidence est majorée dans les communautés à fort taux de consanguinité comme chez les manouches, qui présentent pour la plus part la même mutation « gypsy » sur le gène ITGA2B, apparue chez un ancêtre commun il y a plus de 300 ans⁽⁸⁷⁾. Différents sous-types existent suivant que le déficit est complet (moins de 5% de complexes à la surface des plaquettes et absence de fibrinogène dans les granules alpha, Type I), partiel (5 à

20% de complexes et présence de fibrinogène dans les granules alpha, Type II) ou qualitatif (plus de 20% de complexes mais anomalies fonctionnelles).

Le **déficit en Kindline** (*Leukocyte Adhesion Deficiency III / LADIII*) est une pathologie autosomique récessive liée à une mutation du gène FERMT3 et alliant déficit immunitaire, hyperleucocytose, infections non purulentes à répétition et thrombopathie. En effet, la Kindline est une protéine du cytosquelette permettant l'activation de toutes les intégrines bêta, y compris celles des polynucléaires neutrophiles⁽⁸⁸⁾.

3. Défaut de sécrétion des granules

Parmi les thrombopathies liées à un défaut de sécrétion des granules, il faut distinguer les anomalies des granules alpha de celles des granules denses.

La **maladie du pool vide** est définie par un déficit en contenu des granules denses qui peut être lié à une anomalie quantitative ou qualitative des granules. Cette anomalie peut être isolée ou bien associée à d'autres pathologies héréditaires comme le syndrome de **Hermansky-Pudlak** (qui associe albinisme, neutropénie, fibrose pulmonaire, colite granulomateuse et thrombopathie) ou le syndrome de **Chediak-Higashi** (qui associe albinisme, hypertrophie hépato-spléno-ganglionnaire, infections cutané-respiratoires à pyogène, déficit des lymphocytes natural killer et thrombopathie)⁽⁸⁹⁾. Les bases moléculaires sont encore mal élucidées, cependant, un déficit en protéine MRP4 (*multidrug-resistant protein 4*) a été retrouvé dans de très rares cas⁽⁹⁰⁾.

Les thrombopathies par défaut de sécrétion des granules alpha sont majoritairement représentées par le **syndrome des plaquettes grises**. De transmission le plus souvent autosomique récessive (mutation du gène NBEAL2), ce syndrome induit des saignements modérés à sévères et peut évoluer vers une myélofibrose avec thrombopénie⁽⁹¹⁾.

D'autres syndromes très rares affectant les granules α ont également été décrits.

Le **syndrome des plaquettes Québec**, se traduit majoritairement par des saignements post-opératoires retardés et peut s'accompagner d'hématuries et plus rarement de saignements articulaires. De transmission autosomique dominante (mutation du gène

PLAU), il est lié à une accumulation de l'urokinase dans les granules α qui conduit à la protéolyse des protéines intragranulaires⁽⁹²⁾.

Le **syndrome d'arthrogrypose-insuffisance rénale-cholestase** (*ARC syndrome*), comme son nom l'indique se manifeste par une raideur articulaire (arthrogrypose), d'une insuffisance rénale, d'une cholestase et d'une thrombopathie par déficience en granules alpha. De transmission autosomique récessive, il est lié à une mutation du gène VPS33B⁽⁹³⁾.

Le **syndrome de Paris-Trousseau** (très proche du syndrome de Jacobsen), associe retard mental, anomalies cardiaques, dysmorphie craniofaciale, thrombopénie, dysmégacaryopoïèse et des granules α géants parfois observables dans les plaquettes entraînant un défaut de sécrétion. De transmission autosomique dominante, il est lié à une délétion du bras long du chromosome 11 incluant le gène FLI1 qui code pour un facteur de transcription impliqué dans la mégacaryopoïèse⁽⁹⁴⁾.

4. Défaut de transduction du signal

Les thrombopathies affectant la transduction sont nombreuses et de diagnostic souvent difficile. Toutes les voies peuvent être touchées, que ce soit les protéines G, les enzymes de la voie du thromboxane A2, de CalDAG-GEF1, les récepteurs transmembranaires ou bien la voie des kinases. Ces anomalies peuvent être isolées ou bien s'associer en syndrome comme dans le **syndrome de Noonan** qui allie retard mental, dysmorphie faciale, petite taille, atteinte cardiaque et thrombopathie.

5. Défaut de la fonction procoagulante des plaquettes

Le **syndrome de Scott** a été décrit pour la première fois par Harvey J. Weiss en 1979⁽⁹⁵⁾, chez une jeune patiente de 34 ans qui présentait des hémorragies post opératoires abondantes, et chez qui tous les tests d'hémostase de première intention étaient normaux. Et pour cause, le syndrome de Scott est une thrombopathie lié à un défaut d'exposition des phosphatidylsérines (anciennement facteur plaquettaire 3) du feuillet

interne vers le feuillet externe de la membrane plaquettaire, et à une production diminuée de microparticules après activation^(96,97). Cela entraîne donc l'absence de surface catalytique nécessaire à la fixation des facteurs de la coagulation. Ainsi, les facteurs vitamine K dépendants ne peuvent se fixer aux plaquettes et ne peuvent interagir correctement avec les cofacteurs. Par conséquent, l'étude isolée des fonctions plaquettaires et celle de la coagulation ne présentent aucune anomalie. Afin de dépister ce syndrome il faut donc étudier l'interaction entre les plaquettes et les facteurs de la coagulation, à savoir, l'activité procoagulante des plaquettes. On a donc commencé à doser le facteur II résiduel dans le sérum et à réaliser des tests de consommation de la prothrombine. En effet, si l'activité procoagulante des plaquettes fonctionne normalement, la cascade de la coagulation ayant lieu au niveau des phospholipides plaquettaires, les facteurs de la coagulation sont consommés et sont indosables dans le sérum. En cas d'anomalie d'exposition des phospholipides, les facteurs persistent dans le sérum en quantité importante.

Des techniques plus performantes par cytométrie en flux ont ensuite été mises au point en étudiant la fixation de l'annexine V aux phosphatidylsérines (PS) . Cette technique permet d'évaluer de façon plus spécifique le degré d'exposition des phospholipides anioniques *via* le taux de fixation de l'anticorps après activation plaquettaire. Afin d'augmenter l'exposition des PS, les plaquettes sont incubées avec l'ionophore calcique A23187, qui est une protéine hydrophobe qui va s'insérer à travers la paroi des cellules et qui fonctionne comme un transporteur calcique, permettant l'entrée massive de calcium à l'intérieur des cellules.

Cette anomalie de translocation des phospholipides a été décrite aussi bien sur les plaquettes que sur les globules rouges et les lymphocytes^(98,99). Et ce n'est qu'en 2010, qu'une mutation génétique a été découverte sur le gène codant pour une protéine transmembranaire (ANO6 ou TMEM16F), impliquée dans le processus de *flip-flop* des phospholipides membranaires^(38,100). Cette protéine à 8 domaines transmembranaires, après activation par le calcium, permet le transfert bidirectionnel des phospholipides ainsi que la sécrétion d'ions chlorures via la création d'une cavité hydrophile (figure 12).

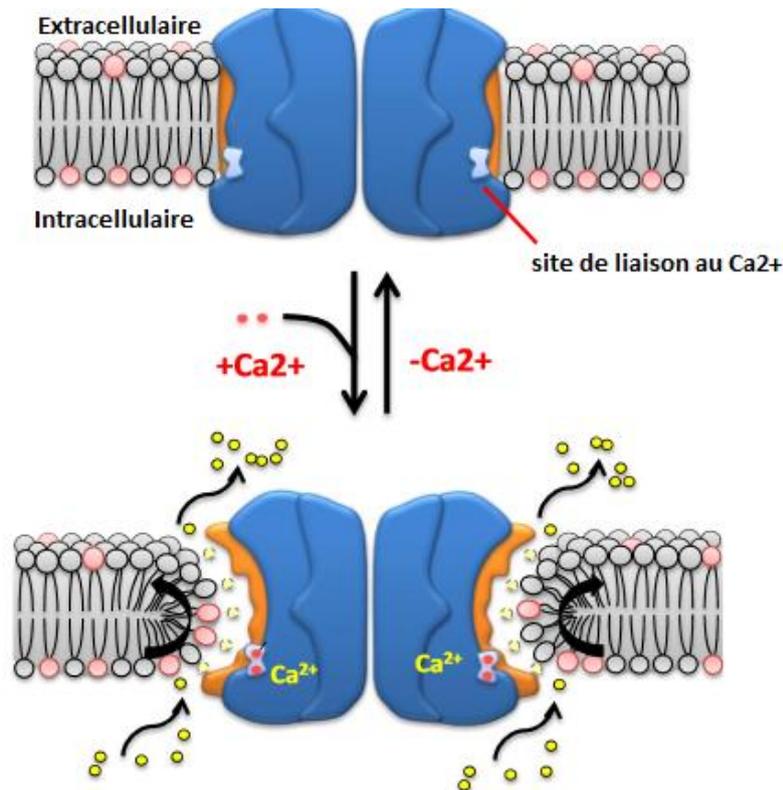


Figure 12 : Aspect schématique de la fonction translocase et canal ionique d'ANO6 (d'après OH UP, *flugers Arch* 2016, 468 : 443-53)

Le syndrome de Scott est donc une maladie génétique à transmission autosomique récessive. Sa prévalence est favorisée par les unions consanguines.

Le désordre hémorragique associé au syndrome de Scott confirme le caractère essentiel des phospholipides anioniques normalement exposés après stimulation plaquettaire.

C. Méthodes d'exploration des thrombopathies

I. Les tests de routine et de dépistage

1. Hémogramme

L'hémogramme automatisé est un examen indispensable au diagnostic de thrombopathie. Il permet, par variation d'impédance, de compter les plaquettes ainsi que d'apprécier leur volume. En effet, certaines thrombopathies peuvent s'accompagner d'une thrombopénie, c'est le cas du syndrome de Bernard et Soulier ou du syndrome des plaquettes grises. Par ailleurs, le volume plaquettaire moyen est d'une grande aide au

diagnostic quand on sait que certaines thrombopathies s'accompagnent d'une modification du volume plaquettaire⁽⁷⁴⁾.

2. Frottis sanguin

Si l'hémogramme peut apprécier le nombre et le volume plaquettaire, il ne peut à l'heure actuelle nous renseigner sur leur morphologie. Le frottis sanguin est de réalisation simple, l'automate prend une goutte de sang sur tube EDTA qu'il étale afin d'être colorée grâce au May-Grünwald Giemsa (MGG). Il permet de compter les plaquettes de volume augmenté ou diminué et d'apprécier la présence ou non des granules α . En cas de thrombopénie il permet d'éliminer la présence d'agrégats plaquettaire ou de satellitisme autour des polynucléaires neutrophiles. Enfin certains éléments peuvent orienter le diagnostic comme la présence d'inclusion bleutée dans les leucocytes ou la présence de dysplasie sur les autres lignées.

3. Bilan d'hémostase standard

Le bilan d'hémostase standard comprend un temps de Quick (ou taux de prothrombine TP), un temps de céphaline avec activateur (TCA) et le dosage fonctionnel du fibrinogène. Le TP est un temps de coagulation d'un plasma citraté, déplaquetté, recalcifié en présence de Thromboplastine, qui correspond à un mélange de phospholipides et de facteur tissulaire, et d'un inhibiteur d'héparine. Par conséquent il est dépendant du facteur II, V, VII, X et du fibrinogène. Le TCA est un temps de coagulation d'un plasma citraté, déplaquetté, recalcifié en présence de céphaline (qui correspond à de la phosphatidyléthanolamine) et d'un activateur de la phase contacte (silice, kaolin, acide ellagique ...), il est dépendant des facteurs II, V, VIII, IX, X, XI et du fibrinogène. Il est également sensible aux traitements anticoagulants et aux anticoagulants circulants de type lupique. Le dosage fonctionnel du fibrinogène peut être dosé par la méthode de Von Clauss qui consiste à ajouter au plasma citraté déplaquetté de la thrombine en excès, ainsi le temps de coagulation mesuré est proportionnel au fibrinogène.

Ce bilan d'hémostase est indispensable afin d'éliminer une autre coagulopathie potentiellement responsable de la symptomatologie et notamment les coagulopathies de consommation responsables de thrombopénie.

4. Etude du facteur Willebrand

Sur le plan clinique, la maladie de Willebrand est également responsable d'hémorragies cutanéomuqueuses puisqu'il est impliqué dans l'hémostase primaire. Une anomalie ou un déficit en VWF doit donc être éliminé avant de rechercher une thrombopathie.

Deux examens simples sont à réaliser en première intention, il s'agit des mesures de l'activité cofacteur de la ristocétine et de l'antigène Willebrand. L'activité cofacteur de la ristocétine explore la capacité du VWF à se fixer sur des plaquettes en présence de ristocétine. Il est le reflet de l'activité du VWF. La ristocétine est un antibiotique dont l'une des propriétés est de modifier les charges électrostatiques du VWF lui permettant ainsi de se fixer aux plaquettes. Cette capacité lui a valu d'être retiré du marché car pourvoyeuse de thrombopénies. L'antigène quant à lui est le reflet de la quantité de protéine en circulation.

5. Temps d'occlusion plaquettaire et temps de saignement

Le temps d'occlusion plaquettaire (TOP) ou PFA® pour *Platelet Function Analyzer*, correspond au temps d'occlusion d'une membrane de nitrocellulose dans des conditions où les forces de cisaillement sont élevées et en présence de collagène et d'agonistes plaquettaire qui sont l'épinéphrine ou l'ADP. Si ce test a une bonne valeur prédictive négative pour éliminer une maladie de Willebrand⁽¹⁰¹⁾, il manque totalement de sensibilité et de spécificité en ce qui concerne les thrombopathies. Il n'est de ce fait pas recommandé de le réaliser dans ces situations⁽¹⁰²⁻¹⁰⁴⁾.

Le temps de saignement est un test ancien, longtemps utilisé puis abandonné du fait de sa faible reproductibilité. Il est à noter cependant, que, réalisé dans de bonnes conditions, par du personnel expérimenté, celui-ci est un test intéressant permettant d'explorer l'hémostase primaire dans sa globalité. Il consiste à effectuer, sous une pression de 40 mm de mercure, maintenue à l'aide d'un brassard à tension, soit une

incision horizontale à la face antérieure du tiers supérieur de l'avant-bras, à l'aide d'un dispositif à usage unique (incision de 5 à 8 mm de longueur) (Ivy-incision),

Dans tous les cas, il nécessite une désinfection préalable de la peau. Le chronomètre est déclenché immédiatement après l'incision. Le sang est recueilli sur du papier filtre toutes les 30 secondes jusqu'à l'arrêt du saignement. Les valeurs usuelles pour ce test sont de 4 à 8 minutes.

II. Les tests spécialisés de confirmation

1. Tests fonctionnels d'agrégation

Les tests fonctionnels d'agrégation plaquettaire ont été développés en 1962 par Born et O'Brien et sont considérés comme le *gold standard* pour le diagnostic des thrombopathies. Cependant, leur réalisation et leur interprétation sont complexes et se heurtent à l'exigence des conditions pré-analytiques et analytiques⁽¹⁰⁵⁾. En effet, afin de réaliser cet examen dans les meilleures conditions, il est demandé aux patients d'être au repos pendant quelques minutes, ne pas fumer 30 minutes avant, ne pas boire de café 2 heures avant, d'arrêter les traitements ayant une activité réversible sur les plaquettes (Anti Inflammatoire Non Stéroïdiens AINS) 3 jours avant, d'arrêter les traitements avec une action irréversible sur les plaquettes (aspirine, thiényopyridines) 10 jours avant et d'être à jeun. En plus de cela, le recueil de l'échantillon est lui aussi très standardisé afin de limiter au maximum l'activation plaquettaire lors du prélèvement. Enfin, pour chaque technique, un échantillon doit être prélevé sur un donneur sain respectant les mêmes conditions pré-analytiques. Il est à noter aussi que cette technique requiert une quantité importante de sang et donc très difficile à réaliser chez les enfants. L'agrégomètre est un photomètre, constitué d'une source lumineuse avec un socle, pouvant recevoir plusieurs cuvettes couplées à un agitateur magnétique permettant de maintenir les plaquettes en suspension. Celles-ci sont maintenues à 37°C grâce à un bloc thermostaté. Le principe du test est basé sur une mesure photométrique de l'éclaircissement d'un plasma riche en plaquettes (PRP), faisant suite au phénomène d'agrégation plaquettaire induite par différents agonistes^(105,106). Une fois les plaquettes agrégées, elles vont tomber au fond

de la cuvette, et la variation du faisceau lumineux est analysée grâce à un ordinateur (figure 13).

Il existe différents modes d'expression des résultats, le plus usuel étant le pourcentage d'agrégation maximale après 6 minutes d'incubation du PRP avec l'agoniste (figure 14). Ces tests sont essentiels mais souffrent du fait qu'ils ne sont pas réalisables si le compte de plaquettes en PRP est trop bas et sont peu sensibles aux thrombopathies modérées. Une alternative est l'agrégométrie par impédance, réalisable sur sang total. Cependant cette technique nécessite encore quelques mises au point afin d'être réalisé en routine⁽¹⁰⁷⁾.

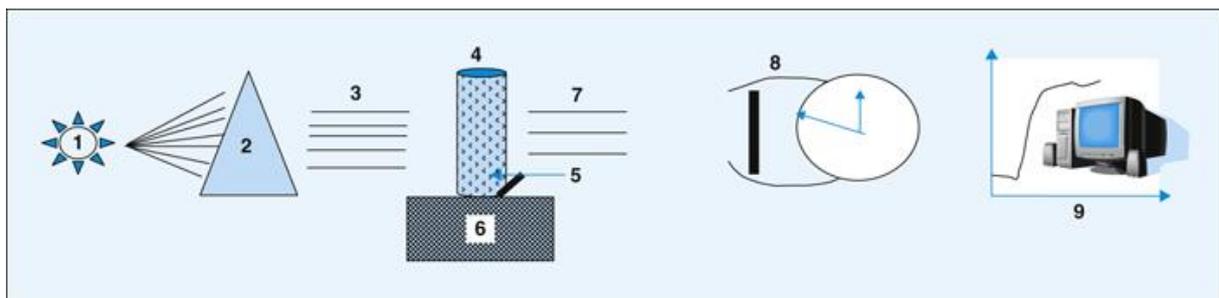


Figure 13 : Principe de l'agrégométrie par variation de la transmission lumineuse. 1- Source lumineuse polychromatique ; 2- Filtre monochromatique ; 3- Faisceau monochromatique ; 4- Cuvette contenant du PRP ; 5- Barreau métallique ; 6- Moteur rotatif 1 100 tours/min ; 7- Lumière transmise ; 8- Diode photoélectrique ; 9- Enregistreur (d'après El Alamy I, Annales de biologie clinique, 2013, 71 : 47-57))

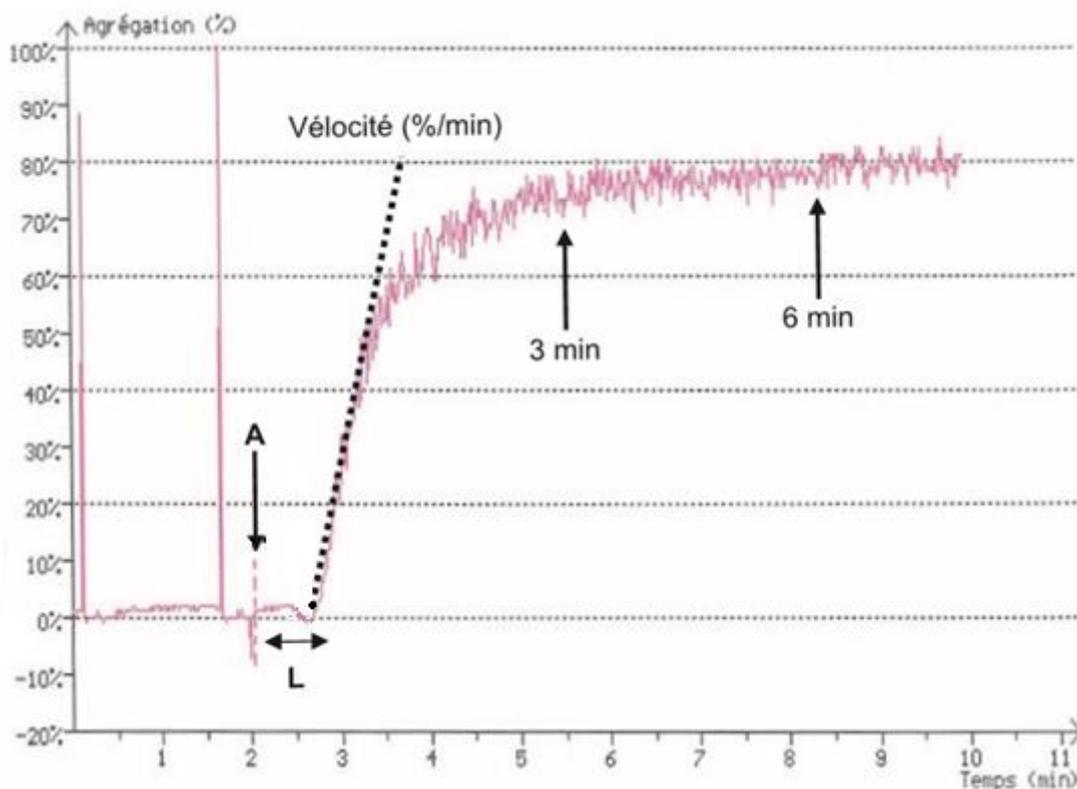


Figure 14 : Tracé d'un test d'agrégation plaquettaire. Exemple d'un test d'agrégation plaquettaire réalisé en PRP avec le collagène 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ comme agoniste (A). Les principaux modes d'expression du résultat sont : le temps de latence (L), l'agrégation à 3 minutes, à 6 minutes et l'agrégation maximale. 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)

2. Cytométrie en flux

La cytométrie en flux (CMF) est une technique de caractérisation quantitative et qualitative de particules en suspension dans un liquide. Elle consiste à analyser les signaux optiques ou physiques émis par les cellules coupant le faisceau lumineux d'un laser. Les signaux mesurés sont relatifs, d'une part, aux propriétés optiques intrinsèques des cellules analysées (volume, taille, structure), et d'autre part, aux propriétés optiques induites par la fluorescence obtenue via le marquage par des anticorps spécifiques. Ces signaux sont collectés par des photomultiplicateurs, amplifiés, numérisés, traités et stockés par un ordinateur. Ce procédé d'analyse individuelle (cellule par cellule) peut s'effectuer à la vitesse de plusieurs milliers d'événements par seconde. L'ordinateur

calcule les données associées aux distributions des paramètres mesurés et les représente sous la forme d'histogrammes (1 paramètre) ou de cytogrammes (2 paramètres) sur une ou plusieurs populations dont les propriétés cellulaires sont ainsi évaluées. En ce qui concerne les plaquettes, leur étude peut se faire aussi bien au repos qu'activé en rajoutant des agonistes comme le TRAP ou l'ADP. Son intérêt est majeur en ce qui concerne le diagnostic des thrombopathies liées à des anomalies touchant les glycoprotéines plaquettaires comme la thrombasthénie de Glanzmann ou le syndrome de Bernard et Soulier. Elle y voit aussi son intérêt dans le diagnostic du syndrome de Scott grâce au marquage de la phosphatidylsérine par l'annexine V après activation des plaquettes par du ionophore calcique⁽¹⁰⁸⁾ (figure 15), dans l'études des granules denses via la mépacrine ou bien encore l'étude des flux calciques⁽¹⁰⁹⁾.

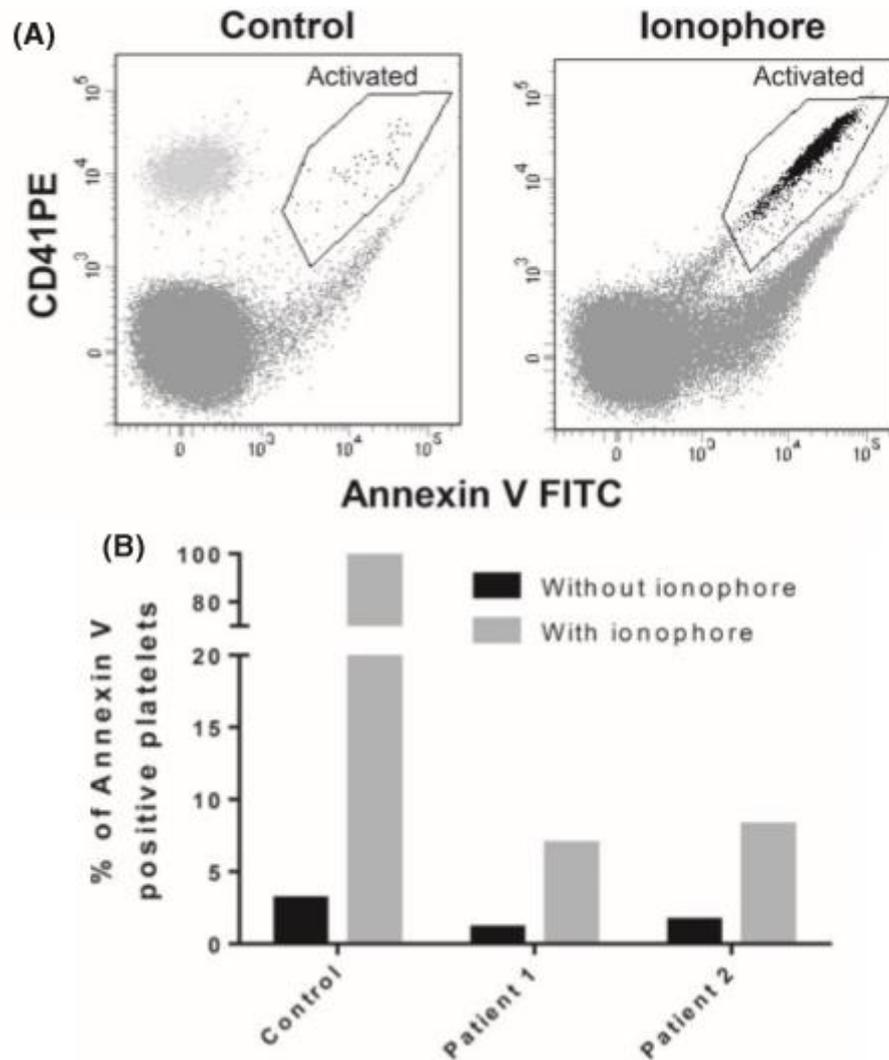


Figure 15 : Etude de la fixation d'annexine-V à la surface des plaquettes par cytométrie en flux.. (A) Les plaquettes sont isolées des autres cellules par leur marqueur spécifique (CD41) couplé à un fluorochrome qu'est la phycoerythrin (PE-CD41). La fixation du fluorescein isothiocyanate (FITC)-Annexine V a été analysé sur cette population PE-CD41+. (B) Les rectangles noirs représentent le pourcentage de fixation de l'annexine V sur des plaquettes au repos. Les rectangles gris représentent le pourcentage de fixation de l'annexine V sur des plaquettes activées par le biais du ionophore calcique A23187. Le contrôle représente un témoin sain tandis que les patients 1 et 2 sont atteints du syndrome de Scott (d'après Halliez M, et Al, *British Journal of Haematology*, 2015, 171 : 277–292)

3. Dosage du contenu des granules

Plusieurs composants granulaires peuvent être dosés, pour cela il est nécessaire que la plaquette s'active et libère le contenu de ses granules. Cela peut être réalisé en faisant un dosage comparatif entre plasma et sérum ou bien après congélation des plaquettes, qui va les faire éclater, libérant ainsi tout le contenu de ses granules.

4. Microscopie électronique

La microscopie électronique permet de faire des coupes ultrastructurales des plaquettes après les avoir fixés en résine Epoxy. Elle permet donc d'observer les organites, le cytosquelette et les membranes plaquettaires⁽¹¹⁰⁾ (figure 16).

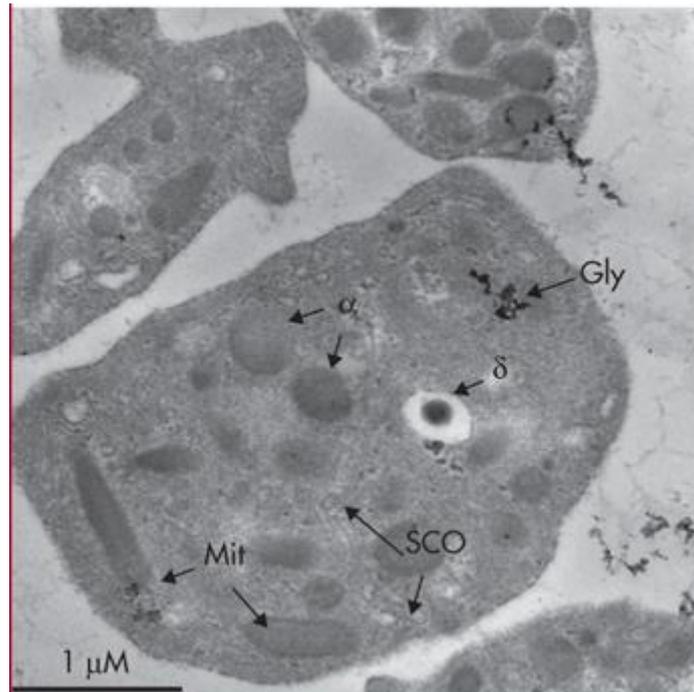


Figure 16 : Ultrastructure de plaquette en microscopie électronique à transmission. Les plaquettes sont lavées en tampon Sørensen, fixées par glutaraldéhyde et incluses en résine de polyépoxydes. (Mit : Mitochondries ; SCO : Système canaliculaire ouvert ; Gly : Glycogène ; α : granules α ; δ : Granules δ en « œil de taureau » (d'après Fiore, M et Al, *Hématologie* 2017, 23 : 243-54)

5. Biologie moléculaire

Le diagnostic des thrombopathies, très souvent complexe, a vu ses performances décuplées depuis le développement de la biologie moléculaire. En fonction du phénotype et des résultats des tests de première et deuxième intention, la biologie moléculaire peut s'utiliser de deux façons, la première est la recherche ciblée d'une mutation, comme dans la thrombasthénie de Glanzmann en cas de tests fonctionnels caractéristiques. La deuxième est la recherche de plusieurs variants rares par technique de séquençage haut débit, réservé aux situations où une thrombopathie est suspectée mais qu'aucun des

tests ne permet de faire un diagnostic formel⁽¹¹¹⁾. Cette démarche sera préférentiellement appliquée sur les anomalies plaquettaires franches avec un caractère familiale et dans lequel plusieurs membres de la famille, symptomatiques et asymptomatiques, peuvent être analysés.

6. Tests immunologiques

Les tests immunologiques permettent de rechercher des auto ou des allo-anticorps dirigés contre les plaquettes. Leur importance est majeure dans le diagnostic de thrombopénie induite à l'héparine (TIH) mais aussi dans les situations d'allo-immunisation suite aux transfusions itératives de concentrés plaquettaires chez les patients présentant un déficit en glycoprotéine plaquettaire.

7. Autres tests

D'autres tests peuvent être utilisés dans certaines situations spécifiques. On peut citer le **dosage du facteur II résiduel**. Ce test consiste à prélever un échantillon dans un tube de sang dépourvu d'anticoagulant, permettant ainsi de récupérer le sérum normalement dépourvu des facteurs de la coagulation. Sur ce sérum, on dosera donc le taux de facteur II résiduel. En temps normal, comme le tube n'est pas anticoagulé, il ne restera quasiment plus de facteur II dans le sérum. Ce test permet de dépister des anomalies d'exposition des phospholipides, dont la principale étiologie est le syndrome de Scott. En effet, dans ce cas-là, les facteurs de la coagulation ne peuvent se fixer à la surface des plaquettes et vont donc rester dans le sérum.

Un autre test que l'on peut citer est le **test de consommation de la prothrombine**, réalisé selon deux méthodes, celle sur sérum et celle de Parry. La méthode sur sérum consiste à mesurer un temps de coagulation en présence de fibrinogène et de thromboplastine (mélange de facteur tissulaire et de phospholipides). Ce temps sera raccourci en cas d'anomalie d'exposition des phospholipides puisque les facteurs de la coagulation ne se seront pas fixés au clou plaquettaire. La méthode de Parry s'effectue en deux étapes⁽¹¹²⁾. La première étape consiste à mélanger cette fois-ci le plasma du

patient avec de la néoplastine. Après 1 minutes, on retire le caillot formé et on mélange ce qui reste avec du fibrinogène et on mesure le temps de coagulation. La deuxième étape se déroule sur sérum et se rapproche de la méthode de Nantes. L'objectif étant de faire un rapport du temps de coagulation sur plasma par rapport au temps de coagulation sur sérum. En cas d'anomalie d'exposition des phospholipides, celui-ci sera allongé.

Ces tests ont l'avantage d'être peu coûteux et réalisables dans n'importe quel centre. Ils restent néanmoins des tests de dépistage et peu reproductibles. En cas d'anomalie il ne faut surtout pas hésiter à les refaire, et les confirmer par cytométrie en flux.

Il existe également des tests dit « prothrombinases » qui consistent à étudier la capacité des cellules à transformer la prothromine en thrombine. Ces tests sont étroitement liés à la capacité d'exposition des phospholipides anioniques des cellules sur leur versant externe. La méthodologie sera abordée plus bas.

2^{ème} partie : travaux de recherche pour la caractérisation d'une thrombopathie familiale au CHRU de Tours

A. Présentation de la famille B/D

I. Présentation clinique

Nous suivons au centre régional de traitement de l'hémophilie (CRTH) de Tours une famille présentant une symptomatologie hémorragique sur 4 générations (figure 17).

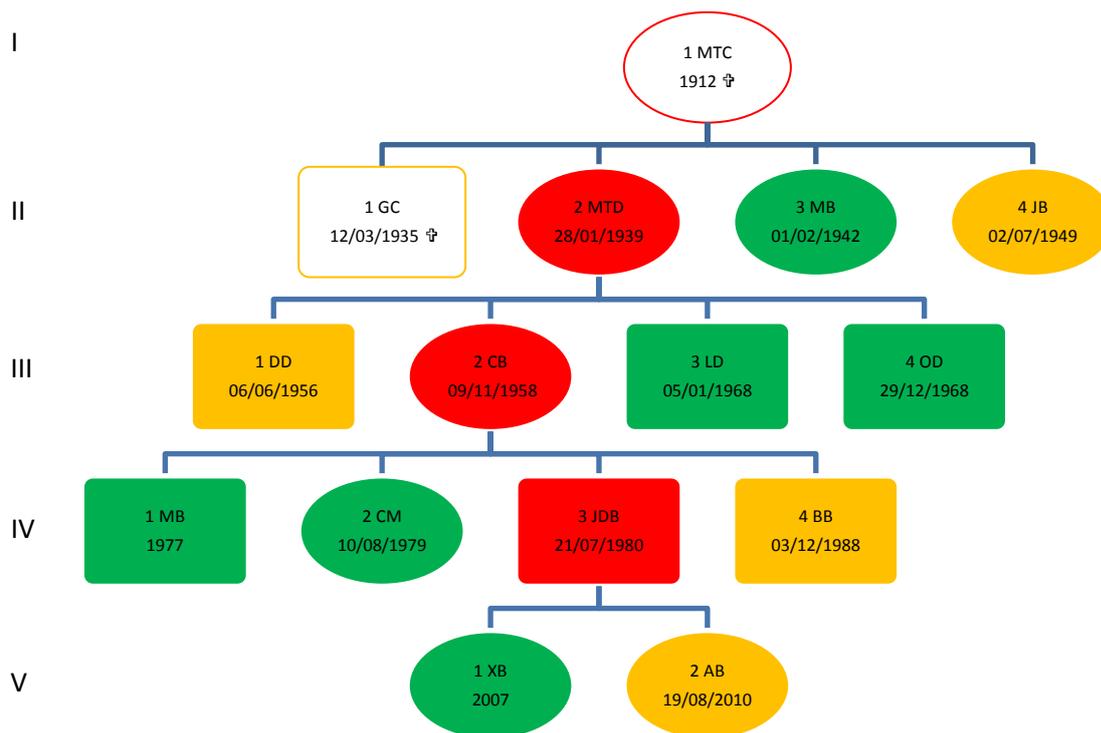


Figure 17 : Arbre généalogique de la famille étudiée. Les ronds représentent les femmes, les carrés les hommes. Les patients asymptomatiques sont représentés en vert, le jaune caractérise les patients ayant une symptomatologie hémorragique modérée et le rouge les patients très symptomatiques. Les formes non remplies sont pour les patients décédés.

Le *propositus*, CB III:2, une femme née en 1958, nous a été adressée pour la première fois en 1994 puisqu'elle présentait une symptomatologie hémorragique depuis

l'enfance. Cette symptomatologie était marquée par des ménorragies, des épistaxis répétés ainsi que des ecchymoses et parfois des hématomes pour des chocs minimes. Plusieurs opérations chirurgicales ont été très hémorragiques et ont nécessité des transfusions de culots globulaires. Des tonsillectomies ont nécessité une ré-hospitalisation à J8 et à J15 de l'opération en raison de complications hémorragique. Une cholécystectomie s'est compliquée d'un hématome de paroi, et des gingivorragies ont été observées 4 jours après des avulsions dentaires ayant nécessité la pose d'une mini gouttière de compression. De plus la patiente a subi une ligature des trompes de Fallope en raison de ménorragies importantes.

Cependant, la patiente a eu 4 enfants et les accouchements n'ont pas engendrés d'hémorragie du post partum.

A l'interrogatoire, le caractère familial de ces saignements apparaît comme une évidence puisque l'on retrouve des notions de saignements chez sa grand-mère maternelle, sa mère, un oncle et une tante maternelle, un de ses trois frères et deux de ses 4 enfants. Les saignements sont d'intensités variables d'un membre à l'autre de la famille et concernent aussi bien les garçons que les filles, laissant présumer une anomalie génétique de transmission autosomique dominante.

La mère du *propositus*, MTD II:2, présentait à l'époque une symptomatologie hémorragique marquée avec une facilité à faire des ecchymoses et des hématomes ainsi que des ménorragies invalidantes. Ces ménorragies ont par ailleurs nécessité plusieurs transfusions de culots globulaires, et finalement, une hystérectomie avec annexectomie qui a également dû être encadré par des transfusions. Cette patiente, a également subi plusieurs interventions chirurgicales de type appendicectomie, tonsillectomies, chirurgie des osselets de l'oreille ainsi que plusieurs avulsions dentaires. Toutes ces chirurgies se sont compliquées d'hémorragies importantes pour lesquelles des transfusions sanguines ont été nécessaires. Contrairement à sa fille, la patiente a eu 4 grossesses avec 4 accouchements par voie basse mais avec des hémorragies du post-partum après chaque accouchement. L'anesthésie péridurale n'a jamais été réalisée. MT patiente est actuellement âgée de 79 ans et s'avère être très peu symptomatique au quotidien.

La mère du *propositus* avait 1 grand frère GC II:1 (décédé il y a quelques années dans un contexte de cirrhose éthylique) qui a présentait des saignements importants après des extractions dentaires mais a eu une appendicectomie sans problème hémorragique. Ses neufs enfants ne manifestaient à l'époque aucune symptomatologie hémorragique. Monsieur GC a également deux petites sœurs dont une, MB, ne présente aucun problème de saignement tandis que JB rapportent des saignements lors de certaines opérations comme l'ablation d'une lésion du cuir chevelu ou la pose d'une chambre implantable lors d'un cancer du sein. Curieusement, d'autres opérations, comme une thyroïdectomie ou une hystérectomie se sont parfaitement déroulées. Madame JB signale par ailleurs présenter des ecchymoses et des hématomes pour des chocs minimes ainsi que des ménorragies. Ses trois enfants ne rapportent aucun problème de saignement.

Madame CB, III:2 a 3 frères, deux ne présentent aucune symptomatologie hémorragique (III:3 et III:4) (plusieurs chirurgies sans aucune complications), tandis que le troisième DD (III:1) semble avoir une discrète tendance au saignement. En effet, à l'époque il a été noté des saignements modérés lors des tonsillectomies et des avulsions dentaires avec quelques épisodes de gingivorragies. Aujourd'hui le se plaint que de rares gingivorragies dans un contexte de gingivite et rapporte plusieurs opérations chirurgicales sans complications post-opératoires.

Parmi les enfants de la patiente III:2, deux ne présentent aucune symptomatologie hémorragique (IV:1 et IV:2), tandis que les deux autres (IV:3 et IV:4) semblent avoir hérité du même problème que leur mère.

Le patient IV:3 (fils du *propositus*) a eu de nombreuses épistaxis pendant l'enfance pour lesquelles il a bénéficié d'une cautérisation à l'âge de 17 ans, à la suite de laquelle il ne présente plus de saignement à ce niveau-là. Il a subi plusieurs avulsions dentaires dont une s'est avérée être un peu plus hémorragique que les autres. A ce jour il se plaint essentiellement de saignements prolongés après des coupures, mais aussi d'ecchymoses pour des chocs minimes, rarement spontanés avec parfois des hématomes, ainsi que des gingivorragies spontanées pouvant durer plusieurs jours et survenant en moyenne une fois par semaine. Cet homme âgé de 38 ans a 2 filles dont une (V:2) présente une tendance à faire des ecchymoses et des hématomes facilement.

Le dernier membre de la famille, un homme de 29 ans, BB IV:4, fils du *propositus*, a été vu pour la dernière fois en 2006. A cette époque il rapportait quelques hématomes des membres inférieurs vers l'âge de 2 ans, des épistaxis dans l'enfance et une difficulté à cicatriser à la suite d'un accident de moto puis à un accident de karting. Ce patient a été opéré d'une hernie inguinale sans suite hémorragique.

II. Examens d'hémostase réalisés afin de caractériser la pathologie hémorragique de la famille B/D

1. Numération formule sanguine

Le sang total des patients a été collecté sur tube EDTA (BD Vacutainer®) et analysé par un automate UniCel DxH 800 (Beckman Coulter). Un des modules, le DxH 800 SMS, permet d'étaler le sang sur des lames et de les colorer au RAL, qui est une variante du MGG (May-Grünwald Giemsa).

2. Tests standards d'hémostase

Le temps de QUICK, TCA, fibrinogène, le dosage des facteurs de la coagulation VIII, IX, XI et le temps de thrombine sont réalisés sur plasma, collecté sur tubes citratés 0,109 M (BD Vacutainer®) et analysés par un automate STA R Max (Diagnostic Stago). Ces tests sont basés sur un principe de détection viscosimétrique (mécanique) de la formation du caillot. Le plasma est placé dans une petite cupule avec une bille et différents réactifs qui vont varier en fonction de l'analyse souhaitée. Le chronomètre se déclenche et s'arrête une fois la bille immobilisée par la formation du caillot. Le TCA est exprimé en ratio temps patient sur temps témoin, le fibrinogène et les facteurs VIII, IX et XI sont exprimés en pourcentage grâce à une droite d'étalonnage spécifique à chaque test et le temps de QUICK est exprimé en pourcentage grâce à la droite de Thivolle.

3. Facteur II résiduel

Le sérum des patients est obtenu sur tube sec (BD Vacutainer®). Après incubation pendant 4 heures à 37°C, le facteur II est dosé en gamme fine sur le STA R Max (Diagnostic Stago). Le résultat est considéré normal si le taux de facteur II résiduel est inférieur à 15%.

4. Indice de consommation de la prothrombine (ICP)

L'ICP a été réalisé comme décrit par Parry et al⁽¹¹²⁾ en 1979. Le sérum du patient a été obtenu sur tube sec (BD Vacutainer ®). Après 4 heures d'incubation à 37°C, 50 µl de sérum sont mélangés avec 100 µl de thromboplastine calcique. Après 60 secondes d'incubation, 25 µl de ce mélange sont ajoutés à 100 µl de fibrinogène (origine bovine, Hyphen Biomed à 4 g/l) puis le temps de coagulation est mesuré. Cette même procédure est répétée avec le plasma du patient prélevé sur tube citrate 0,109 M (BD Vacutainer ®). 75 µl de plasma sont incubés avec 100 µl de thromboplastine, après 60 secondes le caillot formé est retiré. Par la suite, 25 µl du mélange restant sont additionnés à 100 µl de fibrinogène (origine bovine, Hyphen Biomed à 4 g/l) et le temps de coagulation est mesuré.

Les résultats sont rendus par le ratio du temps plasma sur le temps sérum multiplié par 100. Ils sont considérés normaux si le ratio est inférieur à 20%.

5. Test d'exposition des phospholipides dit « prothrombinase »

Le sang des patients a été collecté sur tubes ACD (BD Vacutainer). Les globules rouges des patients sont incubés avec du facteur Xa, Va et de la prothrombine. Les globules rouges seront soit non stimulés, soit stimulés par des concentrations croissantes de ionophore calcique A23187 (2, 5 ou 10 µM) en présence de 2 mM ou 10 mM de CaCl₂. Les stimulations effectuées en milieu calcique 2 mM et 10 mM ont eu pour but de mettre en évidence une quelconque anomalie de sensibilité au calcium ou de flux calcique chez ces patients lors de l'activation par l'ionophore. L'activité prothrombinase est ensuite mesurée par le biais d'un substrat chromogène calculé par son absorbance à 405 nm.

Ainsi, l'importance du déficit d'exposition des phospholipides est étroitement liée à la quantité de prothrombine résiduelle. Les tests ont été réalisés sur les globules rouges et sur les microparticules émises dans le surnageant obtenu par centrifugation à 12000*g.

6. Tests fonctionnels d'agrégation plaquettaire sur du plasma riche en plaquettes (PRP)

Le sang total est prélevé sur tubes citratés 0,109 M (BD Vacutainer®) et le PRP est obtenu après une centrifugation à 200 g pendant 10 minutes. Les plaquettes sont numérotées sur l'automate UniCel DxH 800 (Beckman Coulter). Les tests fonctionnels sont réalisés sur un Chronolog® 700 (Chronolog 700 corporation, Etats-Unis).

Le PRP est laissé au repos pendant 30 minutes puis 200 µL de PRP sont déposés dans des cuvettes à usage unique en verre (Chronolog corporation) placées dans une chambre thermostatée à 37°C. Par la suite, différents agonistes sont ajoutés: 10,4 µl d'adrénaline (Helena Biosciences europe) à 125 µM pour une concentration finale à 5 µM, 10,4 µl d'ADP Elitech (Helena Biosciences europe) à 62,5 µM pour une concentration finale à 2,5 µM, 28 µl d'acide arachidonique Elitech (Helena Biosciences europe) à 15 mM pour une concentration finale à 1,5 mM, du collagène Horm (Takeda Austria) dilué de façon extemporanée au huitième dans du tampon SKF (Takeda austria) pour obtenir une solution mère à 125 µg/ml, 30 µl de cette solution est diluée dans 45 µl de sérum physiologique, puis 10,4 µl est distribué pour obtenir une concentration finale à 2 µg/mL, 10,4 µl de U46619 (VWR international) à 25 µM pour une concentration finale à 1 µM ou enfin 28 µl de ristocétine (Helena Biosciences europe) à 15 mg/ml pour une concentration finale dans la cuve à 1,5 mg/ml. L'agrégation plaquettaire est ensuite mesurée par transmission lumineuse à travers la cuvette en verre. Lorsque toutes les plaquettes agrègent entre elles, celles-ci tombent dans le fond de la cuvette et la transmission du faisceau lumineux est maximale. En l'absence d'agrégation, les plaquettes restent en suspension et la transmission lumineuse se fait moins bien. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'agrégation maximale après au moins 6 minutes d'incubation du PRP avec l'agoniste. Les plaquettes d'un sujet sain sont

systématiquement analysées en parallèle, permettant ainsi de valider la bonne réalisation de la technique.

7. Etude de la libération d'ATP par les granules denses plaquettaire

La libération d'ATP a été étudiée sur un Chronolog® 700 (Chronolog Corporation, Etats-Unis) par un principe de chimiluminescence grâce au complexe luciférine/luciférase. Lorsque ces deux protéines se rencontrent, elles s'associent en un complexe qui catalyse la réaction d'oxydation de la luciférine. Cette oxydation fait passer la luciférine d'un état stable à un état électroniquement instable. En retournant à son état stable, la luciférine émet un photon produisant ainsi de la lumière. Cette réaction chimique ne peut se faire sans la présence d'ATP. (Figure 18)

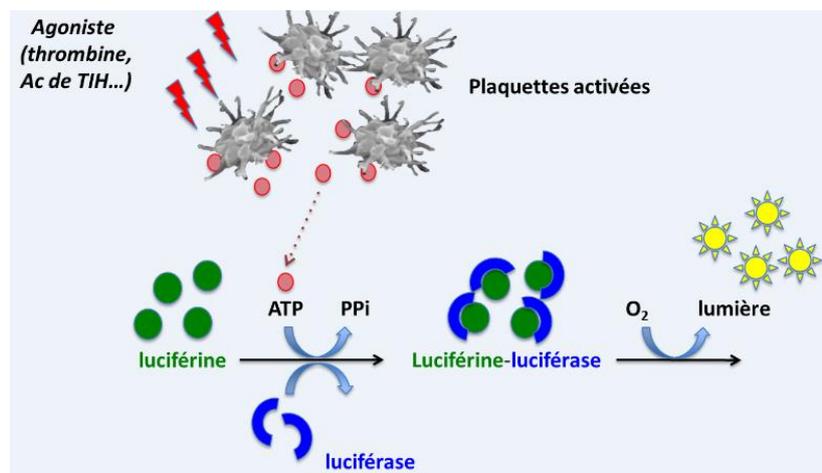


Figure 18 : Schéma traduisant le principe de chimiluminescence permettant d'étudier la libération d'ATP par les plaquettes grâce au complexe luciférine/luciférase.

Après 30 minutes au repos, 390 μ L de PRP sont déposés dans des cuvettes à usage unique en verre placées dans une chambre thermostatée à 37°C auxquels on y ajoute 10 μ L d'une solution comportant l'association luciférine/luciférase (Chrono-Lume®, Chronolog Corporation, Etats-Unis) qu'on laisse incuber pendant 3 minutes. Par la suite, on ajoute un agoniste plaquettaire : 16,64 μ L d'ADP Elitech (Helena Biosciences europe) 125 μ M pour une concentration finale à 5 μ M, 16,64 μ L de Collagène Horm (Takeda

Austria) à 125 µg/ml pour une concentration finale de 5 µg/ml, 40 µl d'acide arachidonique Elitech (Helena Biosciences europe) à 16,5 mM pour une concentration finale à 1,5 mM, 16,64 µl de U46619 (VWR international) à 25 µM pour une concentration finale à 1 µM, 16,64 µl d'adrénaline (Helena Biosciences europe) à 125 µM pour une concentration finale à 5 µM ou bien 10 µl de TRAP (Agro-Bio). A 500 µM pour une concentration finale dans la cuvette à 12 µM Les résultats sont interprétés grâce au logiciel Aggro/Link8 (Chronolog Corporation, Etats-Unis) après au moins 6 minutes d'incubation du PRP avec l'agoniste. Les plaquettes d'un sujet sain sont systématiquement analysées en parallèle, permettant ainsi de valider la bonne réalisation de la technique.

8. Etude des glycoprotéines et de la fixation d'annexine V par cytométrie en flux (CMF)

L'étude des glycoprotéines plaquettaires et la fixation de l'annexine V aux phosphatidylsérines plaquettaires ont été étudiées sur PRP prélevé sur tube citraté 0,109 M (BD Vacutainer ®) et centrifugés à 200 g pendant 10 minutes. Le cytomètre utilisé est un BD Accuri C6 Plus (BD Biosciences Europe).

Pour l'étude des **glycoprotéines plaquettaires**, 10 µl de PRP dilué à une concentration de plaquettes de 25 G/L sont mélangés avec 80 µL de tampon (composé de 8g de NaCl 137 mM, 0,2g de KCl 2mM, 1g de NaHCO₃ 12 mM, 0,041g de NaH₂PO₄, H₂O 0,3 mM, 0,43g de CaCl₂, 2 H₂O 2,9 mM, 0,203g de MgCl₂, 6 H₂O 1 mM, 1g de glucose 5,5 mM, de l'eau distillé pour un volume final de 1 litre tout en ajustant le PH à 7,35 avec de l'acide chlorhydrique concentré HCl, 3N) et 2 µL des anticorps à tester (CD42b BD Pharmingen, CD62P BD Pharmingen, CD41a BD Pharmingen). Trois conditions sont réalisées, la première se fait sur plaquettes au repos, la deuxième après activation par 10 µl de TRAP (Agro-Bio) à 500 µM pour une concentration finale à 50 µM et la troisième par de 5 µl d'ADP Elitech (Helena Biosciences europe) à 200 µM pour une concentration finale à 10 µM. Un contrôle est systématiquement effectué en mélangeant le PRP avec des isotypes contrôles (BD Pharmingen) permettant d'éliminer le bruit de fond. Le mélange est

ensuite incubé 30 minutes dans le noir puis la réaction est stoppée par ajout de 500 μL de tampon.

Pour l'étude de la **fixation de l'annexine V** aux phosphatidylsérines plaquettaires, 70 μL de PRP dilué à 50 G/L sont incubés pendant 10 minutes à 37°C en solution tamponné (Tampon Annexin V Binding Buffer 10X, BD Pharmingen) avec soit du sérum physiologique, soit du ionophore calcique A23187 50 μM (Sigma) soit du ionophore calcique A23187 100 μM (Sigma). 5 μL de chaque mélange est ensuite prélevé auxquels on additionne 1 μL d'annexine V FITC (BD Pharmingen), 2 μL de CD41a PerCP Cy5 (BD Pharmingen) et 30 μL du même tampon. Le tout est laissé sur un agitateur à température ambiante et à l'abri de la lumière pendant 15 minutes. La réaction est ensuite stoppée par l'ajout de 600 μL de tampon. La préparation peut ensuite être analysée par l'automate.

B. Résultats

I. Analyse des résultats biologique obtenus dans les années 1990

Nos patients ont été vus en consultation pour la première fois au début des années 90. Les premiers tests d'hémostase ont éliminé une hémophilie A ou B ainsi qu'une maladie de Willebrand. (Tableau IV).

Tableau IV : Résultats des tests standards d'hémostase pratiqués sur la famille dans les années 90.

Analyse (norme)	2 ^{ème} génération			3 ^{ème} génération		4 ^{ème} génération		
	II:1	II:2	II:4	III:1	III:2	IV:2	IV:3	IV:4
TP % (70 – 100)	77	100	99	91	91	100	91	95
TCA ratio (<1,2)	1,41	1,36		1,18	1,27	1,15	1,42	1,26
TCK ratio (<1,20)	1,03	1,23	1	1,13	1,2	1,11	1,35	1,25
Fg g/L (2 – 4)	3,09	3,91	3,23	2,86	3,73	4,01	3,16	3,23
FVIII % (50 – 150)		80		116	110	116	106	124
FIX% (50 – 150)		140		156	140	140	97	108
FXI % (70 – 150)		164		100	80	96	66	82
FXII % (50-150)		87		128	128	106	97	68
TT		T24/M25		T24/M27	T24/M23	T24/M24	T24/M25	T24/M25
TR		T20/M20			T20/M13	T20/M16	T20/M15	T20/M16
RCo % (50 – 150)	220	56<M<70		84<M<91	49<M<56	49<M<56	56<M<70	84<M<91
TS IVY min (<10)		3		3	8	6		3
Plt G/L (150 – 400)	105	172	205	153	305	280	264	337

Les patients en rouge sont ceux ayant une symptomatologie hémorragique importante, modéré en orange et les patients asymptomatiques en vert. Les normes du TCA et du TCK varient chez les enfants, pour IV :4, au moment du prélèvement le seuil supérieur était de 1,3 en ratio temps patient sur temps témoin. Fg : Fibrinogène ; TT : Temps de thrombine ; TR : Temps de reptilase ; RCO : Activité cofacteur de la ristocétine ; TS : Temps de saignement méthode IVY ; Plt : Plaquettes ; T : Témoin ; M : Malade.

On remarque chez certains patients un allongement du TCA ratio et du TCK ratio. Devant la normalité des facteurs VIII, IX, XI et XII, il est probable que cet allongement soit dû à un déficit en facteur de la phase contact qui, dans ce contexte, nous importe peu puisqu'un déficit en ces facteurs n'entraîne jamais de symptomatologie hémorragique. L'autre hypothèse est qu'il existe un anticoagulant circulant qui perturbe de façon artéfactuelle ce test d'hémostase.

Par ailleurs, la normalité du fibrinogène, du temps de thrombine et du temps de reptilase sont en défaveur d'une dysfibrinogénémie. Enfin, les numérations plaquettaires normales chez la quasi-totalité des membres de la famille permettent d'éliminer une thrombopénie familiale constitutionnelle. Seul monsieur GC (II:1) présente une thrombopénie modérée et dans un contexte de cirrhose éthylique.

Devant la normalité des examens de première intention et la symptomatologie hémorragique évidente chez ces patients, des examens de deuxième intention ont été réalisés.

Nous avons ainsi dosé le facteur XIII et l'alpha-2 antiplasmine mais aucun déficit n'a été mis en évidence.

A l'époque et compte tenu des résultats normaux des temps de saignement par méthode IVY incision, les tests fonctionnels plaquettaires par agrégométrie n'ont pas été réalisés.

Devant la normalité de ces examens biologiques de première intention un trouble d'exposition des phospholipides anioniques à la surface des plaquettes a été envisagé. Dans le but d'explorer ce trouble, trois examens ont été réalisés au CHU de Tours. Le dosage du facteur II résiduel dans le sérum ainsi que des tests de consommation de la prothrombine en méthode classique sur sérum et en méthode Parry (Tableau V). Les résultats de ces examens sont très variables d'un patient à l'autre mais on note tout de même que presque tous présentent un indice de consommation de la prothrombine en méthode de Parry perturbé et cela indépendamment de l'intensité des symptômes du patient.

Tableau V : Résultats des facteurs II résiduels et de consommation de la prothrombine pratiqués sur cette famille dans les années 90.

Analyses	Normes	II:1	II:2	II:3	II:4	III:1	III:2	III:3	IV:2	IV:3	IV:4
FII résiduel (%)	<15	12	11	18	16	7	7	6	6	5	3
Conso (sec)	>25	29	26	19	17	41	29	49			
ICP Parry (%)	<20		47			19	25		26	51	66

Les patients en rouge sont ceux ayant une symptomatologie hémorragique importante, modéré en orange et les patients asymptomatiques en vert. ICP : Indice de consommation de la prothrombine en méthode de Parry ; Conso : Consommation de la prothrombine en méthode classique.

L'indice de consommation de la prothrombine (ICP) est une technique manuelle non automatisée, et donc source d'erreur. Les tests ont donc été contrôlés chez les patients MTD II:2, CB III:2 et JDB IV:3. Et les résultats précédemment obtenus ont été confirmés. Ces premiers résultats nous ont fait suspecter la présence d'un syndrome de Scott familial.

Afin d'explorer cette piste, une analyse spécifique d'exposition des phospholipides par cytométrie en flux associée à l'étude de l'activité « prothrombinase » des globules rouges ont été réalisés chez les patients II:2, III:1 et III:2 au CHU de Strasbourg. Ces examens ont pu être réalisés sur les globules rouges puisque ces cellules portent la même anomalie de translocation des phospholipides que les plaquettes. En effet, l'instabilité des plaquettes après le prélèvement entraîne une activation des cellules et empêche toute analyse fonctionnelle.

L'étude de la fixation de l'annexine V à la surface des globules rouges met en évidence une diminution d'exposition des phospholipides anioniques, avant et après stimulation par l'ionophore calcique. En parallèle, nos collègues strasbourgeois n'ont pas mis en évidence d'anomalie d'émission de microparticules par les globules rouges après activation par l'ionophore calcique (Tableau VI).

Tableau VI : Estimation de la vésiculation des érythrocytes par cytométrie en flux.

Pourcentage de microparticules émises par les Erythrocytes				
Calcium 2 mM	Témoin	II:2	III:2	III:1
Non activées	2,46	2,43	2,71	2,23
A23187 2 μ M	13,36	18,91	5,46	12,01
A23187 5 μ M	12,6	7,7	4,61	6,84

Pourcentage de microparticules émises par les Erythrocytes				
Calcium 10 mM	Témoin	II:2	III:2	III:1
Non activées	2,61	3,35	2,77	2,4
A23187 2 μ M	19,96	17,64	19,89	19,09
A23187 5 μ M	8,85	9,1	6,92	9,83

Ces explorations ont été complétées par des tests dits « prothrombinases » dans lesquels on observe que les globules rouges du *propositus* (III:2) et de sa mère (II:2) présentent une activité prothrombinase nettement diminuée par rapport à celle du témoin lorsque les GR sont incubés en milieu calcique 2mM et en présence de ionophore à une concentration de 2 μ M (figure 19). Lorsque l'on augmente la concentration calcique du milieu (10 mM), cette activité prothrombinase augmente mais reste inférieure à celle du témoin. Concernant le frère du *propositus*, monsieur DD (III:1), moins symptomatique que sa sœur et sa mère, cette activité prothrombinase est également diminuée à la faible

concentration calcique mais qui se corrige lorsqu'on augmente la concentration calcique à 10 mM.

Ces tests « prothrombinases » ont également été réalisés sur les microparticules émises par les globules rouges et une très nette diminution de cette activité a également été mise en évidence chez ces trois patients.

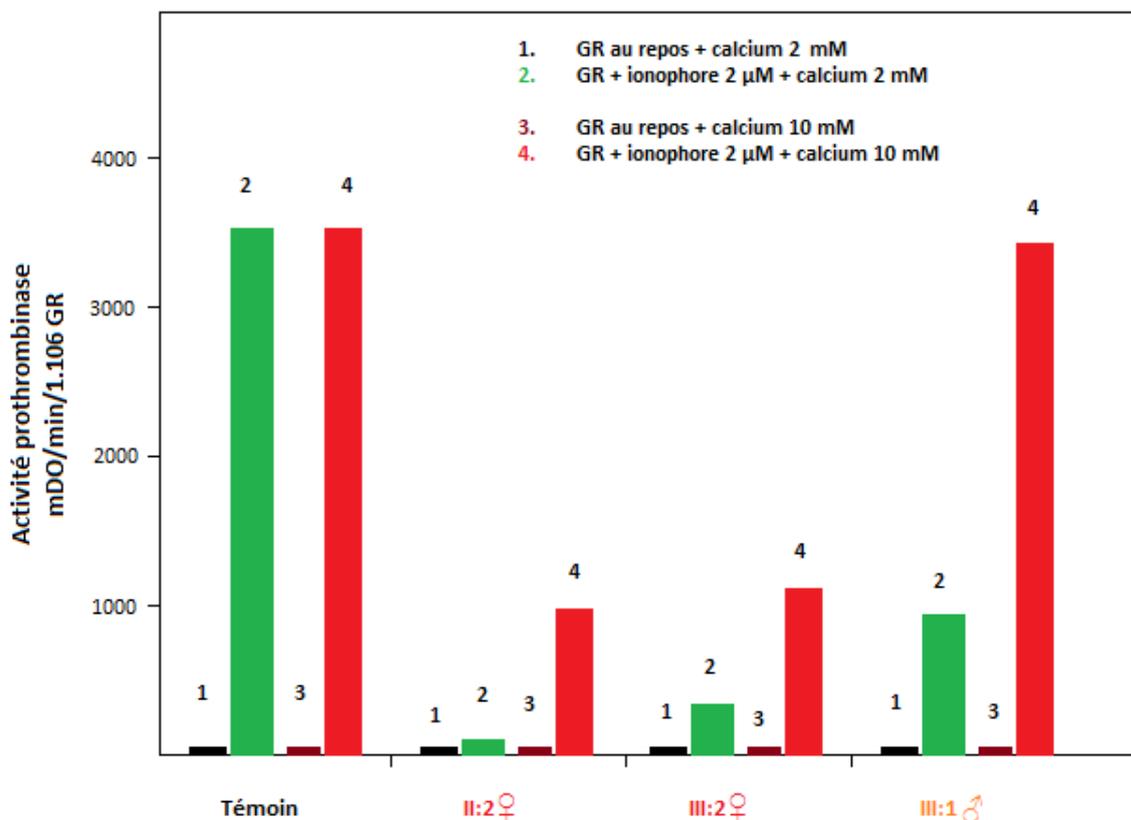


Figure 19 : Exposition des phosphatidylsérines par les érythrocytes après stimulation par l'ionophore A23187 en milieu calcique 2 mM et 10 mM. GR : Globules rouges

A l'époque, ces résultats font évoquer un défaut d'exposition des phospholipides plaquettaires. Cependant, l'intégralité des résultats ne coïncident pas totalement avec le syndrome de Scott puisque les globules rouges sont capables d'émettre des microparticules en quantité comparable au témoin sain (Tableau VI). Cependant, ces microparticules ne sont pas coagulantes.

II. 15 ans après

En 2009, le patient IV:3 est revu dans le service afin d'établir un protocole hémostatique en prévision d'une opération d'une capsulite rétractile. Sur le plan clinique, le patient a bénéficié d'une cautérisation nasale qui a permis de tarir ses épistaxis, cependant, il se plaint toujours de gingivorragies régulières associées à des ecchymoses et des hématomes pour des chocs minimes. Depuis les années 2000, la fiabilité du temps de saignement en méthode IVY incision est largement discutée et l'étude des fonctions plaquettaires est alors réalisée indépendamment des résultats normaux de ce test réalisé en 1994.

Les plaquettes du patient ont été testées en présence de plusieurs agonistes de l'agrégation plaquettaire dont l'ADP aux concentrations de 0,5 μM , 1 μM , 2,5 μM et 5 μM , l'acide arachidonique 1 mM et 1,5 mM, le collagène 2 $\mu\text{g/ml}$ et 5 $\mu\text{g/ml}$, l'adrénaline 1 μM , 2,5 μM et 5 μM , le TRAP 6,25 μM et 12,5 μM ainsi que l'U46619 0,5 μM , 1 μM , 1,5 μM et 2 μM .

Comme le montre la figure, nous observons une absence d'agrégation plaquettaire en présence d'acide arachidonique à 1,5 mM et d'U46619 à 1 μM ainsi qu'une hypoagrégabilité réversible en réponse à l'ADP 2,5 μM mais qui se normalise à la concentration de 5 μM , et une hypoagrégabilité en réponse au collagène 5 $\mu\text{g/ml}$ (Figure 20).

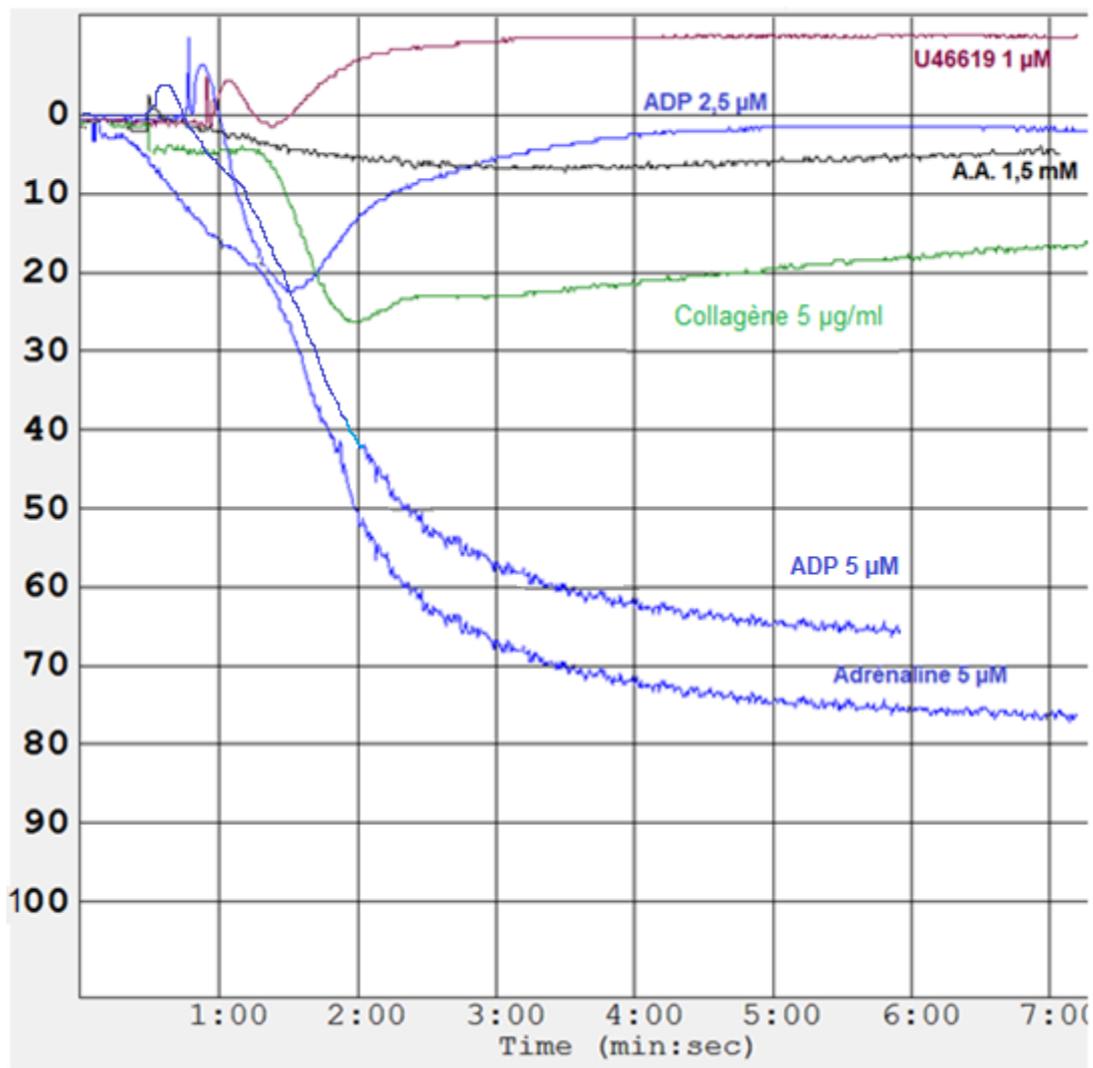


Figure 20 Exploration des fonctions plaquettaires chez IV:3. Le témoin du jour est normal. On remarque l'absence d'aggrégation en réponse à l'analogie du thromboxane A₂ (U46619) et à l'acide arachidonique (A.A.) ainsi qu'une hypoaggrégabilité en réponse à l'ADP 2,5 µM et au collagène 2 µg/ml. Les réponses à l'adrénaline 5 µM et à l'ADP 5 µM sont normales.

La découverte d'une thrombopathie chez ce patient nous a conduit à reprendre les dossiers de cette famille et envisager l'existence d'une thrombopathie associée à un trouble d'exposition des phospholipides.

Pour ce patient il a été proposé d'encadrer le geste chirurgical par la perfusion de concentrés plaquettaires et de revoir tous les membres de la famille en consultation.

III. Analyse des résultats biologiques réalisés en 2018

En 2018, dans le cadre de mon travail de thèse nous avons reconvoqué tous les patients de la famille B/D afin de compléter le bilan réalisé dans les années 1990 et 2009 et avons effectué une exploration des fonctions plaquettaires chez le maximum de patients.

Pour des raisons de disponibilité, tous les membres n'ont pu être revus. Le patient II:1 est décédé de cause inconnue, la patiente II:3 a quitté la région Centre, et les enfants du *propositus* IV:1, IV:2 et IV:4 ne pouvaient se libérer pour venir à l'hôpital.

Lors de la consultation nous avons évalué la symptomatologie hémorragique avec le score de Tosetto (Tableau VII).

Tableau VII : Score de Tosetto calculé en 2018

	II:2	II:4	III:1	III:2	III:3	III:4	IV:3	V:1
Tosetto 2018	16	7	1	14	0	0	10	4

En plus des analyses réalisées dans les années 1990 que nous avons contrôlées, nous avons réalisé une étude approfondie des fonctions plaquettaires avec :

- L'étude des fonctions plaquettaires par agrégométrie
- L'étude de la libération d'ATP par les granules denses
- L'étude des glycoprotéines plaquettaires
- L'étude de la fixation de l'annexine V par cytométrie en flux

Nous avons également congelé de l'ADN afin de pouvoir effectuer avec le centre de référence des pathologies plaquettaires de Marseille une étude génétique sur des gènes candidats.

Les résultats standards d'exploration de l'hémostase réalisés en 2017 sont présentés dans le Tableau VIII. L'allongement du TCA présent dans les années 1990 est de nouveau retrouvé, non associé à un déficit en facteur VIII, IX ou XI.

Tableau VIII : résultats des tests standards d'hémostase réalisés en 2018.

Analyses	2ème génération		3ème génération				4ème	5ème
	II:2	II:4	III:1	III:2	III:3	III:4	IV:3	V:1
TP %	89	65	98	92	98	87	100	74
TCK ratio	1,32	1,04	1,11	1,28	1,07	1,21	1,23	1,17
TCA ratio	1,81			1,26		1,29	1,27	
Fg g/L	4,83	5,04	3,85	3,04	3,03	2,45	2,78	2,96
TT sec	T16/M16,7		T16,5/M16,6				T16/M17	T16/M16,2
FVIII %	125			79		83	92	
FIX %	126			115		72	111	
FXI %	113			106		94	101	

TP : Taux de prothrombine ; Fg : fibrinogène ; TT : temps de thrombine exprimé en temps témoin/temps malade. Les chiffres en rouges sont les résultats pathologiques.

L'étude de l'exposition des PL plaquettaires réalisée par des tests de coagulation montre une consommation de prothrombine normale avec des résultats supérieurs à 25%. En dehors du jeune patient V:1, tous les patients étudiés présentent un ICP selon la méthode de Parry anormal avec des résultats très nettement supérieurs à 20%. Ce test n'a pas été réalisé chez les patients III:3 en raison d'une prise régulière d'aspirine. Les résultats du FII résiduels sont anormaux chez seulement 3 patients et de façon non corrélée à la symptomatologie hémorragique (Tableau IX).

Tableau IX : Résultats du facteur II résiduel et des consommations de la prothrombine en méthode classique et de PARRY réalisés en 2018.

Analyses	Normes	II:2	II:IV	III:1	III:2	III:3	III:4	IV:3	V:1
FII résiduel (%)	<15	5	10	18	26	12	10	17	2
Conso (sec)	>25	35	35	31	34	30	40	32	100
ICP (%)	<20	44	30	61	49		47	52	13

Conso : consommation de la prothrombine en méthode classique ; ICP : indice de consommation de la prothrombine en méthode de PARRY

Ces résultats obtenus par méthode coagulante ont été complétés par l'étude de la fixation de l'annexine V à la surface des phospholipides anioniques plaquettaires en milieu riche en plaquettes (Figures 21). Comme représenté sur la figure 24, nous

observons une expression normale de la fixation de l'annexine V sur les plaquettes de tous les membres étudiés lorsque les plaquettes sont stimulées avec une forte concentration de ionophore calcique (100 μM). A une plus faible concentration de ionophore (50 μM) seules les plaquettes des patients II:2 et IV:3 ne fixent pas l'annexine V. Ces deux patients présentent une symptomatologie hémorragique franche.



Figure 21 : Résultats de la fixation de l'annexine V à la surface des phospholipides plaquettaires

L'étude de l'expression des glycoprotéines plaquettaires GPIIb/IIIa et GPIb a été systématiquement réalisée et nous n'avons pas objectivé de déficit sur les plaquettes au repos ou après stimulation par de l'ADP 10 μM ou le TRAP 50 μM . L'étude de la fixation du CD62P (anticorps dirigé contre la P-Sélectine) sur des plaquettes activées par de l'ADP 10 μM et du TRAP 50 μM est également normale, ce qui est en défaveur d'une anomalie de sécrétion des granules α (Figure 22).

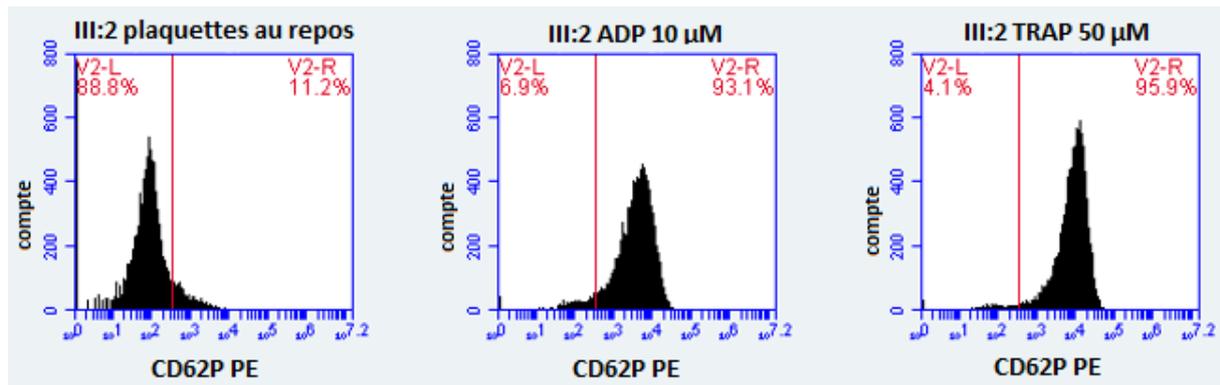


Figure 22 : Résultats de la fixation du CD62P chez la mère du propositus. Sur les plaquettes au repos, l'anticorps ne peut s'y fixer car la P-Sélectine se situe sur la membrane des granules α . Lorsque les plaquettes s'activent, la membrane des granules α fusionne avec la membrane plaquettaire, permettant ainsi à l'anticorps de s'y fixer.

Nous avons parallèlement réalisé des tests d'agrégation plaquettaire à la recherche d'une éventuelle thrombopathie familiale. (Tableau 11).

Les profils d'agrégation plaquettaires sur PRP sont très variables d'un patient à l'autre.

On retrouve chez **les plaquettes du propositus madame CB (III:2)** une absence totale d'agrégation en présence du U46619 1 μ M, ainsi qu'une hypoagrégabilité réversible en réponse à l'ADP 5 μ M et une hypoagrégabilité en réponse l'adrénaline 5 μ M. L'agrégation est normale en présence d'acide arachidonique (Figure 23).

Madame MTC II:2 ne présente qu'une hypoagrégabilité à l'acide arachidonique 1,5 mM.

Madame JB II:4 présente uniquement une agrégabilité réversible en réponse à l'ADP 5 μ M, contrôlé à deux reprises.

Monsieur DD III:1, présente uniquement une hypoagrégabilité à l'adrénaline 5 μ M.

Chez monsieur OD III:4, bien qu'asymptomatique, on observe l'absence d'agrégation en réponse à l'adrénaline 5 μ M associée à une hypoagrégabilité réversible en réponse à l'ADP 2,5 μ M qui se corrige lorsque l'on augmente la concentration d'ADP à 5 μ M.

Chez monsieur JDB IV:3, on retrouve un profil similaire à celui de sa mère à la différence que ses plaquettes n'agrègent pas en présence d'acide arachidonique 1,5 mM.

Enfin, **la jeune patiente AB V:2**, fille de IV :3, présente un profil intermédiaire avec l'absence d'agrégation en réponse à l'acide arachidonique 1,5 mM associée à une agrégation réversible en réponse à l'ADP 2,5 μ M et une hypoagrégabilité en réponse à l'adrénaline 5 μ M et au collagène 2 μ g/ml. Contrairement à son père et sa grand-mère, l'agrégation en réponse au U46619 est chez elle normale.

La synthèse de ces résultats est présentée dans le tableau X.

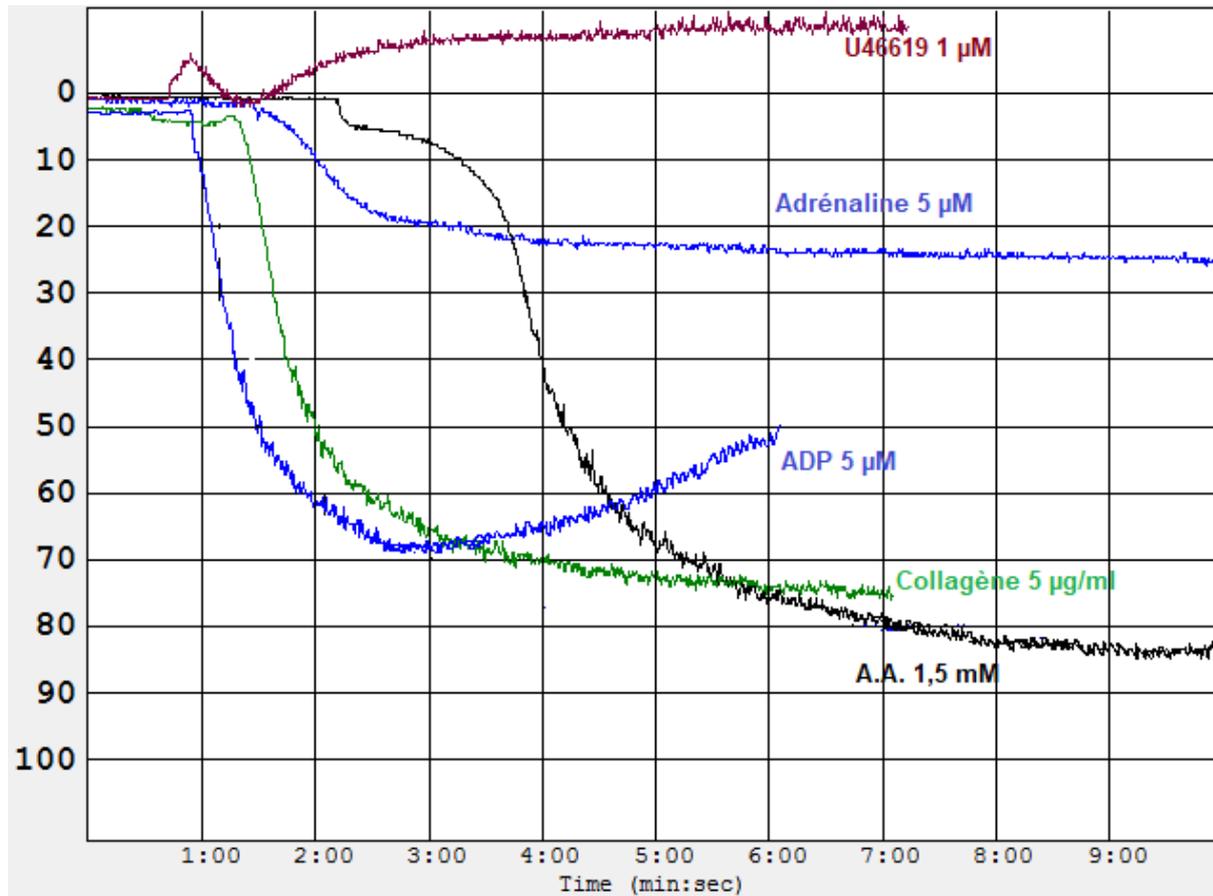


Figure 23 : Résultats d'agrégométrie de madame CB III :2. Les plaquettes de la patiente n'agrègent pas en réponse au U46619 1 µM (analogue du thromboxane A2) et à l'adrénaline 5 µM. On observe une agrégation réversible en réponse à l'ADP 5 µM tandis que l'agrégation est normale en réponse au collagène 5 µg/ml et à l'acide arachidonique (A.A.) 1,5 mM. Témoin du jour normal

Tableau X : Résultats des tests fonctionnels d'agrégation plaquettaire, de la numération plaquettaire et du frottis sanguin.

Agoniste	II:2	II:4	III:1	III:2	III:4	IV:3	V:1
AA 1,5 mM	Hypoagrégabilité	N	N	N	Augmentation du temps de latence	Absence d'agrégation	Absence d'agrégation
ADP 2,5 µM	N	Agrégation réversible	N	Agrégation réversible	Hypoagrégabilité réversible	Hypoagrégabilité réversible	Réversible
ADP 5 µM	N	Agrégation réversible	N	Agrégation réversible	N	NR	NR
Adr 5 µM	N	N	Hypoagrégabilité	Hypoagrégabilité	Absence d'agrégation	Hypoagrégabilité	Hypoagrégabilité
Col 2 µg/mL	N	N	N	N	N	N	Hypoagrégabilité
Col 5 µg/mL	N	NR	N	N	N	NR	NR
U46619 1 µM	N	N	N	Absence d'agrégation	N	Absence d'agrégation	N
TRAP 12,5 µM	N	NR	N	N	N	NR	NR
Risto 1,5 mg/ml	N	N	N	N	N	N	N
Plaquettes G/L	213	153	127	206	159	174	300
Frottis	RAS	2 % de macroplaquettes	2 % de macroplaquettes	3 % de macroplaquettes	2 % de macroplaquettes	RAS	RAS

AA : Acide arachidonique ; Epi : Epinéphrine ; Col : Collagène, Risto : Ristocétine, N : Agrégation normale ; NR : Non réalisé

Finalement, chaque patient présente un profil d'agrégation différent, sans réelle corrélation avec le phénotype clinique.

Nous avons également étudié la fonction sécrétoire des granules denses plaquettaires par l'étude de la libération d'ATP en lumiagrégométrie (Tableau XI).

Tous les résultats sont interprétés en fonction de ceux d'un donneur sain prélevé le même jour.

On observe que **madame MTC II:2** présente une anomalie de libération de l'ATP en réponse à l'ADP 5 µM et l'adrénaline 5 µM.

Monsieur DD III:1 en réponse à l'ADP 5 µM, le U46619 1 µM, le collagène 5 µg/ml et la thrombine 1 UI.

Le propositus madame CB III:2 présente une anomalie de libération de l'ATP en réponse à l'ADP 5 µM et le U46619 1 µM.

Monsieur OD III:4, asymptomatique, est le seul à avoir un profil de libération d'ATP tout à fait normal.

Avec ces résultats, on observe une meilleure corrélation clinico-biologique qu'avec les résultats biologiques précédents puisque seuls les patients symptomatiques présentent une libération d'ATP diminuée en réponse à plusieurs agonistes plaquettaires.

Tableau XI Résultats des tests fonctionnels de libération d'ATP par les granules denses.

Agonistes	Normes	T	II:2 ♀	T	III:1 ♂	III:2 ♀	T	III:4 ♂
AA 1,5 mM	0,46 - 1,7						0,76	0,72
ADP 5 µM	1 - 2,84	1,53	0,2	0,93	0,15	0,2	1,42	2,2
EPI 5 µM	1,21 - 2,97	1,38	0,2				1,33	1,22
Coll 5µg/mL	1,56 - 3,37	2,14	2,67	2,22	0,68	2,2	2,53	1,78
U46619 1µM	0,82 - 2,28	1,17	0,86	4,13	0,2	0,34	0,72	1,11
Thrombine 1 UI	1,01 - 3,25	1,07	1,1	1,78	0,53	3,09	1,89	1,47
TRAP 12,5 µM	0,99 - 3,58	1,6	1,83				1,6	0,23

Les valeurs en rouge correspondent aux valeurs pathologiques. AA : Acide arachidonique ; EPI : épinéphrine ; Coll : collagène ; T : témoin du jour.

C. Discussion

Le cas de cette famille illustre parfaitement la complexité et la difficulté à porter un diagnostic tant la physiopathologie des plaquettes peut parfois être difficile à comprendre.

Lorsque l'on regarde de plus près tous les mécanismes physiologiques impliqués dans l'hémostase primaire et que l'on admet que chaque voie, chaque enzyme, chaque protéine, si elle est modifiée, peut perturber le processus général d'hémostase, cela laisse imaginer un nombre quasiment infini de thrombopathies.

Le diagnostic du syndrome de Scott est de réalisation compliquée du fait de sa rareté et du manque de standardisation des tests réalisés. A cet égard, il n'existe aucune évaluation externe de qualité relative à ce diagnostic. A ce jour, le diagnostic d'un syndrome de Scott repose sur la réalisation de tests simples comme le dosage du facteur II résiduel dans le sérum et l'indice de consommation de la prothrombine⁽¹¹²⁾. Cependant, ces tests sont insuffisants pour confirmer avec certitude le diagnostic. Des tests de cytométrie en flux doivent être effectués devant des premiers résultats anormaux afin d'évaluer le degré d'exposition des phospholipides anioniques à la surface des plaquettes⁽¹⁰⁸⁾. Cependant, compte tenu de la faible prévalence de ce syndrome, il est difficile d'établir un seuil à partir duquel on doit évoquer cette pathologie. Depuis quelques années, les bases moléculaires du syndrome de Scott ont été appuyées par la découverte de diverses mutations situées sur le gène ANO6^(38,113,114) du bras long du chromosome 12, gène codant pour la translocase responsable du flip-flop des phospholipides membranaires. Depuis cette découverte, quelques laboratoires recherchent cette mutation. Mais il s'agit d'une technique longue et coûteuse, dont la réalisation ne se fait que dans de très rare cas.

Concernant notre famille, les membres ont longtemps été « étiquetés » comme ayant un syndrome de Scott, et cela, du fait des indices de consommation de la prothrombine anormaux. A l'époque, les tests de fixation de l'annexine V à la surface des plaquettes n'avaient jamais été réalisés, car le laboratoire ne possédait pas encore de cytomètre en flux. De plus, dans les années 1990 au CHU de Tours, les tests fonctionnels d'agrégation plaquettaire n'étaient réalisés que si le temps de saignement par méthode IVY incision était

allongé, ce qui n'était pas le cas dans cette famille et le diagnostic d'une thrombopathie n'a donc pas été envisagé.

En 2009, la sensibilité du temps de saignement était largement discutée et la réalisation de ce test disparaissait dans les laboratoires. La place de l'exploration des fonctions plaquettaires dans la démarche diagnostique d'une symptomatologie hémorragique arrivait alors en première intention lorsque les tests de coagulation étaient normaux⁽¹¹⁵⁻¹¹⁶⁾. Dans ce contexte, monsieur JDB (IV:3) a bénéficié de tests d'agrégation plaquettaire lors d'une consultation. Nous avons ainsi mis en évidence des anomalies franches des profils d'agrégation plaquettaire sur l'acide arachidonique et l'U46619, et plus modérés au collagène et à l'ADP, mais normal sur l'adrénaline. Ces résultats nous ont incités à reprendre l'exploration de cette famille puisque la littérature ne rapportait aucun syndrome de Scott associé à une autre thrombopathie.

Grâce à l'acquisition récente d'un cytomètre en flux au laboratoire d'hémostase et à l'aide de l'équipe d'hémostase de Nantes⁽¹¹⁸⁾, nous avons pu mettre au point la technique de fixation de l'annexine V après stimulation des plaquettes par l'ionophore calcique A23187. Cette technique a donc été réalisée chez tous les membres de cette famille parallèlement à des tests d'agrégation plaquettaire et de libération de l'ATP par les granules denses.

Cependant, bien qu'ayant réalisé un nombre important d'analyses spécialisées, il nous est toujours difficile, 20 ans après, de poser un nom sur ce trouble hémorragique familial.

Des anomalies des fonctions plaquettaires sont observées avec de nombreux agonistes (ADP, collagène, adrénaline, U46619 et acide arachidonique) mais sont d'intensité variable d'un patient à l'autre et ne corréleront pas toujours avec le phénotype hémorragique.

A contrario, les résultats de l'étude de la libération d'ATP par les granules denses montrent une meilleure corrélation clinico-biologique.

L'absence de phénotype hémorragique chez le patient III:4 ayant un ICP perturbé et un trouble isolé de l'agrégation plaquettaire à l'adrénaline ne nous permettent pas de relier avec certitude les anomalies biologiques et le phénotype. Nous pouvons également

envisager qu'une hypercoagulabilité d'origine indéterminée soit présente chez certains patients et qui limite l'expression d'un phénotype hémorragique.

Il est intéressant de noter que les anomalies des fonctions plaquettaires sont plus fréquemment observées à partir de la troisième génération (celle du *propositus*). Dans ce contexte on peut envisager l'existence de deux mécanismes intriqués responsables du phénotype hémorragique de cette famille, et le deuxième serait apparu avec le *propositus*.

D'autres explorations doivent être envisagées afin de poursuivre l'analyse de cette famille. L'étude des plaquettes en microscopie électronique nous permettrait d'objectiver ou non un défaut quantitatif des granules denses. Des tests de génération de thrombine sur plasma et PRP pourraient également être très informatifs, notamment pour les patients peu symptomatiques mais aussi pour notre patient asymptomatique et qui présente des anomalies des fonctions plaquettaires en agrégométrie.

De plus, afin de rechercher le ou les gènes impliqués chez cette famille, nous allons envoyer prochainement l'ADN de chaque patient au centre de référence des pathologies plaquettaires à Marseille.

L'identification d'une ou plusieurs mutations permettrait, d'une part, de mieux comprendre la physiopathologie de ce désordre hémorragique familial et, d'autre part, de fournir aux patients une meilleure explication sur leur pathologie.

En conclusion, il existe aujourd'hui de nombreux outils permettant d'explorer les fonctions plaquettaires. C'est pourquoi ils doivent être utilisés de façon hiérarchique et réfléchie. Malgré cela, il arrive parfois que seule la biologie moléculaire permette de nous donner une réponse franche quant au mécanisme physiopathologique responsable de la diathèse hémorragique.

Si toutes ces recherches peuvent parfois paraître excessives, il est important de savoir d'où vient le désordre hémorragique afin de mettre en œuvre la thérapeutique la plus adéquate en cas de chirurgie ou de saignement.

Références bibliographiques

1. Lefrançais, E. *et al.* The lung is a site of platelet biogenesis and a reservoir for haematopoietic progenitors. *Nature* **544**, 105–109 (2017).
2. Mazur, E. M., Lindquist, D. L., de Alarcon, P. A. & Cohen, J. L. Evaluation of bone marrow megakaryocyte ploidy distributions in persons with normal and abnormal platelet counts. *J. Lab. Clin. Med.* **111**, 194–202 (1988).
3. Briddell, R. A., Brandt, J. E., Straneva, J. E., Srour, E. F. & Hoffman, R. Characterization of the human burst-forming unit-megakaryocyte. *Blood* **74**, 145–151 (1989).
4. Gurney, A. L., Carver-Moore, K., de Sauvage, F. J. & Moore, M. W. Thrombocytopenia in c-mpl-deficient mice. *Science* **265**, 1445–1447 (1994).
5. de Sauvage, F. J. *et al.* Stimulation of megakaryocytopoiesis and thrombopoiesis by the c-Mpl ligand. *Nature* **369**, 533–538 (1994).
6. Jurk, K. *et al.* Thrombospondin-1 mediates platelet adhesion at high shear via glycoprotein Ib (GPIb): an alternative/backup mechanism to von Willebrand factor. *FASEB J.* **17**, 1490–1492 (2003).
7. Wagner, C. L. *et al.* Analysis of GPIIb/IIIa receptor number by quantification of 7E3 binding to human platelets. *Blood* **88**, 907–914 (1996).
8. Varga-Szabo, D., Pleines, I. & Nieswandt, B. Cell adhesion mechanisms in platelets. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **28**, 403–412 (2008).
9. Andersen, H. *et al.* Protease-activated receptor 1 is the primary mediator of thrombin-stimulated platelet procoagulant activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 11189–11193 (1999).

10. Hechler, B. *et al.* The P2Y₁ receptor is necessary for adenosine 5'-diphosphate-induced platelet aggregation. *Blood* **92**, 152–159 (1998).
11. Kauffenstein, G. *et al.* The P2Y₁₂ receptor induces platelet aggregation through weak activation of the alpha(IIb)beta(3) integrin--a phosphoinositide 3-kinase-dependent mechanism. *FEBS Lett.* **505**, 281–290 (2001).
12. Ilkan, Z., Watson, S., Watson, S. P. & Mahaut-Smith, M. P. P2X₁ Receptors Amplify FcγRIIa-Induced Ca²⁺ Increases and Functional Responses in Human Platelets. *Thromb. Haemost.* **118**, 369–380 (2018).
13. Offermanns, S., Laugwitz, K. L., Spicher, K. & Schultz, G. G proteins of the G₁₂ family are activated via thromboxane A₂ and thrombin receptors in human platelets. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**, 504–508 (1994).
14. Harrison, P. & Cramer, E. M. Platelet alpha-granules. *Blood Rev.* **7**, 52–62 (1993).
15. van Nispen tot Pannerden, H. *et al.* The platelet interior revisited: electron tomography reveals tubular alpha-granule subtypes. *Blood* **116**, 1147–1156 (2010).
16. White, J. G. Electron opaque structures in human platelets: which are or are not dense bodies? *Platelets* **19**, 455–466 (2008).
17. McNicol, A. & Israels, S. J. Platelet dense granules: structure, function and implications for haemostasis. *Thromb. Res.* **95**, 1–18 (1999).
18. Kristiansen, K. Molecular mechanisms of ligand binding, signaling, and regulation within the superfamily of G-protein-coupled receptors: molecular modeling and mutagenesis approaches to receptor structure and function. *Pharmacol. Ther.* **103**, 21–80 (2004).

19. Rebecchi, M. J. & Pentylala, S. N. Structure, function, and control of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Physiol. Rev.* **80**, 1291–1335 (2000).
20. Lee, H., Lim, C., Puzon-McLaughlin, W., Shattil, S. & Ginsberg, M. RIAM activates integrins by linking talin to ras GTPase membrane-targeting sequences. *J Biol Chem* **284**, 5119–5027 (2009).
21. Hechler, B. & Gachet, C. P2 receptors and platelet function. *Purinergic Signal.* **7**, 293–303 (2011).
22. Daniel, J. L., Molish, I. R., Rigmaiden, M. & Stewart, G. Evidence for a role of myosin phosphorylation in the initiation of the platelet shape change response. *J. Biol. Chem.* **259**, 9826–9831 (1984).
23. Kramer, R. M. *et al.* p38 mitogen-activated protein kinase phosphorylates cytosolic phospholipase A2 (cPLA2) in thrombin-stimulated platelets. Evidence that proline-directed phosphorylation is not required for mobilization of arachidonic acid by cPLA2. *J. Biol. Chem.* **271**, 27723–27729 (1996).
24. Broos, K., Feys, H. B., De Meyer, S. F., Vanhoorelbeke, K. & Deckmyn, H. Platelets at work in primary hemostasis. *Blood Rev.* **25**, 155–167 (2011).
25. Hoylaerts, M. F. *et al.* von Willebrand factor binds to native collagen VI primarily via its A1 domain. *Biochem. J.* **324 (Pt 1)**, 185–191 (1997).
26. Lankhof, H. *et al.* A3 domain is essential for interaction of von Willebrand factor with collagen type III. *Thromb. Haemost.* **75**, 950–958 (1996).
27. Ulrichts, H. *et al.* Shielding of the A1 domain by the D'D3 domains of von Willebrand factor modulates its interaction with platelet glycoprotein Ib-IX-V. *J Biol Chem* **281**, 4699–707 (2006).

28. Frenette, P. S., Johnson, R. C., Hynes, R. O. & Wagner, D. D. Platelets roll on stimulated endothelium in vivo: an interaction mediated by endothelial P-selectin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**, 7450–7454 (1995).
29. Savage, B., Saldívar, E. & Ruggeri, Z. M. Initiation of platelet adhesion by arrest onto fibrinogen or translocation on von Willebrand factor. *Cell* **84**, 289–297 (1996).
30. Du, X. Signaling and regulation of the platelet glycoprotein Ib-IX-V complex. *Curr. Opin. Hematol.* **14**, 262–269 (2007).
31. Watson, S. P., Herbert, J. M. J. & Pollitt, A. Y. GPVI and CLEC-2 in hemostasis and vascular integrity. *J. Thromb. Haemost.* **8**, 1456–1467 (2010).
32. Cosemans, J. M. E. M. *et al.* Potentiating role of Gas6 and Tyro3, Axl and Mer (TAM) receptors in human and murine platelet activation and thrombus stabilization. *J. Thromb. Haemost.* **8**, 1797–1808 (2010).
33. Suzuki-Inoue, K. *et al.* Involvement of the snake toxin receptor CLEC-2, in podoplanin-mediated platelet activation, by cancer cells. *J. Biol. Chem.* **282**, 25993–26001 (2007).
34. Wolfs, J. L. N. *et al.* Activated scramblase and inhibited aminophospholipid translocase cause phosphatidylserine exposure in a distinct platelet fraction. *Cell. Mol. Life Sci.* **62**, 1514–1525 (2005).
35. Freyssinet, J.-M. & Toti, F. Formation of procoagulant microparticles and properties. *Thromb. Res.* **125 Suppl 1**, S46-48 (2010).
36. Morel, O., Morel, N., Freyssinet, J.-M. & Toti, F. Platelet microparticles and vascular cells interactions: a checkpoint between the haemostatic and thrombotic responses. *Platelets* **19**, 9–23 (2008).

37. Fujii, T., Sakata, A., Nishimura, S., Eto, K. & Nagata, S. TMEM16F is required for phosphatidylserine exposure and microparticle release in activated mouse platelets. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **112**, 12800–12805 (2015).
38. Suzuki, J., Umeda, M., Sims, P. J. & Nagata, S. Calcium-dependent phospholipid scrambling by TMEM16F. *Nature* **468**, 834–838 (2010).
39. Getz, T. M., Dangelmaier, C. A., Jin, J., Daniel, J. L. & Kunapuli, S. P. Differential phosphorylation of myosin light chain (Thr)18 and (Ser)19 and functional implications in platelets. *J. Thromb. Haemost.* **8**, 2283–2293 (2010).
40. Garcia, A., Kim, S., Bhavaraju, K., Schoenwaelder, S. M. & Kunapuli, S. P. Role of phosphoinositide 3-kinase beta in platelet aggregation and thromboxane A2 generation mediated by Gi signalling pathways. *Biochem. J.* **429**, 369–377 (2010).
41. Bergmeier, W. *et al.* Mice lacking the signaling molecule CalDAG-GEFI represent a model for leukocyte adhesion deficiency type III. *J. Clin. Invest.* **117**, 1699–1707 (2007).
42. Crittenden, J. R. *et al.* CalDAG-GEFI integrates signaling for platelet aggregation and thrombus formation. *Nat. Med.* **10**, 982–986 (2004).
43. Gralnick, H. R. *et al.* Platelet von Willebrand factor: comparison with plasma von Willebrand factor. *Thromb. Res.* **38**, 623–633 (1985).
44. Suzuki, H., Murasaki, K., Kodama, K. & Takayama, H. Intracellular localization of glycoprotein VI in human platelets and its surface expression upon activation. *Br. J. Haematol.* **121**, 904–912 (2003).
45. Müller, F. *et al.* Platelet polyphosphates are proinflammatory and procoagulant mediators in vivo. *Cell* **139**, 1143–1156 (2009).

46. Luo, B.-H., Carman, C. V. & Springer, T. A. Structural basis of integrin regulation and signaling. *Annu. Rev. Immunol.* **25**, 619–647 (2007).
47. Takagi, J., Petre, B. M., Walz, T. & Springer, T. A. Global conformational rearrangements in integrin extracellular domains in outside-in and inside-out signaling. *Cell* **110**, 599–511 (2002).
48. Houdijk, W. P., Sakariassen, K. S., Nievelstein, P. F. & Sixma, J. J. Role of factor VIII-von Willebrand factor and fibronectin in the interaction of platelets in flowing blood with monomeric and fibrillar human collagen types I and III. *J. Clin. Invest.* **75**, 531–540 (1985).
49. Maxwell, M. J. *et al.* Identification of a 2-stage platelet aggregation process mediating shear-dependent thrombus formation. *Blood* **109**, 566–576 (2007).
50. Dopheide, S. M., Maxwell, M. J. & Jackson, S. P. Shear-dependent tether formation during platelet translocation on von Willebrand factor. *Blood* **99**, 159–167 (2002).
51. Nesbitt, W. S. *et al.* Distinct glycoprotein Ib/V/IX and integrin alpha IIb beta 3-dependent calcium signals cooperatively regulate platelet adhesion under flow. *J. Biol. Chem.* **277**, 2965–2972 (2002).
52. Mazzucato, M., Pradella, P., Cozzi, M. R., De Marco, L. & Ruggeri, Z. M. Sequential cytoplasmic calcium signals in a 2-stage platelet activation process induced by the glycoprotein Ibalpha mechanoreceptor. *Blood* **100**, 2793–2800 (2002).
53. Ma, Y.-Q., Qin, J. & Plow, E. F. Platelet integrin alpha(IIb)beta(3): activation mechanisms. *J. Thromb. Haemost.* **5**, 1345–1352 (2007).
54. Bluestein, D., Niu, L., Schoephoerster, R. T. & Dewanjee, M. K. Fluid mechanics of arterial stenosis: relationship to the development of mural thrombus. *Ann Biomed Eng* **25**, 344–356 (1997).

55. Siegel, J. M., Markou, C. P., Ku, D. N. & Hanson, S. R. A scaling law for wall shear rate through an arterial stenosis. *J Biomech Eng* **116**, 446–451 (1994).
56. Narumiya, S., Sugimoto, Y. & Ushikubi, F. Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. *Physiol. Rev.* **79**, 1193–1226 (1999).
57. Ruan, C., So, S. & Ruan, K. Inducible COX-2 dominates over COX-1 in prostacyclin biosynthesis: mechanisms of COX-2 inhibitor risk to heart disease. *Life Sci* **88**, 24–30 (Jan 3).
58. Harbeck, B., Hüttelmaier, S., Schluter, K., Jockusch, B. M. & Illenberger, S. Phosphorylation of the vasodilator-stimulated phosphoprotein regulates its interaction with actin. *J. Biol. Chem.* **275**, 30817–30825 (2000).
59. Aszódi, A. *et al.* The vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) is involved in cGMP- and cAMP-mediated inhibition of agonist-induced platelet aggregation, but is dispensable for smooth muscle function. *EMBO J.* **18**, 37–48 (1999).
60. Maynard, D. M., Heijnen, H. F. G., Horne, M. K., White, J. G. & Gahl, W. A. Proteomic analysis of platelet alpha-granules using mass spectrometry. *J. Thromb. Haemost.* **5**, 1945–1955 (2007).
61. Plow, E. F. & Collen, D. The presence and release of alpha 2-antiplasmin from human platelets. *Blood* **58**, 1069–1074 (1981).
62. Hamzeh-Cognasse, H. *et al.* Platelet toll-like receptors are crucial sensors of infectious danger moieties. *Platelets* 1–8 (2018).
63. Vallance, T. M., Zeuner, M.-T., Williams, H. F., Widera, D. & Vaiyapuri, S. Toll-Like Receptor 4 Signalling and Its Impact on Platelet Function, Thrombosis, and Haemostasis. *Mediators Inflamm.* **2017**, 9605894 (2017).

64. Andrews, R. K., Arthur, J. F. & Gardiner, E. E. Neutrophil extracellular traps (NETs) and the role of platelets in infection. *Thromb. Haemost.* **112**, 659–665 (2014).
65. Palumbo, J. S. *et al.* Platelets and fibrin(ogen) increase metastatic potential by impeding natural killer cell-mediated elimination of tumor cells. *Blood* **105**, 178–185 (2005).
66. Nieswandt, B., Hafner, M., Echtenacher, B. & Männel, D. N. Lysis of tumor cells by natural killer cells in mice is impeded by platelets. *Cancer Res.* **59**, 1295–1300 (1999).
67. Poggi, A., Stella, M. & Donati, M. B. The importance of blood cell-vessel wall interactions in tumour metastasis. *Baillieres Clin. Haematol.* **6**, 731–752 (1993).
68. Mills, G. B. & Moolenaar, W. H. The emerging role of lysophosphatidic acid in cancer. *Nat. Rev. Cancer* **3**, 582–591 (2003).
69. Folkman, J., Taylor, S. & Spillberg, C. The role of heparin in angiogenesis. *Ciba Found. Symp.* **100**, 132–149 (1983).
70. Staton, C. A. & Lewis, C. E. Angiogenesis inhibitors found within the haemostasis pathway. *J. Cell. Mol. Med.* **9**, 286–302 (2005).
71. Nash, G. F., Walsh, D. C. & Kakkar, A. K. The role of the coagulation system in tumour angiogenesis. *Lancet Oncol.* **2**, 608–613 (2001).
72. Distler, J. H. W. *et al.* Angiogenic and angiostatic factors in the molecular control of angiogenesis. *Q J Nucl Med* **47**, 149–161 (2003).
73. Gresele, P. & Subcommittee on Platelet Physiology of the International Society on Thrombosis and Hemostasis. Diagnosis of inherited platelet function disorders: guidance from the SSC of the ISTH. *J. Thromb. Haemost.* **13**, 314–322 (2015).

74. Gresele, P. *et al.* Diagnosis of suspected inherited platelet function disorders: results of a worldwide survey. *J. Thromb. Haemost.* **12**, 1562–1569 (2014).
75. Lowe, G. C., Lordkipanidzé, M., Watson, S. P. & UK GAPP study group. 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).
76. Pietrzak, I., Komarnicki, M. & Zaremba-Drobnik, D. Platelet aggregation and prostaglandin metabolism in uremic patients. *Am. J. Kidney Dis.* **38**, S111-114 (2001).
77. Wratten, M. L. *et al.* Uremic ultrafiltrate inhibits platelet-activating factor synthesis. *Blood Purif.* **17**, 134–141 (1999).
78. Lentaigne, C. *et al.* Inherited platelet disorders: toward DNA-based diagnosis. *Blood* **127**, 2814–2823 (2016).
79. Berndt, M. C. & Andrews, R. K. Bernard-Soulier syndrome. *Haematologica* **96**, 355–359 (2011).
80. Miller, J. L., Lyle, V. A. & Cunningham, D. Mutation of leucine-57 to phenylalanine in a platelet glycoprotein Ib alpha leucine tandem repeat occurring in patients with an autosomal dominant variant of Bernard-Soulier disease. *Blood* **79**, 439–446 (1992).
81. Simon, D., Kunicki, T. & Nugent, D. Platelet function defects. *Haemophilia* **14**, 1240–1249 (2008).
82. Li, R. & Emsley, J. The organizing principle of the platelet glycoprotein Ib-IX-V complex. *J. Thromb. Haemost.* **11**, 605–614 (2013).
83. Sandrock, K. *et al.* Novel Mutation in Bernard-Soulier Syndrome. *Transfus Med Hemother* **37**, 278–284 (2010).

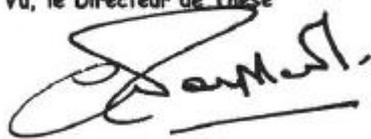
84. Hamilton, A. *et al.* Frequency of platelet type versus type 2B von Willebrand disease. An international registry-based study. *Thromb. Haemost.* **105**, 501–508 (2011).
85. Handa, M. *et al.* Platelet unresponsiveness to collagen: involvement of glycoprotein Ia-IIa (alpha 2 beta 1 integrin) deficiency associated with a myeloproliferative disorder. *Thromb. Haemost.* **73**, 521–528 (1995).
86. Kojima, H. *et al.* Characterization of a patient with glycoprotein (GP) VI deficiency possessing neither anti-GPVI autoantibody nor genetic aberration. *J. Thromb. Haemost.* **4**, 2433–2442 (2006).
87. Fiore, M., Pillois, X., Nurden, P., Nurden, A. T. & Austerlitz, F. Founder effect and estimation of the age of the French Gypsy mutation associated with Glanzmann thrombasthenia in Manouche families. *Eur. J. Hum. Genet.* **19**, 981–987 (2011).
88. Robert, P. *et al.* A novel leukocyte adhesion deficiency III variant: kindlin-3 deficiency results in integrin- and nonintegrin-related defects in different steps of leukocyte adhesion. *J. Immunol.* **186**, 5273–5283 (2011).
89. Masliah-Planchon, J., Darnige, L. & Bellucci, S. Molecular determinants of platelet delta storage pool deficiencies: an update. *Br. J. Haematol.* **160**, 5–11 (2013).
90. Jedlitschky, G. *et al.* Role of MRP4 (ABCC4) in platelet adenine nucleotide-storage: evidence from patients with delta-storage pool deficiencies. *Am. J. Pathol.* **176**, 1097–1103 (2010).
91. Rosa, J.-P. Le syndrome des plaquettes grises. *Hématologie* **19**, 123–135 (2013).
92. Hayward, C. P. M. & Rivard, G. E. Quebec platelet disorder. *Expert Rev Hematol* **4**, 137–141 (2011).

- 93 Gissen, P. *et al.* Mutations in VPS33B, encoding a regulator of SNARE-dependent membrane fusion, cause arthrogyriposis-renal dysfunction-cholestasis (ARC) syndrome. *Nat. Genet.* **36**, 400–404 (2004).
94. Favier, R. *et al.* Paris-Trousseau syndrome : clinical, hematological, molecular data of ten new cases. *Thromb. Haemost.* **90**, 893–897 (2003).
95. Weiss, H. J., Vivic, W. J., Lages, B. A. & Rogers, J. Isolated deficiency of platelet procoagulant activity. *Am. J. Med.* **67**, 206–213 (1979).
96. van Geffen, J. P., Swieringa, F. & Heemskerk, J. W. M. Platelets and coagulation in thrombus formation: aberrations in the Scott syndrome. *Thromb. Res.* **141 Suppl 2**, S12-16 (2016).
97. Lhermusier, T., Chap, H. & Payrastre, B. Platelet membrane phospholipid asymmetry: from the characterization of a scramblase activity to the identification of an essential protein mutated in Scott syndrome. *J. Thromb. Haemost.* **9**, 1883–1891 (2011).
98. Kojima, H. *et al.* Production and characterization of transformed B-lymphocytes expressing the membrane defect of Scott syndrome. *J. Clin. Invest.* **94**, 2237–2244 (1994).
99. Stout, J. G. *et al.* Scott syndrome erythrocytes contain a membrane protein capable of mediating Ca²⁺-dependent transbilayer migration of membrane phospholipids. *J Clin Invest* **99**, 2232–2238 (1997).
100. Mattheij, N. J. A. *et al.* Survival protein anoctamin-6 controls multiple platelet responses including phospholipid scrambling, swelling, and protein cleavage. *FASEB J.* **30**, 727–737 (2016).
101. Ardillon, L. *et al.* Platelet function analyser (PFA-100) results and von Willebrand factor deficiency: a 16-year ‘real-world’ experience. *Haemophilia* **21**, 646–652 (2015).

102. Sladky, J. L., Klima, J., Grooms, L., Kerlin, B. A. & O'Brien, S. H. The PFA-100 ® does not predict delta-granule platelet storage pool deficiencies. *Haemophilia* **18**, 626–629 (2012).
103. Podda, G. M., Bucciarelli, P., Lussana, F., Lecchi, A. & Cattaneo, M. Usefulness of PFA-100 testing in the diagnostic screening of patients with suspected abnormalities of hemostasis: comparison with the bleeding time. *J. Thromb. Haemost.* **5**, 2393–2398 (2007).
104. Hayward, C. P. M. *et al.* Platelet function analyzer (PFA)-100 closure time in the evaluation of platelet disorders and platelet function. *J. Thromb. Haemost.* **4**, 312–319 (2006).
105. 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* **11**, 1183–1189 (2013).
106. Alessi, M.-C., Payrastre, B. & Sié, P. Intérêt et limites des tests d'agrégation pour le diagnostic des anomalies fonctionnelles plaquettaires constitutionnelles. *Hématologie* **23**, 298–311 (2017).
107. Tóth, O., Calatzis, A., Penz, S., Losonczy, H. & Siess, W. Multiple electrode aggregometry: a new device to measure platelet aggregation in whole blood. *Thromb. Haemost.* **96**, 781–788 (2006).
108. 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. *Br. J. Haematol.* (2015).

109. Pasalic, L. *et al.* Flow Cytometry Protocols for Assessment of Platelet Function in Whole Blood. *Methods Mol. Biol.* **1646**, 369–389 (2017).
110. Clauser, S. & Cramer-Bordé, E. Role of platelet electron microscopy in the diagnosis of platelet disorders. *Semin. Thromb. Hemost.* **35**, 213–223 (2009).
111. Peyvandi, F., Kunicki, T. & Lillicrap, D. Genetic sequence analysis of inherited bleeding diseases. *Blood* **122**, 3423–3431 (2013).
112. Parry, D. H., Giddings, J. C. & Bloom, A. L. Familial haemostatic defect associated with reduced prothrombin consumption. *Br. J. Haematol.* **44**, 323–334 (1980).
113. Castoldi, E., Collins, P. W., Williamson, P. L. & Bevers, E. M. Compound heterozygosity for 2 novel TMEM16F mutations in a patient with Scott syndrome. *Blood* **117**, 4399–4400 (2011).
114. Boisseau, P. *et al.* A new mutation of ANO6 in two familial cases of Scott syndrome. *Br. J. Haematol.* **180**, 750–752 (2016).
115. Bolton-Maggs, P. H. B. *et al.* A review of inherited platelet disorders with guidelines for their management on behalf of the UKHCDO. *Br. J. Haematol.* **135**, 603–633 (2006).
116. 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).

Vu, le Directeur de Thèse

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'J. L. ...', written over a horizontal line.

Vu, le Doyen
De la Faculté de Médecine de Tours
Tours, le

DRILLAUD Nicolas

Nombre de pages 108 – tableaux 12 – figures 23

Résumé :

Les thrombopathies englobent un groupe hétérogène de pathologies hémorragiques parmi lesquelles de nombreux mécanismes physiopathologiques sont impliqués. De diagnostic parfois difficile, elles doivent être suspectées devant toute symptomatologie hémorragique cutanéomuqueuse.

Dans les années 1990, nous avons diagnostiqué un syndrome de Scott chez plusieurs membres d'une même famille en raison de tests de consommation de la prothrombine anormaux.

Dans les années 2000, on retrouve chez un patient, des anomalies franches des fonctions plaquettaires en réponse à deux agonistes (analogue du TXA2 et acide arachidonique) qui nous fait évoquer une thrombopathie peut être associée au syndrome de Scott.

Plusieurs patients sont revus en 2018 et tous présentent un indice de consommation de la prothrombine allongé en méthode Parry mais un facteur II résiduel normal. L'étude par cytométrie en flux retrouve une diminution modérée de la fixation de l'annexine V chez deux patients très symptomatiques. Des anomalies des fonctions plaquettaires sont plus fréquemment observés à partir de la 4^{ème} génération et en réponse à plusieurs agonistes (ADP, collagène, acide arachidonique, analogues du TXA2, adrénaline). Cependant, les profils biologiques diffèrent d'un patient à l'autre et ne corréler pas toujours au phénotype hémorragique. Enfin, on retrouve une diminution de la libération d'ATP par les granules denses chez les patients symptomatiques.

Ces résultats semblent suggérer une anomalie liée à un défaut des voies de signalisation, de sécrétion des granules ou de flux calcique. L'identification d'une ou plusieurs mutations génétiques nous permettrait de mieux comprendre cette thrombopathie.

Mots clés :

Thrombopathie, exposition des phospholipides, syndrome de Scott, hémorragie, plaquettes

Jury :

Président du Jury : Professeur Yves GRUEL
Directeur de thèse : Professeur Claire POUPLARD
Membres du Jury : Professeur Emmanuel GYAN
Professeur François MAILLOT

Date de soutenance : 17 octobre 2018