

Année 2021/2022

N°

Thèse

Pour le
DOCTORAT EN MÉDECINE
Diplôme d'État
par
Justine BONNEMAY
Née le 19 mai 1994 à Chartres (28)

TITRE :

Déficits en granules denses plaquettaires : physiopathologie et stratégie diagnostique en 2021.

Présentée et soutenue publiquement le 20/10/2021 devant un jury composé de :

Président du Jury :

Professeur Yves GRUEL, Hématologie-Transfusion, Faculté de Médecine – Tours

Membres du Jury :

Professeur Philippe LANOTTE, Microbiologie-Immunologie-Bioépidémiologie, Faculté de Pharmacie – Tours

Professeur Philippe ROINGEARD, Biologie cellulaire, Faculté de Médecine – Tours

Docteur Jean-Baptiste VALENTIN, Hématologie-Hémostase, PH, CHRU – Tours

Directeurs de thèse :

Docteur Sébastien EYMIEUX, Microscopie-Biologie cellulaire, AHU, Faculté de Médecine – Tours

Docteur Caroline VAYNE, Hématologie-Hémostase, PA, CHRU – Tours

RÉSUMÉ :

Les granules denses plaquettaires jouent un rôle clé au cours de l'hémostase primaire, en contribuant notamment à l'amplification de l'activation plaquettaire et à la stabilisation du thrombus. Les déficits constitutionnels en granules denses constituent un ensemble hétérogène de thrombopathies, regroupées sous le terme de « maladie du pool vide delta-plaquettaire », caractérisées par des anomalies quantitatives (nombre de granules) ou qualitatives (contenu) des granules denses. L'existence de formes isolées (hématologiques pures) et syndromiques de cette thrombopathie implique une certaine hétérogénéité en termes d'expression clinique. La maladie du pool vide plaquettaire représente actuellement 25 % des diagnostics de thrombopathie en France, mais la prévalence de sa forme isolée est probablement sous-estimée du fait d'un manque de connaissances des bases moléculaires de cette pathologie, des performances très variables des outils de dépistage actuellement disponibles, et d'un phénotype hémorragique variable, mais le plus souvent modéré, associé à cette pathologie. Les patients atteints de déficits en granules denses sont néanmoins exposés à un risque hémorragique potentiellement sévère en cas de traumatisme ou d'acte invasif, ce qui souligne la nécessité de mieux documenter ces anomalies pour garantir une prise en charge adaptée des patients. A l'heure actuelle, le diagnostic biologique des déficits en granules denses est basé sur des tests d'orientation, permettant de dépister l'existence d'un trouble fonctionnel plaquettaire, complétés par le dénombrement des granules denses en microscopie électronique et l'analyse de leur contenu biochimique. Les objectifs de ce travail sont de mieux comprendre la physiopathologie des déficits en granules denses plaquettaires, et de réaliser un état des lieux de la stratégie diagnostique actuelle, en discutant plus particulièrement la place de la microscopie électronique au sein de cette stratégie.

MOTS CLÉS :

Plaquettes, Granules denses, Maladie du pool vide delta-plaquettaire, Diagnostic biologique, Microscopie électronique.

ABSTRACT :

Platelet dense granules play a key role during primary hemostasis, contributing in particular to the amplification of platelet activation and the stabilization of the thrombus. Constitutional deficiencies in dense granules constitute a heterogeneous set of platelet function disorders, grouped under the term "platelet delta-storage pool disease", characterized by quantitative (number of granules) or qualitative (content) abnormalities of dense granules. The existence of isolated (pure hematological) and syndromic forms of this thrombopathy implies a certain heterogeneity in terms of clinical expression. Platelet delta-storage pool disease currently accounts for 25 % of thrombopathy diagnoses in France, but the prevalence of its isolated form is probably underestimated due to a lack of knowledge of the molecular basis of this pathology, the highly variable performance of currently available screening tools, and a variable, but most often moderate, hemorrhagic phenotype, associated with this pathology. Patients with dense granule deficiencies are nevertheless exposed to a potentially severe bleeding risk in the event of trauma or invasive procedure, which highlights the need to better document these abnormalities to ensure appropriate patient care. At present, the biological diagnosis of dense granule deficits is based on orientation tests, allowing to detect the existence of a functional platelet disorder, supplemented by the enumeration of dense granules in electron microscopy and the analysis of their biochemical content. The objectives of this work are to better understand the pathophysiology of platelet dense granule deficits, and to carry out an inventory of the current diagnostic strategy, discussing more particularly the place of electron microscopy within this strategy.

KEYWORDS :

Platelet, Dense granules , Delta-storage pool disease, Biological diagnosis, Electron microscopy.

UNIVERSITE DE TOURS
FACULTE DE MEDECINE DE TOURS

DOYEN
Pr Patrice DIOT

VICE-DOYEN
Pr Henri MARRET

ASSESSEURS
Pr Denis ANGOULVANT, *Pédagogie*
Pr Mathias BUCHLER, *Relations internationales*
Pr Theodora BEJAN-ANGOULVANT, *Moyens - relations avec l'Université*
Pr Clarisse DIBAO-DINA, *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 Gilles BODY
Pr Jacques CHANDENIER
Pr Philippe COLOMBAT
Pr Etienne DANQUECHIN-DORVAL
Pr Pascal DUMONT
Pr Dominique GOGA
Pr Gérard LORETTE
Pr Dominique PERROTIN
Pr Roland QUENTIN

PROFESSEURS HONORAIRES
P. ANTHONIOZ - P. ARBEILLE - A. AUDURIER - A. AUTRET - P. BAGROS - P. BARDOS - C. BARTHELEMY - J.L. BAULIEU
- C. BERGER - JC. BESNARD - P. BEUTTER - C. BONNARD - P. BONNET - P. BOUGNOUX - P. BURDIN - L.
CASTELLANI - A. CHANTEPIE - B. CHARBONNIER - P. CHOUTET - T. CONSTANS - P. COSNAY - C. COUET - L. DE LA
LANDE DE CALAN - J.P. FAUCHIER - F. FETISSOF - J. FUSCIARDI - P. GAILLARD - G. GINIES - A. GOUDEAU - J.L.
GUILMOT - O. HAILLOT - N. HUTEN - M. JAN - J.P. LAMAGNERE - F. LAMISSE - Y. LANSON - O. LE FLOCH - Y.
LEBRANCHU - E. LECA - P. LECOMTE - AM. LEHR-DRYLEWICZ - E. LEMARIE - G. LEROY - M. MARCHAND - C.
MAURAGE - C. MERCIER - J. MOLINE - C. MORAIN - J.P. MUH - J. MURAT - H. NIVET - L. POURCELOT - P.
RAYNAUD - D. RICHARD-LENOBLE - A. ROBIER - J.C. ROLLAND - D. ROYERE - A. SAINDELLE - E. SALIBA - J.J.
SANTINI - D. SAUVAGE - D. SIRINELLI - J. WEILL

PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS

ANDRES Christian.....	Biochimie et biologie moléculaire
ANGOULVANT Denis	Cardiologie
APETOH Lionel.....	Immunologie
AUPART Michel	Chirurgie thoracique et cardiovasculaire
BABUTY Dominique	Cardiologie
BAKHOS David	Oto-rhino-laryngologie
BALLON Nicolas.....	Psychiatrie ; addictologie
BARILLOT Isabelle	Cancérologie ; radiothérapie
BARON Christophe	Immunologie
BEJAN-ANGOULVANT Théodora	Pharmacologie clinique
BERHOUET Julien	Chirurgie orthopédique et traumatologique
BERNARD Anne	Cardiologie
BERNARD Louis	Maladies infectieuses et maladies tropicales
BLANCHARD-LAUMONNIER Emmanuelle....	Biologie cellulaire
BLASCO Hélène	Biochimie et biologie moléculaire
BONNET-BRILHAULT Frédérique.....	Physiologie
BOURGUIGNON Thierry	Chirurgie thoracique et cardiovasculaire
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
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
EL HAGE Wissam	Psychiatrie adultes
EHRMANN Stephan	Médecine intensive - 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
GATAULT Philippe.....	Néphrologie
GAUDY-GRAFFIN Catherine.....	Bactériologie-virologie, hygiène hospitalière
GOUPILLE Philippe.....	Rhumatologie
GRUEL Yves	Hématologie, transfusion
GUERIF Fabrice	Biologie et médecine du développement et de la reproduction
GUILLON Antoine	Médecine intensive - réanimation
GUYETANT Serge	Anatomie et cytologie pathologiques
GYAN Emmanuel	Hématologie, transfusion
HALIMI Jean-Michel.....	Thérapeutique
HANKARD Régis.....	Pédiatrie
HERAULT Olivier.....	Hématologie, transfusion
HERBRETEAU Denis	Radiologie et imagerie médicale
HOURIOUX Christophe.....	Biologie cellulaire
IVANES Fabrice	Physiologie
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-vénéréologie
MAILLOT François	Médecine interne

MARCHAND-ADAM Sylvain	Pneumologie
MARRET Henri	Gynécologie-obstétrique
MARUANI Annabel	Dermatologie-vénéréologie
MEREGHETTI Laurent	Bactériologie-virologie ; hygiène hospitalière
MITANCHEZ Delphine	Pédiatrie
MORINIERE Sylvain	Oto-rhino-laryngologie
MOUSSATA Driffa	Gastro-entérologie
MULLEMAN Denis	Rhumatologie
ODENT Thierry	Chirurgie infantile
OUAISSI Mehdi	Chirurgie digestive
OULDAMER Lobna	Gynécologie-obstétrique
PAINTAUD Gilles	Pharmacologie fondamentale, pharmacologie clinique
PATAT Frédéric	Biophysique et médecine nucléaire
PERROTIN Franck	Gynécologie-obstétrique
PISELLA Pierre-Jean	Ophthalmologie
PLANTIER Laurent	Physiologie
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-vénéréologie
SANTIAGO-RIBEIRO Maria	Biophysique et médecine nucléaire
THOMAS-CASTELNAU Pierre	Pédiatrie
TOUTAIN Annick	Génétique
VAILLANT Loïc	Dermato-vénéréologie
VELUT Stéphane	Anatomie
VOURC'H Patrick	Biochimie et biologie moléculaire
WATIER Hervé	Immunologie
ZEMMOURA Ilyess	Neurochirurgie

PROFESSEUR DES UNIVERSITES DE MEDECINE GENERALE

DIBAO-DINA Clarisse
LEBEAU Jean-Pierre

PROFESSEURS ASSOCIES

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

PROFESSEUR CERTIFIE DU 2ND DEGRE

MC CARTHY Catherine Anglais

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS

AUDEMARD-VERGER Alexandra Médecine interne
BARBIER Louise Chirurgie digestive
BINET Aurélien Chirurgie infantile
BISSON Arnaud Cardiologie (CHRO)
BRUNAUULT Paul Psychiatrie d'adultes, addictologie
CAILLE Agnès Biostat., informatique médical et technologies de communication
CARVAJAL-ALLEGRIA Guillermo Rhumatologie (au 01/10/2021)
CLEMENTY Nicolas Cardiologie
DENIS Frédéric Odontologie
DOMELIER Anne-Sophie Bactériologie-virologie, hygiène hospitalière
DUFOUR Diane Biophysique et médecine nucléaire
ELKRIEF Laure Hépatologie – gastroentérologie
FAVRAIS Géraldine Pédiatrie
FOUQUET-BERGEMER Anne-Marie Anatomie et cytologie pathologiques
GUILLEUX Valérie Immunologie

GUILLON-GRAMMATICO Leslie	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
HOARAU Cyrille.....	Immunologie
LE GUELLEC Chantal	Pharmacologie fondamentale, pharmacologie clinique
LEFORT Bruno	Pédiatrie
LEGRAS Antoine	Chirurgie thoracique
LEMAIGNEN Adrien.....	Maladies infectieuses
MACHET Marie-Christine	Anatomie et cytologie pathologiques
MOREL Baptiste	Radiologie pédiatrique
PARE Arnaud	Chirurgie maxillo-faciale et stomatologie
PIVER Éric.....	Biochimie et biologie moléculaire
REROLLE Camille.....	Médecine légale
ROUMY Jérôme	Biophysique et médecine nucléaire
SAUTENET Bénédicte	Thérapeutique
STANDLEY-MIQUELESTORENA Elodie	Anatomie et cytologie pathologiques
STEFIC Karl.....	Bactériologie
TERNANT David.....	Pharmacologie fondamentale, pharmacologie clinique
VUILLAUME-WINTER Marie-Laure.....	Génétique

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES

AGUILLON-HERNANDEZ Nadia	Neurosciences
NICOGLOU Antonine	Philosophie – histoire des sciences et des techniques
PATIENT Romuald	Biologie cellulaire
RENOUX-JACQUET Cécile	Médecine Générale

MAITRES DE CONFERENCES ASSOCIES

BARBEAU Ludivine	Médecine Générale
RUIZ Christophe	Médecine Générale
SAMKO Boris	Médecine Générale

CHERCHEURS INSERM - CNRS - INRAE

BECKER Jérôme	Chargé de Recherche Inserm – UMR Inserm 1253
BOUAKAZ Ayache	Directeur de Recherche Inserm – UMR Inserm 1253
BRIARD Benoit.....	Chargé de Recherche Inserm – UMR Inserm 1100
CHALON Sylvie	Directeur de Recherche Inserm – UMR Inserm 1253
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 Inrae – UMR Inrae 1282
GOUILLEUX Fabrice	Directeur de Recherche CNRS – EA 7501 - ERL CNRS 7001
GOMOT Marie.....	Chargée de Recherche Inserm – UMR Inserm 1253
HEUZE-VOURCH Nathalie	Directrice de Recherche Inserm – UMR Inserm 1100
KORKMAZ Brice	Chargé de Recherche Inserm – UMR Inserm 1100
LATINUS Marianne.....	Chargée de Recherche Inserm – UMR Inserm 1253
LAUMONNIER Frédéric	Chargé de Recherche Inserm – UMR Inserm 1253
LE MERREUR Julie	Directrice de Recherche CNRS – UMR Inserm 1253
MAMMANO Fabrizio.....	Directeur de Recherche Inserm – UMR Inserm 1259
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 1069
SI TAHAR Mustapha	Directeur de Recherche Inserm – UMR Inserm 1100
SUREAU Camille	Directrice de Recherche émérite CNRS – UMR Inserm 1259
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

Pour l'Ecole d'Orthoptie

BOULNOIS Sandrine.....	Orthoptiste
SALAME Najwa.....	Orthoptiste

Pour l'Ethique Médicale

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

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.

Quand je serai grande, je serai Docteur...

Remerciements

A mon jury de thèse :

A Monsieur le Professeur Yves GRUEL

Professeur de l'Université de Médecine de Tours (Hématologie – Transfusion)
Praticien Hospitalier du CHU de Tours (Service d'Hématologie – Hémostase)
Responsable du Centre Régional de Traitement de l'Hémophilie et de la maladie de Willebrand (CRTH) de Tours

Qui m'a fait l'honneur de présider mon jury de thèse,

Toute ma reconnaissance pour votre participation et votre enseignement à la faculté comme dans votre service hospitalier.

Vous m'avez permis de découvrir cette discipline passionnante qu'est l'hémostase quand je n'étais encore qu'externe en médecine, sur les bancs de la fac et en stage dans votre service ; et me voilà aujourd'hui interne en Biologie Médicale, de retour dans ce même service pour parfaire ma formation, et toujours le « Mickey de la coagulation » en tête.

Hommages respectueux.

A Monsieur le Professeur Philippe LANOTTE

Professeur de l'Université de Pharmacie de Tours (Microbiologie-Immunologie-Bioépidémiologie)
Praticien Hospitalier du CHU de Tours (Service de Bactériologie, Virologie et Hygiène Hospitalière)

Qui m'a fait l'honneur et le plaisir d'accepter de participer à mon jury de thèse avec un réel enthousiasme.

Merci de m'avoir apporté votre soutien en acceptant d'apporter un regard extérieur à mon travail et de l'évaluer avec le plus grand intérêt.

Sincères remerciements.

A Monsieur le Professeur Philippe ROINGEARD

Professeur de l'Université de Médecine de Tours (Biologie cellulaire)
Praticien Hospitalier du CHU de Tours (Service de Biologie Cellulaire et Microscopie Electronique)

Toute ma reconnaissance pour votre participation à mon jury de thèse.

Merci pour votre enseignement à la faculté, qui a constitué dès la « PACES » le socle de mon apprentissage (grâce à « l'UE 2 ») et a conforté mon choix pour les études médicales.

A Monsieur le Docteur Jean-Baptiste VALENTIN

Praticien Hospitalier du CHU de Tours (Service d'Hématologie – Hémostase)

Merci pour ta présence dans ce jury de thèse.

Merci pour ton professionnalisme et ta confiance, jour et nuit en garde, à chaque fois que tu es l'Hémostasien d'astreinte au bout de notre téléphone. Et merci pour la formation que tu m'as donné, en consultation, au laboratoire et au chevet du patient pour apprendre à faire mes premiers myélogrammes.

A mes directeurs de thèse :

Au Docteur Caroline VAYNE

Praticien Attaché du CHU de Tours (Service d'Hématologie – Hémostase)

Un grand merci pour ton investissement infaillible dans l'encadrement de cette thèse, comme dans tous tes projets. Merci pour ta pédagogie et ton professionnalisme, pour toutes ces corrections (nocturnes), cette minutie et cette ambition de toucher l'excellence qui porte vers le haut.

Au Docteur Sébastien EYMIEUX

Assistant Hospitalier Universitaire de la faculté de Médecine et du CHU de Tours
(Service de Biologie Cellulaire et Microscopie Electronique)

Un grand merci pour ton investissement dans l'encadrement de cette thèse, ta disponibilité et ton professionnalisme. Et surtout, merci de m'avoir aiguillé avec confiance dans un domaine dans lequel j'arrivais novice.

A tous les professionnels qui me forment au quotidien :

Tout simplement, merci de m'apprendre mon métier !

Un énorme MERCI :

A mes parents, Sylvain et Nathalie, pour m'avoir tant donné, pour m'avoir soutenu dès le début dans cette ambition de long parcours difficile. Merci d'avoir toujours été là, de l'autre côté des SMS, à me rassurer et me consoler à chaque épreuve. Si j'ai pu arriver jusqu'ici, à faire un métier qui me passionne, c'est grâce à vous ! Merci du plus profond de mon cœur.

A mon frère Julien, de ne pas avoir été un « ouistiti », de m'avoir laissé choisir ton prénom (même si tu n'avais pas le choix et que papa et maman avait déjà fait une pré-sélection) et pour tous ces moments partagés depuis toutes ces années. J'espère que tu es aussi fier de moi que je suis fière de toi !

A Thibault, mon soutien indéfectible au quotidien, qui me supporte quoiqu'il arrive dans toutes les étapes de ces études difficiles et qui a toujours cru en moi. Merci pour ta patience et ton amour.

A grand-père et grand-mère, Christian et Paulette, pour leur intérêt et leur soutien éternel pour l'aînée de leurs petits-enfants. Merci pour tous ces moments partagés et ces vacances inoubliables à Carteret qui m'ont vu grandir. Parce que oui, regrouper les petits-enfants pendant plusieurs semaines, c'est un challenge : merci de l'avoir relevé encore et encore pour des souvenirs mémorables et merci pour votre patience et toute votre affection !

A papi et mamie, Jean et Georgette, qui n'êtes plus là pour partager ce grand moment avec moi, j'espère que de là où vous êtes, vous êtes fiers de moi et du chemin que j'ai parcouru.

A papi, tu es monté au ciel pour préparer ma venue sur terre et t'assurer que tout se passe bien pour moi. Merci de veiller sur moi depuis toujours de là-haut.

A mamie, tu es restée pour t'assurer que je débute bien dans la vie, puis tu es montée au ciel pour rejoindre papi afin de veiller sur moi au quotidien tous les deux. Merci pour ces souvenirs heureux et ces moments privilégiés des rendez-vous chez le coiffeur. Tu es ma bonne étoile !

A grand-maman Christiane, j'espère que tu es fière de moi de là où tu es.

A tata Sandrine, aussi marraine, merci pour tes attentions, ta présence et ton soutien sans faille.

A mes cousines, Lilou et Pauline, nous avons de bons souvenirs d'enfance, même si le temps et la distance nous ont éloignés.

A mon parrain, Henri et sa femme *Any*, pour leurs attentions régulières et leur soutien malgré la distance.

Aux parents de Thibault, Isabelle et Thierry, pour votre intérêt et votre soutien constant dans mon avancée, votre gentillesse et votre bonne humeur.

A mes co-internes, en particulier *Aurélien, Estelle, Thomas, Guillaume, Elsa* et tous les autres qui ont partagé ma vie d'interne. Pour tous ces moments et ces épreuves partagés en stage, pour ce soutien réciproque dans ce long parcours. Une chose est sûre : l'union fait la force ! Je suis ravie d'avoir fait ce bout de chemin avec vous et j'espère qu'on se remémorera tout ce parcours dans plusieurs années.

A l'équipe du laboratoire IH-DEL de l'EFS de Tours, pour leur bonne humeur et leur confiance rassurante au cours de ce semestre d'écriture. Merci en particulier à *Andréa* et *Djamel*, pour leur intérêt, leur soutien, leurs encouragements réguliers et pour ces moments libérés pour accomplir ce travail de longue haleine.

Déficits en granules denses plaquettaires :
physiopathologie et stratégie diagnostique
en 2021

Table des matières :

LISTE DES FIGURES	17
LISTE DES TABLEAUX	18
ABREVIATIONS	19
<u>PARTIE 1 : PHYSIOLOGIE PLAQUETTAIRE</u>	21
I. Origine des plaquettes	21
1) Mégacaryopoïèse	21
2) Biogenèse des granules denses plaquettaires	24
II. Structure des plaquettes	29
1) Zone périphérique	30
2) Cytoplasme	31
3) Structure des granules plaquettaires	32
III. Rôle des plaquettes dans l'hémostase	35
1) Adhésion plaquettaire	36
2) Activation plaquettaire	37
3) Agrégation plaquettaire	38
IV. Rôle des granules denses plaquettaires dans l'hémostase	39
<u>PARTIE 2 : ANOMALIES DES FONCTIONS PLAQUETTAIRES</u>	41
I. Les grands types de thrombopathies	41
II. Anomalies des granules denses plaquettaires	43
1) Manifestations cliniques	44
2) Classification clinique	45
<i>a. Déficits syndromiques</i>	45
<i>b. Déficits non-syndromiques</i>	52
3) Classification biologique	54
<i>a. Déficits quantitatifs</i>	54
<i>b. Déficits qualitatifs</i>	54
<i>c. Déficits sécrétoires</i>	55
<i>d. Déficits combinés delta/alpha</i>	55
<u>PARTIE 3 : DEFICITS EN GRANULES DENSES PLAQUETTAIRES : STRATEGIE D'EXPLORATION ET OUTILS DIAGNOSTIQUES</u>	57
I. Stratégie d'exploration des granules denses plaquettaires	57
II. Dépistage d'un trouble fonctionnel plaquettaire par agrégométrie par transmission lumineuse	64
III. Exploration des granules denses plaquettaires : évaluation des capacités sécrétoires	70
1) Étude de la sécrétion de sérotonine radiomarquée	70
2) Étude de la libération d'ATP par lumi-agrégométrie	71
3) Mesure biochimique de la sécrétion de sérotonine	73
4) Étude de l'expression du CD63 en cytométrie en flux	73
5) Test à la mepacrine	75

6) Étude de la sécrétion des polyphosphates	76
IV. Exploration des granules denses plaquettaires : dénombrement et étude du contenu endogène granulaire	78
1) Évaluation du contenu granulaire et dosages spécifiques (nucléotides, sérotonine, et autres protéines)	79
2) Microscopie électronique en transmission	81
<i>a. Whole-mount plaquettaire</i>	84
<i>b. Analyse ultrastructurale plaquettaire par technique classique</i>	89
3) Microscopie électronique à balayage : FIB-SEM	94
4) Analyse atomique par EDS	95
V. Explorations complémentaires : place de la génétique et évaluation des granules alpha ...	97
<u>PARTIE 4 : CONCLUSION ET DISCUSSION</u>	99
BIBLIOGRAPHIE	102

Liste des figures :

[Figure 1] : Formation de la plaquette

[Figure 2] : Schéma de la production plaquettaire

[Figure 3] : Résumé des facteurs de transcription et leurs cibles impliqués dans les différents stades de la mégacaryocytopoïèse

[Figure 4] : Biogenèse des granules denses plaquettaires

[Figure 5] : Composition des complexes protéiques BLOC-1, 2 et 3 et AP-3

[Figure 6] : Ultrastructure plaquettaire en microscopie électronique en transmission

[Figure 7] : Structure de la plaquette

[Figure 8] : Récepteurs de surface plaquettaires

[Figure 9] : Grandes étapes de la physiologie plaquettaire

[Figure 10] : Physiologie de l'hémostase primaire

[Figure 11] : Représentation de la coagulation plasmatique

[Figure 12] : Thrombopathies associées à des anomalies des composants membranaires ou intracellulaires plaquettaires

[Figure 13] : Inclusions granulaires géantes visualisées dans un polynucléaire neutrophile chez un patient atteint du syndrome de Chediak-Higashi

[Figure 14] : Recommandations diagnostiques des anomalies plaquettaires constitutionnelles : examens à réaliser en 1^{ère} intention selon l'ISTH

[Figure 15] : Algorithme diagnostique d'un déficit en granules denses plaquettaires selon les propositions du CRPP

[Figure 16] : Classement des gènes majeurs impliqués dans les thrombopathies constitutionnelles selon la sévérité d'une thrombopénie associée

[Figure 17] : Principe des tests d'agrégation plaquettaire

[Figure 18] : Différentes phases des profils d'agrégation plaquettaire

[Figure 19] : Profils d'agrégation plaquettaire observables au cours des principales thrombopathies

[Figure 20] : Profils d'agrégation plaquettaire à l'ADP et au collagène observés chez certains patients avec déficit en granules denses

[Figure 21] : Agrégation plaquettaire en réponse à divers agonistes chez des sujets atteints de déficits en granules denses

[Figure 22] : Exploration de la sécrétion d'ATP par lumi-agrégométrie

[Figure 23] : Etude de l'expression du CD63 par cytométrie en flux

[Figure 24] : Stratégie proposée d'exploration des granules denses plaquettaires

[Figure 25] : Représentation du microscope électronique en transmission

[Figure 26] : Préparation des plaquettes par technique whole-mount

[Figure 27] : Whole-mount plaquettaire en microscopie électronique en transmission

[Figure 28] : Caractéristiques des vrais et « faux » granules denses par technique whole-mount

[Figure 29] : Whole-mount plaquettaire d'un sujet sain et atteint de déficit en granules denses

[Figure 30] : Ultrastructure plaquettaire par microscopie électronique en transmission

[Figure 31] : Ultrastructure plaquettaire d'un sujet sain et atteint de maladie du pool vide plaquettaire

[Figure 32] : Analyse ultrastructurale plaquettaire selon trois méthodes de microscopie électronique

[Figure 33] : Exemple de microanalyses EDS couplées à la microscopie électronique

Liste des tableaux :

[Tableau 1] : Contenu des granules alpha plaquettaires

[Tableau 2] : Principaux LROs avec leurs localisations, fonctions et les conséquences cliniques de leurs atteintes

[Tableau 3] : Caractéristiques des syndromes d'Hermansky-Pudlak, Chediak-Higashi et Griscelli

[Tableau 4] : Sous-types de syndrome d'Hermansky-Pudlak avec leurs étiologies génétiques

[Tableau 5] : Concentrations d'agonistes recommandées pour les tests d'agrégation plaquettaire par transmission lumineuse selon plusieurs textes de références internationaux

[Tableau 6] : Intervalles de référence du nombre de granules denses par plaquette chez des sujets sains selon plusieurs études récentes

Liste des abréviations :

5HT : Sérotonine (5-hydroxytryptamine)

AA : Acide Arachidonique

ADP : Adénosine DiPhosphate

AGRAD : Etude intitulée « Diagnostic des Anomalies des GRAnules Denses plaquettaires dans les syndromes hémorragiques inexpliqués »

AMP : Adénosine MonoPhosphate

AMPC : Adénosine MonoPhosphate cyclique

AP : « *Adaptator Protein* »

ATP : Adénosine TriPhosphate

BLOC : « *Biogenesis of Lysosome-derived Organelles Complex* »

Ca²⁺ : Ions calcium

CHU : Centre Hospitalier Universitaire

CMF : Cytométrie en flux

CO₂ : Dioxyde de carbone

CRPP : Centre de Référence des Pathologies Plaquettaires

DAPI : « *Di Aminido Phenyl Indol* »

EDS ou EDX : microanalyse par rayons X à dispersion d'énergie

EEQ : Evaluation Externe de la Qualité

ELISA : « *Enzyme-linked immunosorbent assay* »

Fg : Fibrinogène

FIB-SEM : microscopie électronique à balayage à faisceau d'ions focalisé

Fli1 : « *Friend leukemia virus integration 1* »

FP4 : Facteur plaquettaire 4

FV : Facteur V

FXII : Facteur XII

GATA1 : « *GATA-binding factor 1* »

GTP : Guanosine TriPhosphate

HPLC : Chromatographie Liquide à Haute Performance

ISRS : Inhibiteurs Sélectifs de la Recapture de la Sérotonine

ISTH : Société Internationale d'Hémostase et Thrombose

ITAM : « *Immune-Tyrosine based Activation Motifs* »

K⁺ : ions potassium

LAM : Leucémie Aigüe Myéloïde

LROs : « *Lysosome-Related Organelles* »

MEB : Microscopie Electronique à Balayage

MET : Microscopie Electronique en Transmission

Mg²⁺ : ions magnésium

MGG : Coloration de May-Grünwald Giemsa

MVB : « *Multi-Vesicular Bodie* »

NFS : Numération Formule Sanguine

O₂ : Dioxygène

PAI-1 : Inhibiteur de l'activateur du plasminogène-1

PAPS : « *Platelet Aggregation Project Standardization* »

PFA : « *Platelet Function Analyser* »

PL : Phospholipide

PPP : Plasma Pauvre en Plaquettes

PRP : Plasma Riche en Plaquettes

SCO : Système Canaliculaire Ouvert

STD : Système Tubulaire Dense

TAP : Tests d'Agrégation Plaquettaire

TAR : Thrombopénie avec Aplasie Radiale

TCA : Temps de Céphaline avec Activateur

TP = Taux de Prothrombine

TPO : Thrombopoïétine

TRAP : « *Thrombin Receptor Activating Peptide* »

TXA₂ : Thromboxane A₂

UTP : Uridine TriPhosphate

VMP : Volume Plaquettaire Moyen

vWF : Facteur von Willebrand

δ-SPD : Maladie du pool vide delta-plaquettaire

Partie 1 : Physiologie plaquettaire

Les plaquettes sanguines, aussi appelées thrombocytes, sont les plus petits éléments figurés du sang¹. Elles mesurent en moyenne seulement 1 à 3µm de diamètre et circulent à raison de 150 à 400 10⁹/L en situation physiologique, bien que des facteurs de variabilité, comme le sexe, l'âge et l'ethnie aient été identifiés^{2,3}. En effet, les femmes auraient une numération plaquettaire significativement plus élevée que les hommes, de l'ordre d'une vingtaine de giga par litre de sang. De plus, les sujets âgés de plus de 70 ans ont une numération significativement plus basse d'environ 20 G/L. Par ailleurs, une variabilité interethnique a été mise en évidence en Italie et aux Etats-Unis, où une différence significative de l'ordre d'une vingtaine de giga par litre a été observée entre les populations noire (numération plus haute) et blanche non hispanique.

Leur morphologie varie également selon le contexte, puisqu'elles circulent sous forme discoïde à l'état basal mais deviennent sphériques et émettent des pseudopodes au cours de leur activation.

Les plaquettes ont un rôle majeur dans de nombreux processus biologiques, tels que l'hémostase, la cicatrisation, l'angiogenèse, l'inflammation ou bien encore l'immunité¹.

Dans la suite de ce manuscrit, nous nous concentrerons plus précisément sur leur implication au cours de l'hémostase primaire.

I. Origine des plaquettes

1) Mégacaryocytopoïèse

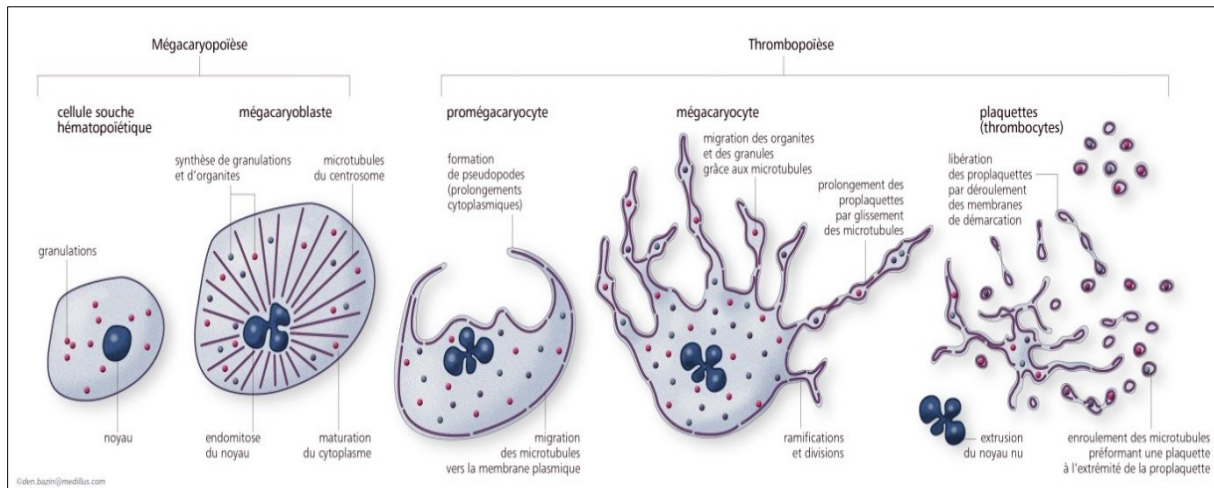
L'hématopoïèse permet la production des cellules sanguines circulantes à partir des cellules souches hématopoïétiques totipotentes présentes dans la moelle osseuse rouge.

La mégacaryocytopoïèse correspond à la voie de production spécifique des plaquettes sanguines, qui sont des éléments cellulaires anucléés formés par fragmentation du cytoplasme de leurs précurseurs plurinucléés : les mégacaryocytes.

Ces derniers représentent les plus grandes cellules de la moelle osseuse hématopoïétique (50 à 100 µm), mais aussi les plus rares.

Les mégacaryocytes subissent des phénomènes uniques de croissance et de maturation cellulaires, à la fois nucléaires et cytoplasmiques, aboutissant à libération des plaquettes matures dans la circulation sanguine¹.

[Figure 1] : Formation de la plaquette⁴

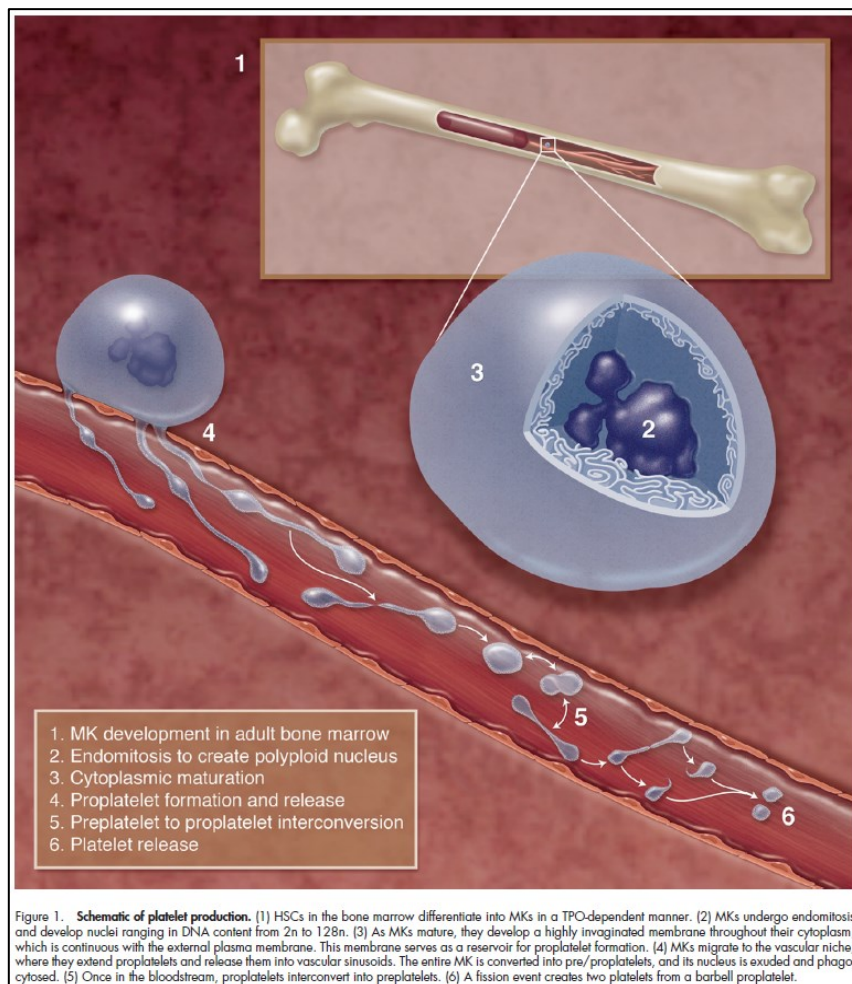


En effet, au cours de leur développement, les mégacaryocytes deviennent polyploïdes grâce à des phénomènes d'endomitose, qui correspondent à une réplication de l'ADN sans division cellulaire, aboutissant à la formation d'un noyau comportant jusqu'à 128 fois la quantité normale d'ADN, avant d'être éliminé par caryopinocytose.

Parallèlement, la maturation cytoplasmique est caractérisée par une accumulation de protéines du cytosquelette et de granules spécifiquement plaquettaires dérivés soit de l'appareil de Golgi (granules alpha) soit des lysosomes (granules denses).

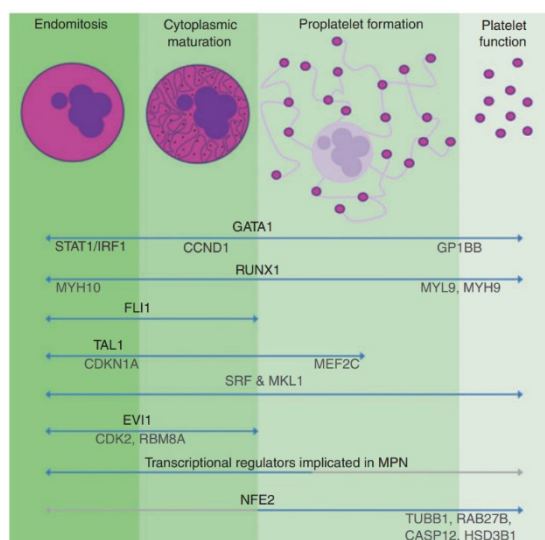
À mesure que le mégacaryocyte mature, il développe une membrane très invaginée dans son cytoplasme, en continuité avec la membrane plasmique externe. Cette membrane sert de réservoir pour la formation de prolongements appelés « proplaquettes » émises par le mégacaryocyte mature par remodelage de son cytosquelette. Lors de sa migration vers les sinus vasculaires, les forces de cisaillement élevées favorisent la fragmentation des proplaquettes en préplaquettes et en plaquettes sanguines matures¹. Au final, 1 000 à 10 000 plaquettes seront produites en 5 à 7 jours à partir d'un mégacaryocyte. Elles auront une durée de vie de 7 à 10 jours dans le sang⁵.

[Figure 2] : Schéma de la production plaquettaire, d'après Machlus et Italiano 2013¹



La mégacaryocytopoïèse est régulée par différents facteurs de transcription, mais également des cytokines dont la plus connue est la thrombopoïétine (TPO), qui joue un rôle majeur en stimulant la prolifération et la maturation des mégacaryocytes, mais également la formation des plaquettes. D'autres facteurs de transcription régulent la mégacaryocytopoïèse et sont résumés sur la figure 3. Parmi eux, GATA1, RUNX1 et Fli1 semblent jouer un rôle majeur dans biogénèse des granules denses puisque des mutations les touchant sont associées à des anomalies des granules plaquettaires⁶.

[Figure 3] : Résumé des facteurs de transcription et leurs cibles impliqués dans les différents stades de la mégacaryocytopoïèse⁶



Légende :

La différenciation mégacaryocytaire tardive implique l'endomitose, la maturation cytoplasmique et la formation de proplaquettes. Les facteurs de transcription (en noir) et leurs gènes cibles (en gris) indiqués jouent un rôle dans ces processus. Certains d'entre eux affectent également la fonction plaquettaire. La flèche indique à quelles étapes les facteurs de transcription sont impliqués (bleu correspondant à une évidence forte, gris à une évidence faible).

Dans cette revue de la littérature, nous nous intéresserons particulièrement aux anomalies des granules denses plaquettaires, après avoir rappelé les mécanismes impliqués dans leur biogénèse, ainsi que leur structure et leur rôle.

2) Biogénèse des granules denses plaquettaires

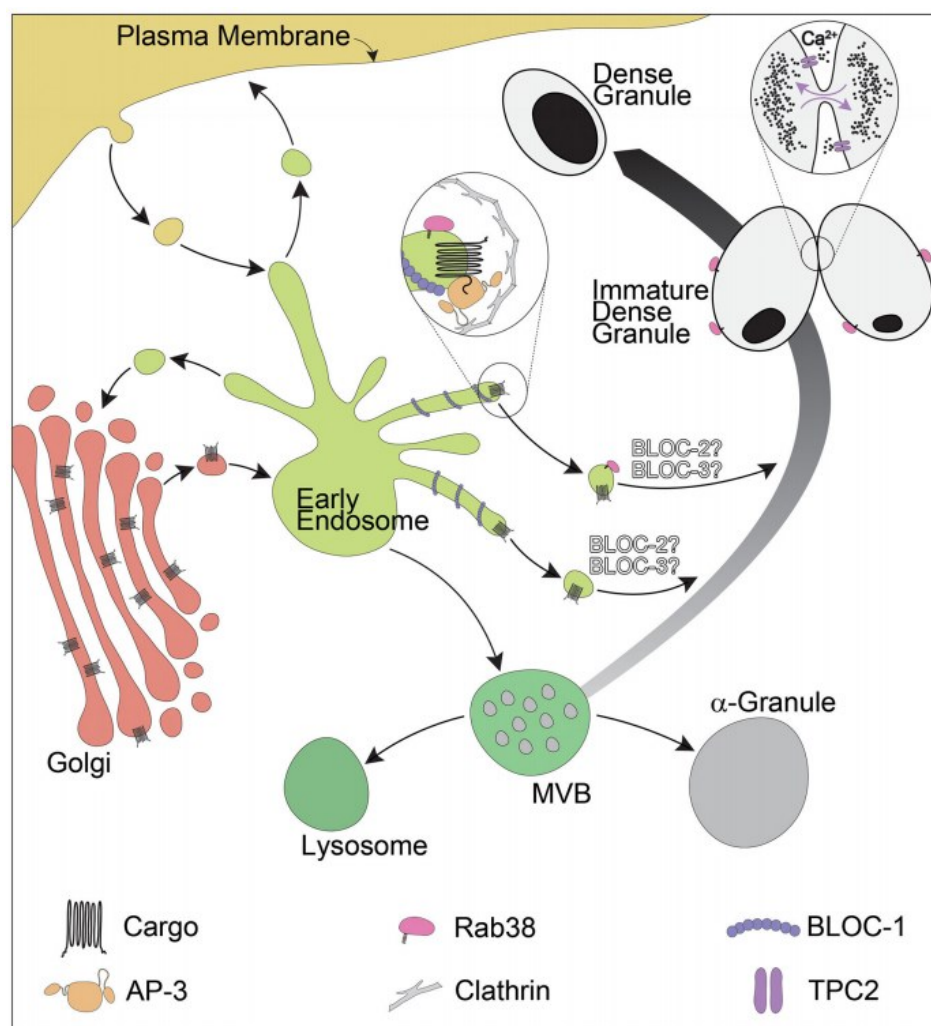
Les granules denses, physiologiquement présents dans le cytoplasme des plaquettes sanguines, sont des « organites apparentés aux lysosomes » (LROs en anglais pour « *Lysosome-related Organelles* »), tout comme les mélanosomes des mélanocytes, les granules lytiques des lymphocytes T et NK, les granules des polynucléaires, les corps lamellaires des cellules épithéliales pulmonaires de type II, les granules neuromélaniques des neurones catécholaminergiques, certaines structures du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II ou bien encore les corps de Weibel-Palade des cellules endothéliales⁷. Les LROs partagent des caractéristiques avec les lysosomes (hydrolases acides vésiculaires permettant la dégradation moléculaire) mais possèdent une morphologie, une composition et/ou des fonctions spécialisées distinctes.

Les mégacaryocytes étant difficiles à isoler, à cultiver et à manipuler, les mécanismes cellulaires précis concourant à la biogénèse des granules denses sont encore incomplètement connus, tout comme les gènes impliqués dans ce processus.

Plusieurs protéines sont néanmoins identifiées comme jouant un rôle dans la genèse des LROs, y compris des granules denses, notamment les protéines « BLOC » (*Biogenesis of Lysosome-derived Organelles Complex*), réparties en trois complexes distincts, BLOC-1, BLOC-2 et BLOC-3, mais aussi la protéine « AP-3 » (*Adaptator Protein-3*)⁷.

La figure 4 proposée par *Ambrosio et al.* en 2017⁸ décrit une cascade qui serait à l'origine de la biogénèse des granules denses, avec un rôle propre à chaque complexe.

[Figure 4] : Biogenèse des granules denses plaquettaires⁸



Contrairement à la plupart des granules sécrétoires produits dans d'autres types de cellules, les granules denses ne proviennent pas directement du réseau trans-Golgi. Leur biogenèse implique un mécanisme de biosynthèse spécialisée qui relie les voies sécrétoires et endocytaires.

D'abord, les domaines vacuolaires du système endosomal donnent naissance à des corps multivésiculaires (MVB) qui sont les précurseurs des granules denses, alpha et des lysosomes. Deux hypothèses existent, il pourrait se produire une différenciation des MVB en granules denses, alpha et lysosomes au cours d'un processus continu de maturation et remodelage d'un même compartiment ; ou un bourgeonnement d'un granule dense immature à partir d'un MVB.

Néanmoins, le développement du granule dense nécessite l'incorporation de protéines spécifiques néosynthétisées, telles que les transporteurs de la sérotonine et de l'ADP⁸.

La voie de maturation qui fait intervenir les complexes de protéines adaptatrices (AP), notamment AP-3, est celle qui est la mieux élucidée actuellement. Comme le montre la figure 4 : au niveau des expansions cytosoliques des endosomes précoces, qui sont probablement stabilisés par BLOC-1, AP-3 conditionne et orchestre la formation des vésicules de transport des protéines membranaires (via les protéines cargo et la clathrine), facilitant la formation des vésicules qui participeront à la formation des granules denses immatures.

BLOC-1 est un complexe polyvalent qui possède des rôles dans la biogenèse membranaire, le tri des protéines ainsi que le trafic vésiculaire et membranaire (notamment dans la biogenèse des LROs). Il est constitué d'au moins 8 protéines (cappuccino, dysbindin, snapin, palidin et les sous-unités 1, 2, 3 et 5 de BLOC-1).

La protéine Rab38 est présente sur la vésicule de transport et médie le ciblage de la vésicule vers le granule dense en maturation.

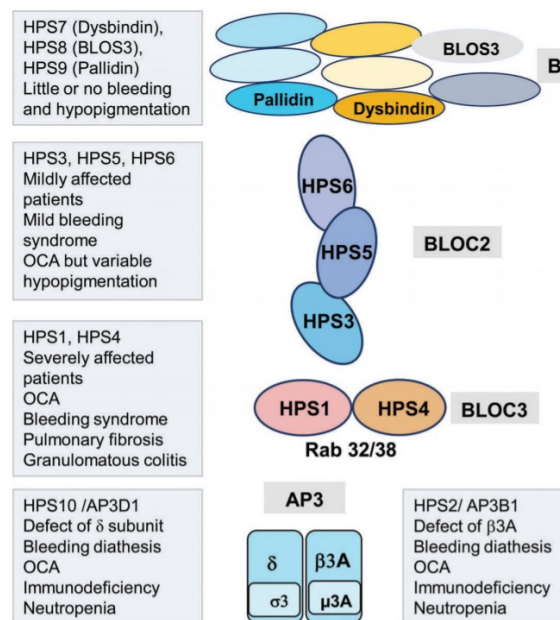
On sait très peu de choses sur la fonction de BLOC-2 et BLOC-3 dans la biogenèse du granule dense. Sur la base de la recherche sur les mélanosomes, ils sont provisoirement placés en aval de la voie faisant intervenir BLOC-1 et AP-3, mais ils pourraient également intervenir de façon indépendante dans une voie annexe, comme figuré sur l'image.

BLOC-2 est un complexe composé de 3 protéines (HPS3, HPS5 et HPS6) impliqué dans le transport et la maturation des organites, en coopération avec des GTPases telles que Rab32 et Rab38⁹.

BLOC-3 est un complexe qui favorise l'expression du transporteur MRP4. Cette glycoprotéine membranaire des granules denses plaquettaires participe au transport des nucléotides du cytoplasme vers l'intérieur des granules, permettant ainsi le stockage de l'adénosine triphosphate (ATP) et de l'adénosine diphosphate (ADP), nécessaires à l'activation et l'agrégation des plaquettes. Il est composé de 2 protéines : HPS1 et HPS4⁹.

La figure 5, tirée de la publication de *Nurden* en 2021¹⁰, regroupe les 4 complexes protéiques impliqués dans différentes étapes de la biogenèse des organites liés aux lysosomes (LRO), contenant chacun plusieurs sous-unités. Les conséquences cliniques associées à des anomalies de ces complexes sont données à titre indicatif dans les encadrés, et seront détaillées plus loin dans le manuscrit.

[Figure 5] : Composition des complexes protéiques BLOC-1, 2 et 3 et AP-3¹⁰



La protéine LYST, codée par le gène du même nom, serait impliquée dans la biogenèse des MVB, et notamment dans l'assemblage des endosomes et lysosomes matures, ainsi que la régulation du trafic membranaire¹¹.

Il est par ailleurs admis que la sérotonine, composant spécifique des granules denses plaquettaires, est produite par les cellules entérochromes de l'intestin avant d'être capturée par les plaquettes sanguines grâce au récepteur membranaire SERT, puis incorporée dans les granules denses via le transporteur VMAT2⁹.

Les mécanismes régulant la concentration des cations divalents au sein des granules denses sont encore peu élucidés. La protéine membranaire TPC2n qui est un canal ionique pourrait jouer un rôle en régulant l'incorporation du Ca^{2+} , le pH des granules denses, ainsi que certains mécanismes d'échanges^{8,9}.

Les déficits en granules denses plaquettaires constituent un groupe hétérogène d'anomalies pouvant impacter la biogenèse des granules, aboutissant à un nombre et/ou un contenu en petites molécules anormal. Ils sont regroupés sous le nom de « maladie du pool vide delta-plaquettaire », et seront développés plus en détails dans la suite de ce travail.

II. Structure des plaquettes

L'analyse des plaquettes au microscope électronique a permis une meilleure connaissance de leur ultrastructure mais aussi des organites qu'elles contiennent¹².

[Figure 6] : Ultrastructure plaquettaire en microscopie électronique en transmission¹²

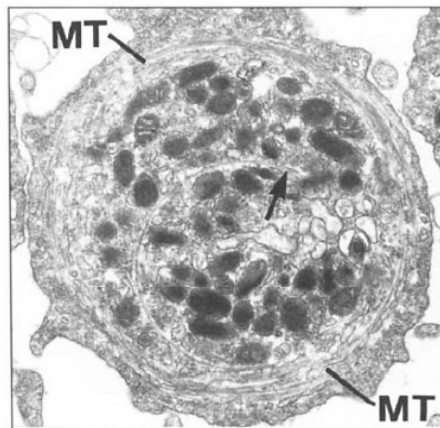
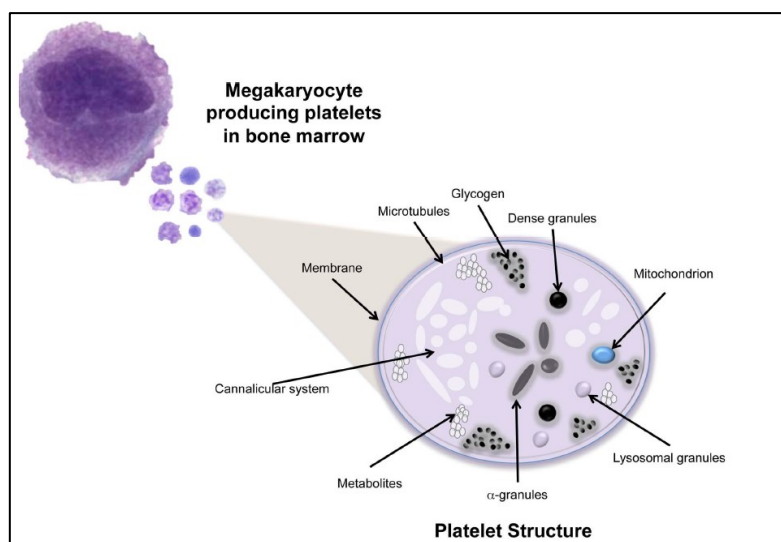


Figure 11. Platelet as it circulates in normal peripheral blood. Like the MK, it has a peripheral organelle-free zone which is usually separated from the organelles by the band of microtubules (MT), which may end like a spiral in the middle of the cytoplasm (arrow). The mitochondria and α -granules are randomly distributed. Magnification $\times 17,000$.

Ces dernières sont ainsi composées d'une zone périphérique et d'une zone interne, comme le montrent les figures 6 et 7¹³.

[Figure 7] : Structure de la plaquette¹³

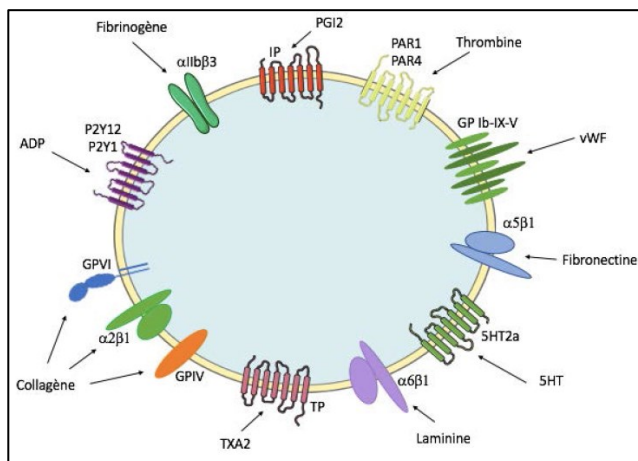


1) Zone périphérique

La zone périphérique comprend le glycocalyx, la membrane plasmique et les systèmes membranaires. De l'extérieur vers l'intérieur de cette cellule, on trouve :

- Le glycocalyx, composé de glycosaminoglycanes, qui constitue un revêtement de surface et l'interface permettant aux plaquettes d'interagir avec leur environnement.
- La membrane plasmique, qui est une bicouche lipidique constituée essentiellement de phospholipides, et dans laquelle sont ancrées de multiples protéines, et notamment les récepteurs de surface des plaquettes, comme le montre la figure 8.

[Figure 8] : Récepteurs de surface plaquettaires¹⁴



TXA2 = thromboxane A2

5HT = sérotonine

vWF = facteur Willebrand

PGI2 = prostacycline

ADP = adénosine diphosphate

Les récepteurs de surface plaquettaires sont essentiellement constitués de glycoprotéines membranaires de type intégrines ($\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$, $\alpha\text{2}\beta\text{1}$, $\alpha\text{5}\beta\text{1}$, $\alpha\text{6}\beta\text{1}$), d'immunorécepteurs à motifs ITAM (*immuno-tyrosine based activation motifs*) tels que la GPIIb/IIIa, ou à motifs riches en leucines (GPIb/IX-V), qui sont des récepteurs pour les protéines adhésives. Les récepteurs des agonistes solubles sont couplés aux protéines G, de type récepteurs à 7 domaines transmembranaires (P2Y_{12} et P2Y_1 , IP, 5HT_{2A}, TP α , PAR1 et PAR4).

- Deux systèmes de canaux membranaires sont également présents : le Système Canaliculaire Ouvert (SCO) et le Système Tubulaire Dense (STD).

Le SCO forme des invaginations membranaires ouvertes sur l'environnement extracellulaire, et constitue ainsi une réserve de membrane permettant des échanges

rapides entre la plaquette et son environnement immédiat. Ce système participe notamment au phénomène d'endocytose de molécules/protéines par la plaquette et à la sécrétion du contenu des granules lors de l'activation plaquettaire.

Le STD est un système membranaire non connecté à la surface, constitué de tubules courts, aplatis et denses aux électrons dérivant du réticulum endoplasmique mégacaryocytaire. Il contient des enzymes de la voie de synthèse des prostaglandines et joue un rôle important dans le stockage d'ions calcium (Ca^{2+}), notamment en intervenant dans la régulation de leur concentration cytosolique au cours de l'activation plaquettaire¹⁵.

2) Cytoplasme

La zone interne des plaquettes correspond au cytoplasme, constitué du cytosquelette et de différentes organelles.

- Le cytosquelette situé à la périphérie du cytoplasme a un rôle majeur dans le maintien de la forme discoïde des plaquettes au repos par le biais d'un anneau périphérique de microtubules, tandis que les microfilaments d'actine, la myosine et d'autres protéines associées à l'actine assurent la flexibilité de cette véritable « charpente ».
- Le granulomère correspond à une zone du cytoplasme très riche en organites, principalement des mitochondries, des inclusions de glycogène en amas et différents types de granulations. Il possède un rôle majeur dans les fonctions plaquettaires par libération de son contenu lors de l'activation plaquettaire. En effet, en réponse à divers stimuli extérieurs, tels que le collagène, la thrombine ou le thromboxane A2, la plaquette peut libérer le contenu de ses organites par des phénomènes d'exocytose conduisant à la fusion de la membrane des granulations avec la membrane plasmique¹⁶.

Nous allons nous intéresser tout particulièrement à ces organites cellulaires spécifiques contenus dans le cytoplasme des plaquettes, appelés « granules » ou « granulations intraplaquettaires », délimités par une simple membrane et dont le contenu spécifique les caractérise⁹.

3) Structure des granules plaquettaires

On dénombre 3 types de granules sécrétoires dans les plaquettes¹⁷.

Les « **granules alpha** » sont les plus grands granules sécrétoires puisqu'ils mesurent 200 à 500 nm de diamètre, et les plus nombreux puisqu'on en compte de 50 à 80 par plaquette. Ils représentent le site majeur de stockage des protéines dans les plaquettes, dont le contenu est listé dans le tableau 1¹⁸.

[Tableau 1] : Contenu des granules alpha plaquettaires¹⁸

Type	Examples
Integral membrane proteins	α Ib β 3, GPIb α -IX-V, GPVI, TLT-1, P-selectin
Coagulants, anticoagulants, and fibrinolytic proteins	Factor V, factor IX, factor XIII, antithrombin, protein S, tissue factor pathway inhibitor, plasminogen, plasminogen activator inhibitor 1, α_2 -macroglobulin
Adhesion proteins	Fibrinogen, von Willebrand factor, thrombospondin
Chemokines	CXCL1 (GRO- α), CXCL4 (PF4), CXCL5 (ENA-78), CXCL7 (PBP, β -TG, CTAP-III, NAP-2), CXCL8 (IL-8), CXCL12 (SDF-1 α), CCL2 (MCP-1), CCL3 (MIP-1 α), and CCL5 (RANTES)
Growth factors	Epidermal growth factor, hepatocyte growth factor, insulin-like growth factor, transforming growth factor β
Angiogenic factors and inhibitors	Vascular endothelium growth factor, fibroblast growth factor, platelet-derived growth factor, tissue inhibitors of metalloproteinases, angiostatin, endostatin
Microbicidal proteins	Thymosin- β 4, thrombocidins 1 and 2 (from NAP-2)
Immune mediators	Complement C3 precursor, complement C4 precursor, β 1H Globulin, factor D, factor H, C1 inhibitor, IgG

Ils contiennent des récepteurs membranaires, des protéines coagulantes, anticoagulantes et fibrinolytiques, des protéines d'adhésion, des chimiokines, des facteurs de croissance, pro- et anti-angiogéniques, des protéines microbicides et des médiateurs de l'immunité¹⁶.

Les « **granules denses ou delta** » sont plus petits et ils mesurent environ 150 nm de diamètre. Ils sont beaucoup moins nombreux que les granules alpha, bien que les valeurs usuelles retrouvées dans la littérature soient variables. Nous détaillerons cette limite dans un chapitre ultérieur, mais nous pouvons tout de même retenir un nombre normal de 3 à 8 granules denses par plaquette selon la revue de *Fiore et al.* publiée en 2017¹⁹.

Le nom de ces granules vient de leur grande richesse en ions, notamment calciques (Ca^{2+}), qui leur permet d'apparaître naturellement denses aux électrons en microscopie électronique, sans nécessiter d'étape de marquage ou de contraste.

Les granules denses constituent le site de stockage de petites molécules non protéiques et de facteurs jouant un rôle dans la potentialisation de l'activation plaquettaire. On y trouve¹⁹ :

- Des cations :
 - Divalents de magnésium (Mg^{2+}) et surtout de calcium (Ca^{2+}), présents en très fortes concentrations (2 M pour le Ca^{2+}), et indispensables à l'activation plaquettaire et à la coagulation sanguine.
 - Monovalents de potassium (K^+).
- Des amines bioactives :
 - Sérotonine : 90 % de la sérotonine circulante de l'organisme est contenue dans les granules denses plaquettaires. De plus, elle est absente des autres lignées sanguines, ce qui fait de cette molécule un marqueur spécifique des granules denses plaquettaires.
 - Histamine
- Des nucléotides :
 - ADP et ATP (adénosine di- et triphosphate) sont présentes à des concentrations élevées au sein des granules denses (respectivement 0,4 et 0,6 M). L'ATP est également retrouvée de façon significative dans le cytoplasme des plaquettes, sous forme libre, et dans les mitochondries, liée à l'actine (pool métabolique), expliquant qu'elles contiennent globalement plus d'ATP que d'ADP (ratio total ATP/ADP : 1,5-2,0). Les plaquettes contiennent ainsi environ 5 à 6 μmol d'ATP et 3 à 3,5 μmol d'ADP pour 10^{11} plaquettes²⁰.
En revanche, au sein des granules denses, le pool non métabolique de nucléotides plaquettaires est majoritairement constitué d'ADP, avec un ratio ATP/ADP de 0,65 à 0,78²⁰. Il représente environ 2/3 du pool total de nucléotides plaquettaires et provient du précurseur mégacaryocytaire¹⁹.
 - UTP (uridine triphosphate), GTP (guanosine triphosphate)

- Des phosphates : pyrophosphates et polyphosphates présents en grande quantité dans les granules denses, et ayant un rôle probable dans la régulation de la cascade de la coagulation et dans la réponse inflammatoire²¹.
- La membrane des granules denses contient aussi des récepteurs, tels que CD63, GPIIb/IIIa (α IIb β 3), GPIb/IX/V et LAMP-2 (CD107b).

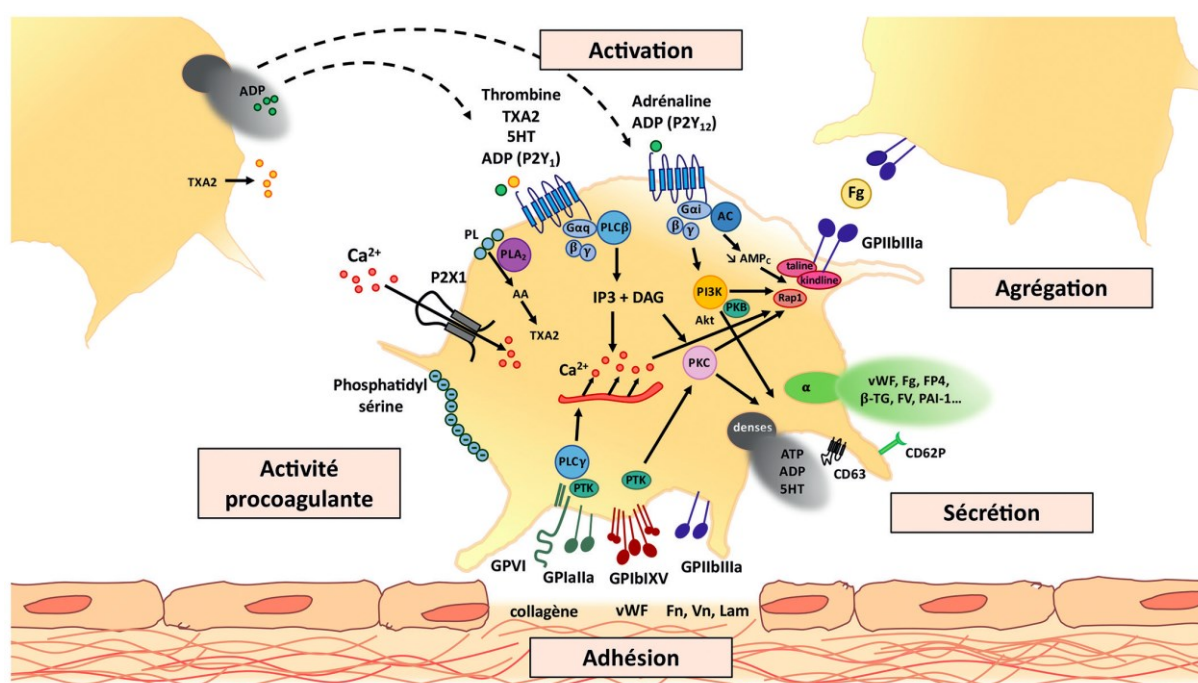
Les « **lysosomes** » sont des organites cellulaires apparentés à des granules plaquettaires de taille intermédiaire (200 à 250 nm de diamètre) et très peu nombreux (moins de 3 par plaquette). Ils sont associés à la digestion intracellulaire d'éléments absorbés ou contenus dans la cellule grâce à leurs nombreuses hydrolases acides (protéases, glycosydases, phosphatases). Ils ont ainsi un rôle clé dans la dégradation des récepteurs plaquettaires internalisés. Les protéines les plus abondantes de leur membrane sont LAMP-1, LAMP-2, et CD63¹⁹.

III. Rôle des plaquettes dans l'hémostase

L'hémostase regroupe l'ensemble des phénomènes physiologiques concourant à la prévention et l'arrêt des saignements. Elle est schématiquement découpée en 3 étapes : l'hémostase primaire, la coagulation et la fibrinolyse.

Les plaquettes jouent un rôle majeur au cours de l'hémostase primaire²², en permettant la formation d'un thrombus plaquettaire occlusif limitant la perte sanguine. Elles forment également une surface procoagulante, servant de support à la fibrinoformation, sur laquelle les facteurs de la coagulation vont interagir pour former un caillot de fibrine solide dont le rôle est d'arrêter durablement le saignement. La physiologie plaquettaire peut schématiquement être divisée en différentes étapes, représentées sur la figure 9.

[Figure 9] : Grandes étapes de la physiologie plaquettaire²³



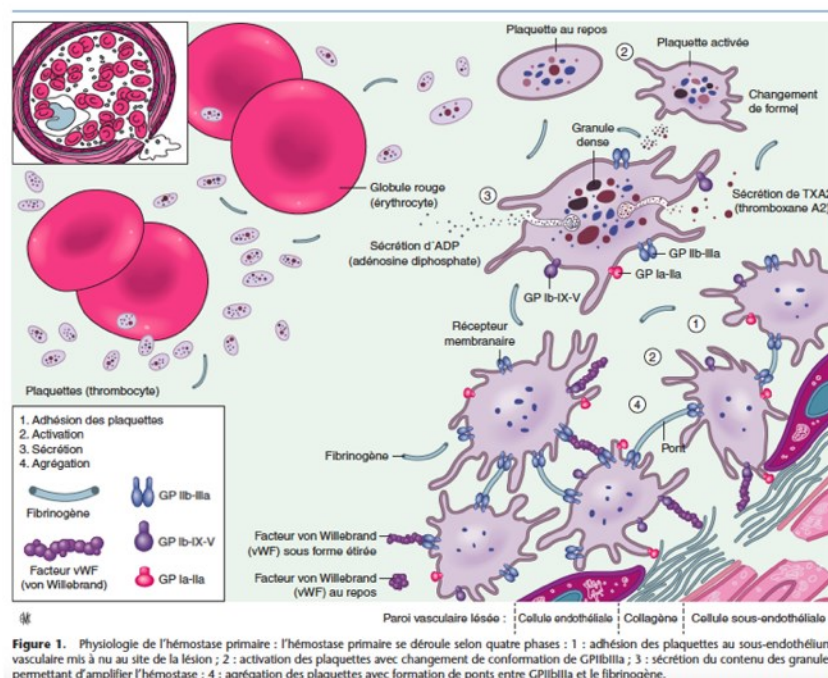
Légende : AA : acide arachidonique ; ADP : adénosine diphosphate ; AMPc : adénosine monophosphate cyclique ; ATP : adénosine triphosphate ; Ca^{2+} : ions calcium ; DAG : diacylglycérol ; Fn : fibronectine ; Fg : fibrinogène ; FP4 : facteur plaquettaire 4 ; FV : facteur V ; IP3 : inositol triphosphate ; Lam : laminine ; PAI-1 : inhibiteur de l'activateur du plasminogène-1 ; PKB : protéine kinase B ; PKC : protéine kinase C ; PL : phospholipide ; PLC : phospholipase ; PTK : protéines tyrosines kinases ; TXA : thromboxane A2 ; Vn : vitronectine ; vWF : facteur von Willebrand ; 5HT : sérotonine ; b-TG : b-thromboglobuline.

Au décours d'une brèche vasculaire, le sous-endothélium, riche en protéines d'adhérence telles que le collagène et le facteur von Willebrand (vWF), se retrouve au contact

des cellules sanguines. Le vaisseau sanguin lésé subi une vasoconstriction réflexe permettant de limiter la perte sanguine, d'augmenter les forces de cisaillement et de favoriser la margination des cellules, notamment des plaquettes.

L'hémostase primaire se déroule alors en plusieurs étapes successives, schématisées sur la figure 10, toutes nécessaires à la formation d'un thrombus plaquettaire. L'adhésion des plaquettes au sous-endothélium vasculaire déclenche une cascade d'activation intraplaquettaire. L'amplification de l'activation plaquettaire fait notamment intervenir la sécrétion des granules et permet, in fine, l'agrégation plaquettaire.

[Figure 10] : Physiologie de l'hémostase primaire²⁴



1) Adhésion plaquettaire

Lors d'une brèche vasculaire, le sous-endothélium est mis à nu et exposé au flux sanguin. Les protéines d'adhérence du sous-endothélium sont soumises à des forces de cisaillement élevées. La liaison du facteur Willebrand sous-endothélial à son récepteur plaquettaire, le complexe glycoprotéique GPIbIXV, permet le recrutement des plaquettes au niveau de la brèche vasculaire. Cette adhérence initiale favorise le roulement (ou « rolling ») des plaquettes sur le sous-endothélium, leur ralentissement, puis leur adhérence irréversible

au niveau de la brèche, par le biais d'interactions stabilisatrices entre le collagène et des intégrines membranaires, telles que GPIIb/IIIa et GPVI.

L'adhérence irréversible des plaquettes déclenche alors une cascade de signalisation intracellulaire entraînant l'activation plaquettaire.

2) Activation plaquettaire

La cascade d'activation intraplaquettaire qui résulte de l'adhésion est associée à une élévation rapide de la concentration cytosolique en calcium (Ca^{2+}), et elle est renforcée par la thrombine, la sérotonine, l'adrénaline, le thromboxane A2 (TXA2) et l'adénosine diphosphate (ADP), qui se fixent à divers récepteurs membranaires couplés aux protéines G²³.

A ce titre, l'élévation intracytosolique du calcium est un événement précoce et essentiel pour l'activation des plaquettes. Cette mobilisation intracellulaire de Ca^{2+} résulte à la fois de son afflux depuis le milieu environnant et de sa libération à partir des sites de stockage intracellulaires (principalement le système tubulaire dense).

L'activation plaquettaire est associée à différents événements : changement de forme des plaquettes, exposition membranaire de phospholipides anioniques, synthèse de thromboxane A2, sécrétion du contenu des granules, activation et changement de conformation de l'intégrine GPIIb/IIIa, concourant *in fine* à l'agrégation plaquettaire et promouvant la coagulation.

Lorsqu'elles s'activent, les plaquettes deviennent sphériques, et s'étalent sur la surface d'adhésion en formant des pseudopodes par réorganisation de leur cytosquelette. Leur membrane plasmique subit aussi des modifications, notamment un remaniement des phospholipides membranaires, permettant la réexposition de phospholipides anioniques à la surface des plaquettes, processus nécessaire à leur activité procoagulante²³.

Deux voies concourent à l'amplification de l'activation plaquettaire médiée par le TXA2 et l'ADP : d'une part, la synthèse de TXA2 à partir des phospholipides membranaires, et

d'autre part, la sécrétion du contenu des différentes granules par fusion avec la membrane plasmique. Ces phénomènes libèrent de nombreuses substances pro-agrégantes (ADP, sérotonine, TXA₂), procoagulantes (comme le facteur V) et vasomotrices (monoxyde d'azote, sérotonine, TXA₂).

Enfin, une cascade de signalisation appelée « inside-out » concoure au changement de conformation de l'intégrine membranaire GPIIb/IIIa¹⁴. Cette dernière acquiert alors une conformation de forte affinité pour ses ligands, lui permettant notamment de fixer le fibrinogène en présence de calcium, afin de créer des ponts inter-plaquettaires qui permettront la formation des agrégats.

Le processus d'activation plaquettaire dans sa globalité permet ainsi la constitution d'un micro-environnement localisé favorable à l'agrégation plaquettaire et au bon déroulement de la coagulation sanguine.

3) Agrégation plaquettaire

L'agrégation plaquettaire est la dernière étape de l'hémostase primaire, permettant l'obtention d'un thrombus plaquettaire. Elle résulte de la formation de ponts entre les plaquettes, principalement par l'intermédiaire du fibrinogène et des intégrines GPIIb/IIIa préalablement activées. Elle est aussi favorisée par d'autres interactions, impliquant notamment le facteur Willebrand.

Au total, l'hémostase primaire peut se résumer de la façon suivante : le sous-endothélium pro-thrombogène est exposé lors d'une brèche vasculaire. Des interactions moléculaires, comme celle qui a lieu entre le facteur von Willebrand et l'intégrine GPIb/IX/V plaquettaire, provoquent le ralentissement, l'arrêt puis l'activation des plaquettes sanguines. Les premières plaquettes mobilisées sécrètent différents composés permettant le recrutement et l'activation d'autres plaquettes environnantes, et la formation d'un thrombus plaquettaire grâce à l'interaction du fibrinogène avec l'intégrine plaquettaire GPIIb/IIIa. Le thrombus sera ensuite consolidé par la fibrine produite par la coagulation.

IV. Rôle des granules denses plaquettaires dans l'hémostase

Lors de l'activation plaquettaire, la fusion des granules denses avec la membrane plasmique permet la sécrétion de leur contenu dans le milieu extérieur, comme représenté sur la figure 10.

Ce phénomène joue un rôle clé à la fois dans l'initiation et l'amplification de l'activation plaquettaire, par fixation des molécules ainsi libérées à des récepteurs plaquettaires par un mécanisme à la fois autocrine et paracrine.

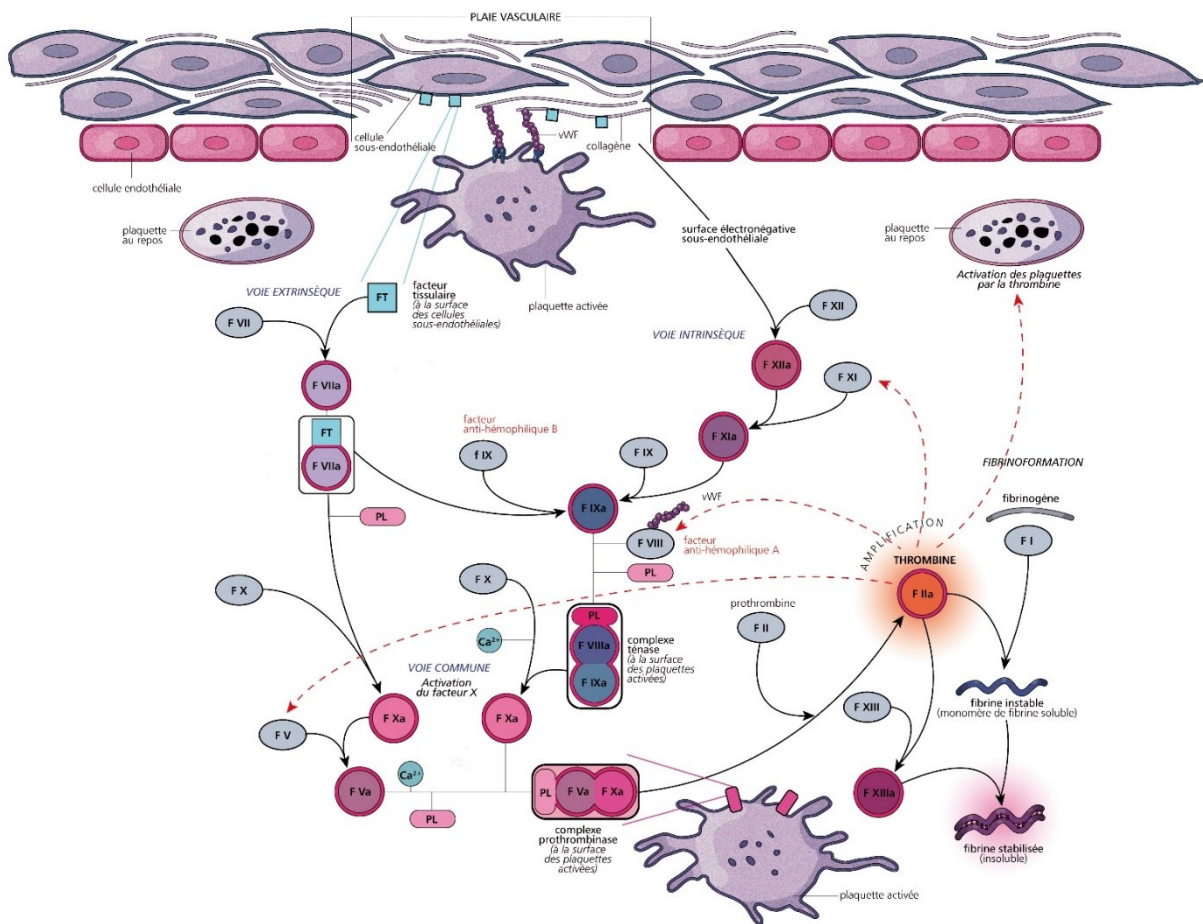
Plus précisément, l'ADP sécrétée par les granules denses se fixe sur ses deux récepteurs plaquettaires spécifiques, P2Y₁ et P2Y₁₂. La fixation de l'ADP au récepteur P2Y₁ entraîne le changement de forme et l'initiation de l'activation et de l'agrégation plaquettaire, tandis que sa fixation au récepteur P2Y₁₂ participe aux phénomènes d'amplification, qui permettent d'aboutir à une agrégation irréversible et une stabilisation du thrombus¹⁹. La cascade de signalisation incluant ADP/P2Y₁₂ a un rôle central dans l'hémostase primaire. Une preuve étant que parmi les traitements antiplaquettaires les plus efficaces actuellement utilisés, on peut compter ceux ciblant spécifiquement la cascade de rétrocontrôle positif ADP/P2Y₁₂. En bloquant les récepteurs P2Y₁₂, ils limitent l'activation et l'agrégation plaquettaires et sont particulièrement efficaces dans la prise en charge des maladies cardiovasculaires²².

La sécrétion des granules denses est également importante pour la coagulation, puisqu'elle permet de libérer de grandes quantités d'ions calcium, nécessaires aux interactions entre les différents facteurs et les plaquettes pro-coagulantes.

De plus, les polyphosphates hautement anioniques synthétisés à partir de l'ATP, et contenus en grande quantité dans les granules denses plaquettaires, pourraient favoriser la coagulation et les phénomènes thrombotiques en favorisant l'activation du facteur XII (FXII)²¹. Ils pourraient aussi potentialiser la génération de thrombine et améliorer la stabilité du caillot de fibrine²². Les polyphosphates plaquettaires seraient ainsi des médiateurs pro-coagulants et

pro-inflammatoires. Produits et libérés par les plaquettes, ils activent le facteur de coagulation sanguine de la voie contact XII, qui est essentiel à la formation de caillots sanguins, comme le montre la figure 11 (facteur situé en haut à droite de la cascade). Le FXII initie la formation de fibrine et la génération d'un médiateur pro-inflammatoire, la bradykinine, qui contribue aux fuites des vaisseaux sanguins et à la thrombose. De plus, les polyphosphates assureraient d'autres fonctions, telles que constituer des réservoirs d'énergie (ATP) et de phosphates, et participer à la chélation du calcium et d'autres ions métalliques divalents (par formation de complexes insolubles)²¹ et aux capacités tampon contre les bases⁹.

[Figure 11] : Représentation de la coagulation plasmatique²⁵



Partie 2 : Anomalies des fonctions plaquettaires

I. Les grands types de thrombopathies

Les thrombopathies constituent un groupe hétérogène d'anomalies plaquettaires responsables de saignements cutanéomuqueux parfois sévères²³. Elles sont caractérisées par un trouble de fonctionnement des plaquettes sanguines, parfois associé à des anomalies morphologiques et/ou de nombre des plaquettes²⁶.

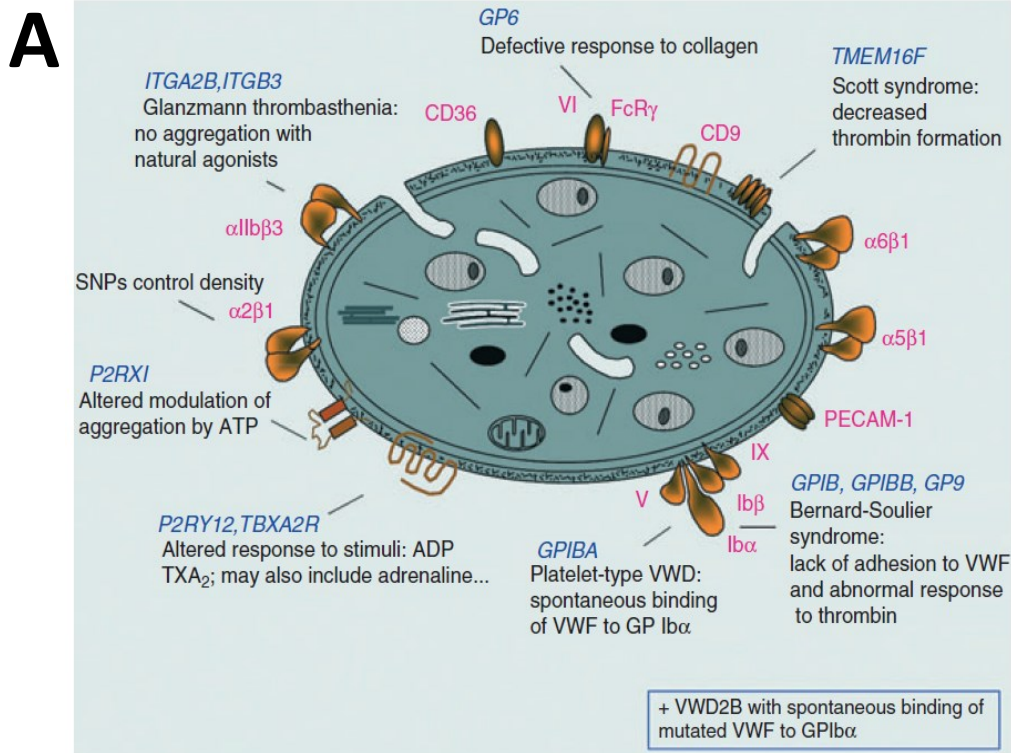
Tandis que les thrombopathies acquises s'observent fréquemment au cours d'hémopathies malignes, de connectivites, en cas d'insuffisance rénale ou hépatique, ou lors de la prise de certains médicaments⁴ ; les thrombopathies constitutionnelles sont rares, avec une prévalence estimée à 1 cas pour 30 000 individus en France²⁶, bien que ce chiffre soit possiblement sous-estimé du fait de la grande hétérogénéité de ces pathologies et des difficultés pour les diagnostiquer.

Si des anomalies peuvent exister à chacune des étapes de la physiologie plaquettaire, les thrombopathies sont classiquement réparties en différents groupes physiopathologiques : anomalies de l'adhésion plaquettaire, de la voie de synthèse du TXA₂, des voies de signalisation, des granules (denses ou alpha), de la réexposition des phospholipides anioniques, du cytosquelette et de l'agrégation plaquettaire.

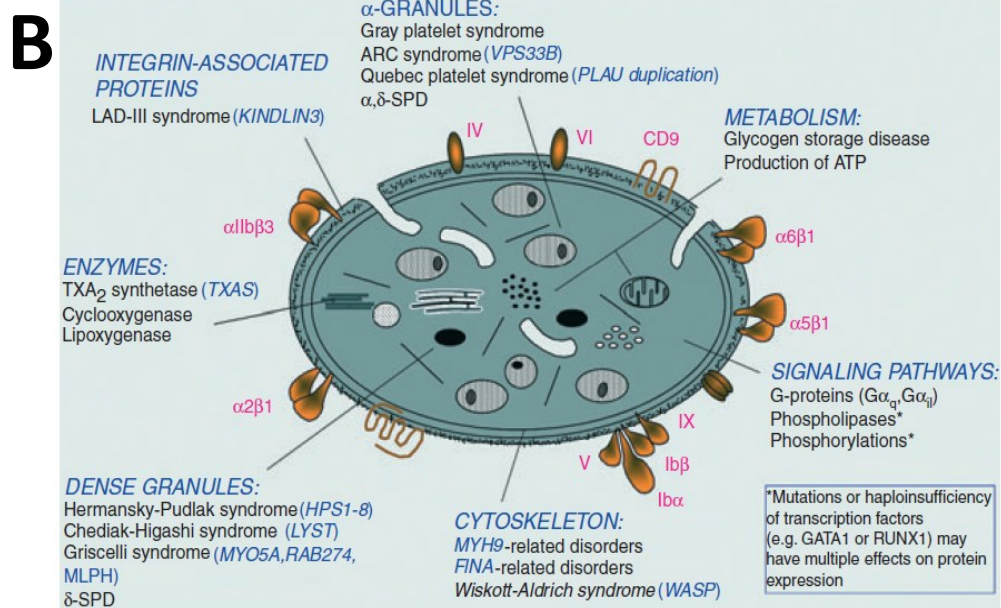
Plusieurs revues abordent de façon détaillée les différentes thrombopathies constitutionnelles identifiées et leurs caractéristiques¹¹, et nous ciblerons notre propos sur les anomalies des granules denses plaquettaires dans la suite de cette revue.

De façon non exhaustive, la figure 12, tirée de la revue de A. et P. Nurden parue dans *Journal of Thrombosis and Haemostasis* en 2011, regroupent différentes thrombopathies, associées à des anomalies des composants membranaires (figure 12A) ou des composants intracellulaires plaquettaires (figure 12B)¹¹.

[Figure 12] : Thrombopathies associées à des anomalies des composants membranaires (A) ou intracellulaires (B) plaquettaires¹¹



Légende figure 12A : Représentation des thrombopathies associées à des anomalies des composants membranaires (en rose), avec les gènes touchés (en bleu).



Légende figure 12B : Représentation des thrombopathies associées à des anomalies des composants intracellulaires (en bleu), avec les gènes touchés (entre parenthèses).

II. Anomalies des granules denses plaquettaires

La « maladie du pool vide delta-plaquettaire » constitue un groupe de maladies hétérogènes caractérisées par la présence d'un déficit quantitatif (affectant le nombre de granules) et/ou qualitatif (affectant le contenu) en granules denses¹⁹.

Les étiologies de cette pathologie sont diverses : on distingue les formes constitutionnelles qui peuvent être isolées (non-syndromiques) ou s'inscrire dans le cadre de syndromes plus complexes, et les formes acquises qui sont le plus souvent associées à des hémopathies malignes.

Les anomalies des granules denses plaquettaires représentent la deuxième cause de thrombopathies constitutionnelles diagnostiquées en France après la Thrombasthénie de Glanzmann, qui touche environ 500 personnes dans le pays.

En effet, une étude rétrospective menée en France en 2017 à partir des cartes de soins délivrées par le CRPP (Centre français de Référence des Pathologies Plaquettaires) à 283 patients atteints de thrombopathies, a montré que 25 % des patients présentaient un déficit en granules denses, contre 56 % qui avait une Thrombasthénie de Glanzmann^{19,26}. Ces données corroborent avec celles de la littérature, rapportant des anomalies des granules denses plaquettaires chez 15 à 23,2 % des patients diagnostiqués avec un trouble fonctionnel plaquettaire²⁷⁻²⁹.

Cependant, la littérature met également en avant un probable sous-diagnostic des atteintes des granules denses, notamment dans leurs formes isolées¹⁹. En effet, la maladie du pool vide delta-plaquettaire est encore peu connue des praticiens et son diagnostic biologique est relativement complexe car il s'appuie sur des tests biologiques et équipements ultraspécialisés, souvent coûteux et mal standardisés. A ce titre, une étude multicentrique internationale publiée par la Société Internationale d'Hémostase et Thrombose (ISTH) en 2014 rapporte que sur 202 laboratoires répartis dans 37 pays, plus de la moitié n'évaluaient pas les granules plaquettaires lors de la recherche d'une thrombopathie constitutionnelle³⁰.

1) Manifestations cliniques

Les thrombopathies constitutionnelles sont classiquement caractérisées par des manifestations hémorragiques cutanéomuqueuses, comme des épistaxis, gingivorragies, ecchymoses faciles, saignements prolongés après une plaie mineure, hématuries, saignements digestifs, méno/métrorragies chez la femme, mais également des saignements abondants après des actes invasifs.

Le caractère constitutionnel des saignements sera soutenu par la notion d'antécédents hémorragiques familiaux, et l'absence de pathologie sous-jacente (hémopathie notamment) ou d'ingestion de substances (médicamenteuses ou alimentaires) responsables de thrombopathies acquises²³.

Les formes les plus sévères, de transmission autosomale récessive, sont souvent repérées très tôt dans l'enfance (typiquement les anomalies de l'agrégation ou de l'adhésion, comme la Thrombasthénie de Glanzmann ou le syndrome de Bernard-Soulier). Cependant, de nombreuses anomalies induisent un phénotype hémorragique plus variable, le plus souvent modéré, avec une pénétrance variable au sein d'une même famille, et ne sont parfois découvertes qu'à l'âge adulte au décours d'un acte invasif ou en péri-partum²³.

Outre les manifestations hémorragiques, l'examen clinique doit également rechercher d'autres anomalies d'organes (surdité, atteinte cardiaque ou rénale, syndrome malformatif, susceptibilité aux infections, fibrose pulmonaire, eczéma, colite...), s'intégrant alors dans une thrombopathie syndromique. Ces manifestations peuvent être présentes très tôt, ou se manifester plus tardivement, avec le risque de méconnaître leur origine syndromique.

Les déficits en granules denses ne dérogent pas à la règle puisqu'ils s'accompagnent d'un syndrome hémorragique cutanéomuqueux d'intensité variable mais le plus souvent modéré. A noter qu'il n'a pas été établi à l'heure actuelle de corrélation entre la sévérité du déficit en granules denses et l'intensité du phénotype hémorragique.

Cependant, des saignements anormaux potentiellement majeurs peuvent apparaître après des gestes invasifs tels qu'une chirurgie, une extraction dentaire ou un accouchement, et doivent alerter les personnels médicaux et paramédicaux¹⁹.

La maladie du pool vide delta-plaquettaire est encore mal connue, mais elle doit cependant être évoquée et recherchée devant tout saignement inexpliqué, a fortiori avant un geste à risque hémorragique, afin d'adopter une prise en charge thérapeutique adaptée³¹.

Nous allons nous intéresser tout particulièrement aux formes constitutionnelles de déficits en granules denses plaquettaires, qui peuvent être classées selon leur expression clinique ou encore selon l'origine des anomalies biologiques causales.

2) Classification clinique

Sur le plan clinique, on peut classer les anomalies constitutionnelles des granules denses en déficits « syndromiques » ou bien « non-syndromiques » dits « isolés », c'est-à-dire hématologiques pures⁹.

a. Déficits syndromiques

Les formes « syndromiques » de maladie du pool vide delta-plaquettaire associent aux déficits en granules denses plaquettaires d'autres atteintes constitutionnelles d'organes pouvant s'exprimer de façon variable, notamment à travers la présence d'un déficit immunitaire, d'un albinisme oculocutané, d'atteintes ophtalmologiques, d'une fibrose pulmonaire, ou encore d'une colite.

Ces atteintes sont en fait la conséquence d'anomalies des lysosomes et des organites liés (définis précédemment sous le terme de LROs pour « *lysosome-related organelles* »), présents au sein de cellules localisées dans différents organes⁷, et listés dans le tableau 2.

[Tableau 2] : Principaux LROs avec leurs localisations, fonctions et les conséquences cliniques de leurs atteintes⁷

LRO	Function	Resident cell type	Major clinical features when defective
Melanosome	Intracellular melanin biosynthesis and storage. Melanin transfer to keratinocytes.	Melanocytes, iris and retinal pigment epithelial cells	Ocular and cutaneous hypopigmentation
Delta granule	Storage of small molecules, released for blood coagulation.	Platelets, megakaryocytes	Bleeding diathesis
Lytic granule	Intracellular degradation of macromolecules. Upon release, extracellular destruction of virally infected or cancerous target cells.	Cytotoxic T lymphocytes, natural killer cells	Immune deficiency, viral infections
Azurophil granule	Storage of hydrolytic enzymes, destruction of phagocytosed bacteria. Upon secretion, support of various pathological processes, including inflammation.	Neutrophils, eosinophils	Neutropenia, immune deficiency, bacterial infections
Basophil granule	Storage of histamine, serotonin, heparin, IL-4, and lysosomal proteases. Released for regulation of inflammation.	Basophils, mast cells	Immune deficiency, allergies
Lamellar body	Storage and secretion of surfactants for lung function.	Lung type II epithelial cells	Interstitial lung disease, lung inflammation and fibrosis
MHC class II compartment	Intracellular processing and incorporation of antigens into cell membranes.	B lymphocytes, macrophages, dendritic cells, other antigen presenting cells	Immune deficiency
Neuromelanin granule	Storage of the insoluble pigment neuromelanin which binds iron.	Catecholaminergic neurons of the brainstem	Unknown
Ruffled border	Bone resorption and remodeling. Storage, activation and/or release of acid hydrolases.	Osteoclasts	Osteopetrosis
Weibel-Palade body	Storage and regulated release of hemostatic and pro-inflammatory factors (von Willebrand Factor, P-selectin)	Endothelial cells	Bleeding diathesis

Les anomalies de biogenèse des LROs entraînent ainsi des manifestations syndromiques, avec une tendance aux saignements, néanmoins souvent négligée face à la gravité des autres manifestations cliniques associées. Les atteintes cliniques très caractéristiques de ces formes syndromiques rendent pourtant le diagnostic plus aisé dès lors qu'elles ont été identifiées.

Les gènes principalement en cause dans ces déficits syndromiques sont pour la plupart connus et bien décrits, rendant là encore le diagnostic relativement aisé, sur le plan génétique tout du moins.

Trois syndromes sont bien identifiés à ce jour pour être associés à un déficit en granules denses : le syndrome d'Hermansky–Pudlak, le syndrome de Chediak–Higashi et le syndrome de Griscelli¹¹. Leurs principales caractéristiques sont résumées dans le tableau 3.

[Tableau 3] : Caractéristiques des syndromes d'Hermansky-Pudlak, Chediak-Higashi et Griscelli

	<u>Hermansky-Pudlak</u>	<u>Chediak-Higashi</u>	<u>Griscelli</u>
Numération plaquettaire		Normale	
Organites affectés			
Granules denses	Absents ou très diminués	Absents ou anormaux	
Lysosomes	Biogenèse anormale	Géants	Présents, taille normale
Mélanosomes	Atypiques, pigmentation irrégulière	Géants	Accumulation autour du noyau
Symptomatologie			
Pigmentation	Albinisme oculocutané	Albinisme oculocutané partiel	
Phénotype hémorragique	Modéré		
Autres signes possibles	- Déficit immunitaire - Fibrose pulmonaire - Colite granulomateuse	- Déficit immunitaire - Syndrome d’activation lymphocytaire (lymphohistiocytose) et macrophagique - Troubles neurologiques (inconstants)	
Etiologie			
Gènes mis en cause	<i>HPS1</i> à <i>HPS11</i>	<i>LYST</i>	<i>RAB27A</i> et <i>MYO5A</i>
Complications			
Survie possible	≈ 20 – 50 ans	≈ 10 – 20 ans	≈ 10 ans
Causes probables du décès	- Fibrose pulmonaire (fréquente) - Colite (rare mais sévère) - Hémorragie (rare)	- Lymphohistiocytose sévère - Syndrome d’activation macrophagique (SAM)	

Le **syndrome d'Hermansky-Pudlak** est un trouble héréditaire autosomique récessif regroupant 11 sous-types bien définis à ce jour (HPS 1 à HPS 11), chacun caractérisé par la mutation d'un gène spécifique, comme listé dans le tableau 4^{32,33}.

C'est une pathologie rare puisqu'on estime sa prévalence à 1-9 cas par million d'habitants dans le monde. La fréquence rapportée est variable selon la population concernée et les mutations causales. Sur le plan épidémiologique, il est cependant à noter que cette pathologie est plus commune sur l'île de Porto Rico où la prévalence est notamment de 1 pour 1800 habitants concernant le sous-type HPS 1³².

Les gènes impliqués dans le syndrome d'Hermansky-Pudlak codent pour les composants des quatre complexes protéiques impliqués dans la biogenèse des LROs : BLOC-1 à 3 et AP-3, ils sont listés dans le tableau 4. Il est intéressant de noter que des études en cours cherchent à identifier de nouveaux gènes qui pourraient être responsables de syndrome d'Hermansky-Pudlak et ainsi rallonger la liste des sous-types décrits. Par exemple, la publication récente de *Huizing et al.* en 2020 rapporte 264 nouveaux variants détectés dans les 10 gènes des sous types HPS 1 à HPS 10³². L'existence de la forme HPS 11 a quant à elle été suggérée récemment dans une publication de *Pennamen et al.* (2020)³³.

[Tableau 4] : Sous-types de syndrome d'Hermansky-Pudlak avec leur étiologie génétique

Sous-type de maladie	Gène muté	Complexe protéique touché
HPS 1	<i>HPS1</i>	BLOC-3
HPS 2	<i>AP3B1</i>	AP-3
HPS 3	<i>HPS3</i>	BLOC-2
HPS 4	<i>HPS4</i>	BLOC-3
HPS 5	<i>HPS5</i>	BLOC-2
HPS 6	<i>HPS6</i>	BLOC-2
HPS 7	<i>DTNBP1</i>	BLOC-1
HPS 8	<i>BLOC1S3</i>	BLOC-1
HPS 9	<i>BLOC1S6</i>	BLOC-1
HPS 10	<i>AP3D1</i>	AP-3
HPS 11	<i>BLOC1S5</i>	BLOC-1

Les conséquences cliniques découlent de l'atteinte de plusieurs types de LROs : les mélanosomes, les granules denses plaquettaires, les corps lamellaires des pneumocytes de type 2 et les granules sécrétoires des lymphocytes T. La dysfonction plaquettaire qui en résulte est due à une absence presque totale de granules denses.

L'expression clinique observée chez les sujets atteints associe, à des degrés variables, un syndrome hémorragique modéré, un albinisme oculocutané, un nystagmus horizontal et des atteintes supplémentaires en fonction du complexe protéique défectueux.

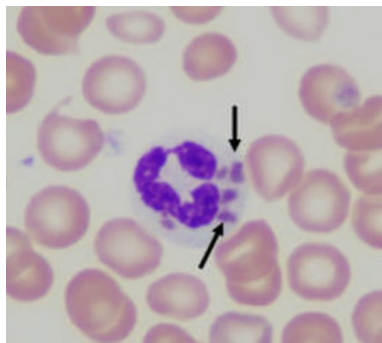
L'hypopigmentation cutanée, qui est due à des anomalies touchant la formation, le trafic ou le transfert des mélanosomes vers les kératinocytes, est d'intensité variable, allant jusqu'à l'albinisme qui est causé par une carence en protéines mélanosomales telles que la tyrosinase, la protéine P, ou TYRP1⁷.

On peut ainsi retrouver un déficit immunitaire avec neutropénie (déficits en AP-3), l'apparition d'une fibrose pulmonaire progressive (déficits en AP-3 et BLOC-3) et des symptômes gastro-intestinaux dus à une colite granulomateuse (plus fréquents et graves dans les déficits en BLOC-3).

La sévérité de la maladie dépend en effet du gène affecté et du type de mutation, comme cela avait été évoqué dans la figure 5. En particulier, les syndromes résultant de mutations des gènes *HPS1* et *HPS4* (complexe BLOC-3), sont considérées comme les formes les plus graves en raison de la fréquence élevée des fibroses pulmonaires souvent fatales associées^{9,32}. Il est donc important d'identifier le sous-type de syndrome d'Hermansky-Pudlak afin d'évaluer le pronostic, de guider la prise en charge clinique et les options thérapeutiques.

Le **syndrome de Chediak–Higashi** est une pathologie héréditaire, à transmission autosomique récessive, très rare dont la prévalence n'est pas connue. Elle est due à des mutations au niveau du gène *LYST* qui code pour la protéine régulatrice du trafic lysosomal « LYST ». Cette protéine serait impliquée dans la biogenèse, notamment l'assemblage, des endosomes et lysosomes matures et le trafic membranaire. Une quarantaine de mutations différentes ont été décrites à ce jour. Les mutations non-sens ou entraînant un décalage du cadre de lecture sont souvent associées à des phénotypes cliniques sévères, contrairement aux quelques mutations faux-sens, plutôt en lien avec des formes bénignes¹¹. Les anomalies de la protéine LYST entraînent des dysfonctions au niveau du trafic vésiculaire lysosomal, et la formation très caractéristique d'inclusions granulaires géantes au sein des cellules contenant des granules, notamment des plaquettes, des mélanocytes et des leucocytes, comme le montre la figure 13 issue de la revue de *Huizing et al.*⁷ sur les anomalies des LROs.

[Figure 13] : Inclusions granulaires géantes visualisées dans un polynucléaire neutrophile chez un patient atteint du syndrome de Chediak-Higashi⁷



Sur le plan clinique, on retrouve un phénotype modérément hémorragique, associé à un albinisme oculocutané avec dilution pigmentaire, des cheveux argentés et un déficit immunitaire parfois sévère, entraînant des infections à répétition en lien avec une neutropénie et des dysfonctions de l'activité cytotoxique des lymphocytes NK.

Le syndrome de Chediak-Higashi est associé à une mortalité précoce, avant l'âge de 10 ans. Dans la plupart des cas, les patients développeront une lymphohistiocytose, menant au décès. Cette complication, qui apparaît chez 85 % des patients atteints du syndrome et qui s'accompagne de troubles immunologiques et d'une susceptibilité aux infections, se caractérise par une prolifération incontrôlée de lymphocytes, créant une situation semblable à un lymphome. Les infiltrations tissulaires créant hépatosplénomégalie et

lymphadénopathies s'accompagnent de symptômes à type de fièvre, anémie, neutropénie et parfois thrombopénie. Si les patients atteints du syndrome de Chediak-Higashi survivent jusqu'à l'âge adulte, ils développent des troubles neurologiques progressifs majeurs qui détériorent fortement leur qualité de vie. Ces symptômes peuvent être à type de neuropathies, dysfonctionnement du système nerveux autonome, atrophie, aréflexie, syndrome cérébelleux, troubles de la marche, convulsions, déficits sensoriels et troubles cognitifs⁹.

Le **syndrome de Griscelli** est une pathologie héréditaire rare, autosomique récessive, dont il existe trois formes, s'exprimant toutes par une hypopigmentation cutanée accompagnée de reflets argentés des cheveux. L'albinisme peut s'accompagner d'un syndrome hémorragique, souvent modéré, lié à une diminution du nombre de granules denses plaquettaires, des troubles neurologiques et un déficit immunitaire⁹.

Le syndrome de Griscelli de type 1 est dû à des mutations dans le gène de la myosine Va (*MYO5A*). Il est caractérisé par les manifestations pigmentaires précédemment citées auxquelles s'ajoutent des troubles neurologiques, notamment un retard psychomoteur précoce et sévère. En effet, le gène *MYO5A* code pour la myosine Va, une protéine motrice se liant à l'actine et jouant un rôle dans le transport intracellulaire des organelles dans les mélanocytes et les neurones.

Le syndrome de Griscelli de type 2 est dû à des mutations du gène *RAB27A* qui se trouve dans la même région chromosomique que le gène *MYO5A* ; ils codent tous deux pour des effecteurs clés du transport vésiculaire intracellulaire. Il est caractérisé par un déficit immunitaire avec infections répétées et une lymphohistiocytose accompagnant les troubles pigmentaires communs aux deux entités. En effet, la protéine Rab27a est une petite GTPase codée par le gène éponyme qui régule spécifiquement la sécrétion des granules cytotoxiques. Ainsi, les patients atteints de cette forme présentent une réponse cytotoxique anormale et un syndrome hémophagocytaire par activation incontrôlée des lymphocytes T et des macrophages, souvent fatal. Les ganglions et d'autres organes comme le cerveau sont ainsi infiltrés par des cellules T et des macrophages activés qui phagocytent les cellules sanguines (hémophagocytose) et peuvent entraîner des troubles neurologiques secondaires.

Le syndrome de Griscelli de type 3 est dû à des mutations du gène *MLPH* codant pour la mélanophiline, qui forme un complexe protéique avec Rab27a et la myosine Va et participe au transport des mélanosomes dans les mélanocytes. L'atteinte cutanée et des phanères est isolée dans cette forme : l'hypopigmentation de la peau et des cheveux s'accompagne de la présence de gros agrégats de pigment dans la gaine des cheveux et de l'accumulation de mélanosomes matures dans les mélanocytes⁷.

Deux autres syndromes seraient associés de façon plus variable à des anomalies des granules denses plaquettaires.

Le **syndrome de Wiskott-Aldrich** est une maladie récessive liée à l'X, caractérisée par un défaut d'expression de la protéine WASP qui est un régulateur clé de la polymérisation d'actine dans des cellules hématopoïétiques. Un déficit de cette protéine compromet de multiples aspects de l'activité cellulaire. En ce qui concerne les plaquettes, il entraîne notamment une formation prématurée des proplaquettes dans la moelle osseuse, au sein desquelles est retrouvé un manque de podosomes riches en actine qui ralentit la migration mégacaryocytaire vers les sinus vasculaires. Un déficit immunitaire associé, avec altération de l'activité des immunoglobulines, contribuerait à raccourcir la durée de vie des plaquettes sanguines. Il en résulte une thrombopénie avec des plaquettes de petite taille, possédant un contenu en organites diminué, dont un déficit en granules et en mitochondries, aboutissant à une symptomatologie hémorragique plus ou moins sévère¹¹.

La **Thrombopénie avec Absence de Radius**, encore appelée syndrome de thrombocytopénie avec aplasie radiale (TAR), est caractérisée par une malformation congénitale avec absence bilatérale des radius mais présence des pouces (ce qui distingue le syndrome TAR d'autres aplasies radiales). D'autres anomalies du squelette (membres supérieurs et inférieurs, côtes et vertèbres), du cœur et du système génito-urinaire (anomalies rénales et agénésie de l'utérus, du col de l'utérus et de la partie supérieure du vagin) peuvent survenir. Sur le plan hématologique, il existe systématiquement une thrombopénie hypomégacaryocytaire, d'origine centrale avec un nombre de précurseurs mégacaryocytaires anormalement bas. La thrombopénie est généralement passagère, et peut être congénitale ou se développer dans les premières semaines/mois de vie. La numération plaquettaire est

très basse, inférieure à 50 G/L, dans la petite enfance et les épisodes de thrombopénie semblent être exacerbés par l'allergie fréquente au lait de vache. Ainsi, la plupart des patients présentent des contusions dès la naissance, et souvent des pétéchies et des saignements sévères (gastro-intestinaux et plus rarement intracérébraux) durant les premières années de vie. Progressivement au cours de l'enfance, la numération plaquettaire se corrige pour devenir quasiment normale à l'âge adulte. Des anomalies des granules plaquettaires ont été rapportées chez certains patients⁷.

C'est une pathologie très rare puisqu'elle toucherait 1 naissance vivante sur 100 000 à 200 000. Il est suggéré un mode de transmission autosomique récessif, avec probable mise en cause de mutations du gène *RBM8A* (microdélétions) sur le chromosome 1, qui n'est cependant pas suffisante pour déclencher à elle seule le phénotype clinique³⁴.

b. Déficits non-syndromiques

Les déficits constitutionnels en granules denses plaquettaires non-syndromiques se caractérisent par des symptômes hémorragiques cutanéomuqueux sans autre signe systémique associé. Ils peuvent être qualifiés de déficits en granules denses « isolés », car il s'agit de formes purement hématologiques de maladie du pool vide delta-plaquettaire. Cependant, il faut savoir qu'au niveau biologique, un déficit en granules denses pourra être combiné à un déficit en granules alpha, mais d'un point de vue clinique, il sera tout de même qualifié de déficit « isolé » dans la littérature, par opposition aux formes syndromiques. Les saignements sont d'intensité variable, légers à modérés au quotidien, mais potentiellement sévères en cas de traumatisme ou d'intervention chirurgicale.

Les déficits peuvent concerner le nombre de granules denses au sein des plaquettes, avec une réduction voire une absence totale de ces organelles, leur composition qualitative, à savoir des déficits en certains constituants, ou associer les deux types d'anomalies.

A ce jour, l'état des connaissances est encore pauvre concernant les déficits isolés en granules denses plaquettaires, notamment sur leur origine génétique et moléculaire. Il faut effectivement noter qu'aucun gène n'a clairement été identifié comme responsable de la

maladie du pool vide delta-plaquettaire non-syndromique chez l'Homme. Certaines études permettent de penser que son principal mode de transmission serait autosomique dominant. Des mutations de certains facteurs de transcription pourraient être associées à un déficit en granules denses plaquettaires, et, à une prédisposition familiale aux Leucémies Aiguës Myéloïdes (LAM), comme l'atteinte de RUNX1, ou à une thrombopénie, comme pour les mutations de GATA1 et Fli1^{7,19}.

- GATA1 (*GATA-binding factor 1*) est un facteur de transcription à motifs à « doigts de zinc » fortement exprimé dans les cellules érythroïdes, les mastocytes et les mégacaryocytes. Son absence entraîne une diminution de la polyploïdisation et un manque de maturation cytoplasmique mégacaryocytaire, responsables de thrombopénies hypogranulaires avec déficit généralisé en organites plaquettaires (dont les granules alpha et denses)³⁵.
- RUNX1 (AML1) appartient à la famille RUNT des facteurs de transcription, il est aussi impliqué dans la différenciation mégacaryocytaire et une mutation l'affectant peut engendrer un déficit en granules denses plaquettaires.
- Fli1 (*Friend leukemia virus integration 1*) appartient à la famille ETS des facteurs de transcription. Sa mutation engendre la formation de micromégacaryocytes avec anomalies de genèse des granules.

Si la prévalence de la maladie du pool vide delta-plaquettaire reste inconnue, certaines études suggèrent que sa forme non-syndromique serait une thrombopathie congénitale fréquente^{19,27-29}.

Nous venons de voir que les différentes formes de maladie du pool vide delta-plaquettaire pouvaient être classées selon leur mode de présentation clinique (syndromiques/isolées), mais celles-ci peuvent également être différenciées selon le type d'anomalie biologique retrouvée, comme présenté ci-dessous.

3) Classification biologique

a. Déficits quantitatifs

Les déficits quantitatifs touchent le nombre de granules denses intraplaquettaires, du fait d'anomalies de leur biogenèse. Des mutations de plusieurs gènes peuvent être mises en cause, comme décrit plus haut dans la partie « classification clinique ».

Un déficit quantitatif en granules delta aura un impact péjoratif sur la participation de ces organites aux phénomènes d'hémostase au cours d'un saignement.

La sévérité rapportée va d'un nombre diminué de granules denses au sein des plaquettes, à une absence totale de ceux-ci, avec un impact clinico-biologique variable, sans réelle corrélation retrouvée actuellement.

b. Déficits qualitatifs

Les déficits qualitatifs touchent le contenu des granules denses intraplaquettaires, impactant leur fonction, mais sans anomalie de leur nombre.

On retrouve fréquemment des déficits isolés en nucléotides (notamment en ADP), en amines bioactives (notamment en sérotonine, qui est spécifique des granules denses) et parfois une combinaison de ces déficits⁹.

Il faut noter que, quel que soit le déficit mis en évidence, la physiopathologie et les mécanismes moléculaires mis en cause dans ces dysfonctions plaquettaires isolées ne sont pas établis de manière certaine.

Les formes associées à des déficits en nucléotides, notamment en ADP, pourraient être la conséquence de déficits en transporteurs membranaires des granules denses, tels que la protéine MRP4, impliquée dans le transport nucléotidique^{36,37}. Cependant à ce jour, aucune équipe de recherche n'a mis en évidence de mutation au niveau du gène *ABCC4* qui code la protéine transporteuse MRP4⁹.

c. Déficits sécrétoires

Les déficits sécrétoires touchent la capacité de sécrétion plaquettaire des granules denses en réponse à un stimulus, qui sont pourtant normalement présents et constitués.

Dans leur revue de 2017, *Fiore et al.* expliquent que les défauts de sécrétion des granules denses s'apparenteraient plutôt à des anomalies de signalisation plaquettaire qu'à un véritable déficit en granules¹⁹.

La suite de ce manuscrit ne s'attachera pas à détailler les troubles de la sécrétion des granules denses en lien avec des anomalies de la signalisation, mais se focalisera sur les déficits quantitatifs et qualitatifs.

d. Déficits combinés delta/alpha

Il existe des déficits en granules denses plaquettaires associés à un déficit variable en granules alpha⁷.

La pathogenèse de ce syndrome est unique : dans leur publication de 2006, *James G. White et al.* ont suggéré que les granules plaquettaires se connectent spontanément aux canaux du système canaliculaire ouvert et dégranulent vers l'extérieur, sans activation préalable des plaquettes. On peut mettre en perspective ce mécanisme avec celui, totalement différent et impliqué dans le syndrome des plaquettes grises, au cours duquel les granules alpha sont incapables de retenir leur contenu et le déversent dans le cytoplasme plaquettaire, à cause d'une membrane fragilisée³⁸.

Les déficits combinés en granules delta/alpha sont probablement moins fréquents que les déficits isolés en granules denses, cependant aucune donnée objective n'est encore disponible.

L'étiologie de ces déficits combinés reste encore inconnue, d'une part à cause de la rareté des rapports publiés, et d'autre part à cause de l'hétérogénéité de la maladie. D'après les connaissances actuelles, elle peut être héritée de manière autosomique dominante ou récessive, ou survenir sporadiquement, avec une transmission et une sévérité variables.

Certaines études ont suggéré l'implication possible du facteur de transcription GATA1, dont certaines mutations liées à l'X pourraient être responsables de thrombopénies hypogranulaires avec un déficit généralisé en organites plaquettaires dont les granules alpha et delta³⁵. Une étude récente de 2017 par *Carlos R. et al.* a mis en évidence l'implication de GFI1B. Il s'agit d'une protéine comportant des domaines à doigts de zinc impliquée dans la régulation de la transcription de nombreux gènes ainsi que dans la prolifération et la différenciation des progéniteurs au cours de la mégacaryopoïèse et de l'érythropoïèse. L'étude portait sur deux enfants non apparentés atteints de déficits combinés en granules delta/alpha. Ils concluent en démontrant que cette pathologie peut être associée à des mutations de GFI1B, notamment situé au niveau de la région C-terminale des motifs à doigts de zinc. Il s'agit soit de mutations hétérozygotes (de novo ou familiales à transmission autosomique dominante) abrogeant la liaison de la protéine avec le promoteur de ses gènes cibles, soit de mutations homozygotes bi-alléliques hypomorphes de GFI1B conduisant à une transmission autosomique récessive³⁹.

Le phénotype hémorragique est proche de celui des déficits isolés en granules denses, c'est-à-dire essentiellement composé de symptômes hémorragiques cutanéomuqueux légers à modérés, en dehors de tout contexte traumatique.

En conclusion, les déficits en granules denses plaquettaire regroupent un ensemble hétérogène d'anomalies tant sur le plan clinique que biologique, expliquant que leur fréquence soit probablement largement sous-estimée.

Une définition plus précise de la maladie du pool vide delta-plaquettaire, et une harmonisation des méthodes diagnostiques semblent indispensables.

Dans la suite de ce travail, nous réaliserons un état des lieux de la stratégie diagnostique actuellement mise en œuvre pour l'exploration des granules denses plaquettaires, en discutant plus particulièrement la place de la microscopie électronique au sein de cette stratégie.

Partie 3 : Déficits en granules denses plaquettaires : stratégie d'exploration et outils diagnostiques

I. Stratégie d'exploration des granules denses plaquettaires

La maladie du pool vide delta-plaquettaire regroupe un ensemble très hétérogène de thrombopathies caractérisées par des anomalies quantitatives (nombre de granules) ou qualitatives (contenu) des granules denses. Le diagnostic de ces anomalies est complexe en raison de la nature et de l'intensité variables des manifestations hémorragiques associées, et des performances également variables des outils diagnostiques utilisés.

Comme pour l'ensemble des thrombopathies de façon générale, sur le plan clinique, les manifestations hémorragiques sont typiquement cutanéomuqueuses. Il faut ainsi pouvoir évoquer ce type d'anomalies en cas d'épistaxis, gingivorragies, ecchymoses faciles, saignements prolongés après une plaie mineure, hématuries, saignements digestifs, méno/métrorragies chez la femme, mais également des saignements abondants après des actes invasifs. Ces manifestations hémorragiques peuvent aussi s'intégrer dans un tableau de déficit syndromique, au cours duquel des symptômes tels que surdité, atteinte cardiaque ou rénale, syndrome malformatif, susceptibilité aux infections, fibrose pulmonaire, eczéma ou colite doivent faire rechercher un déficit en granules denses plaquettaires. La présentation clinique peut être pauvre, comme au cours des anomalies du complexe BLOC-2 (gènes *HPS3*, *HPS5* et *HPS6*) où un séquençage des gènes *HPS*, *LYST* et *RAB27* peut alors être nécessaire pour poser un diagnostic précis⁹. En dehors de ces manifestations syndromiques, la nature et l'intensité des saignements ne permettent pas d'orienter le diagnostic vers un déficit en granule dense plutôt qu'une autre thrombopathie. Cela sous-entend que dans les formes isolées, l'exploration des granules denses s'intègre dans la stratégie globale de recherche d'une thrombopathie.

Il est important de rappeler que même si les thrombopathies constitutionnelles s'expriment en général tôt dans la vie, les manifestations hémorragiques associées étant d'intensité modérée, la pathologie peut n'être découverte qu'à l'âge adulte, sans que le caractère constitutionnel ne doive être écarté d'emblée.

Concernant les outils diagnostiques, l'utilisation d'un score est un moyen d'évaluer objectivement l'intensité du phénotype hémorragique. À ce titre, le sous-comité « physiologie plaquettaire » de l'ISTH (Société Internationale d'Hémostase et Thrombose) a récemment validé l'utilisation du **score ISTH-BAT** pour le dépistage des troubles fonctionnels plaquettaires constitutionnels²³.

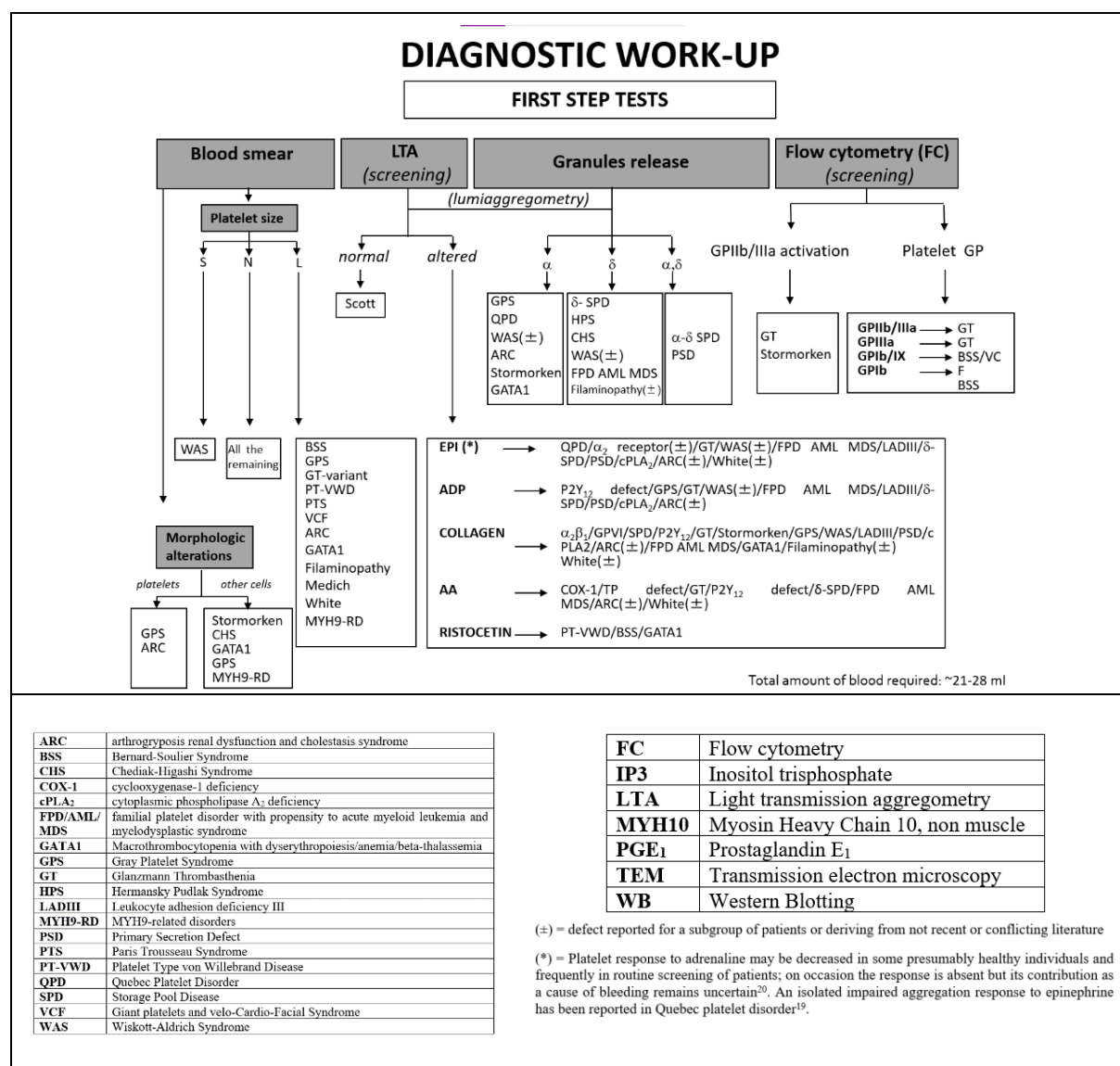
Une étude de *Gresele et al.* en 2019, coordonnée par le sous-comité, a ainsi montré que ce score permet de discriminer efficacement les patients atteints de thrombopathie constitutionnelle des patients sains. Cependant, il a une précision moindre pour différencier ces thrombopathies de la maladie de Willebrand de type 1, due à un déficit quantitatif partiel en facteur Willebrand, même si, au cours de cette étude, le score ISTH-BAT était plus élevé chez les sujets porteurs d'une thrombopathie constitutionnelle (avec une médiane à 9) que chez les patients atteints d'une maladie de Willebrand de type 1 (médiane à 5) ou les sujets sains (médiane à 0). Ainsi, selon les auteurs, la triade « saignements cutanéo-muqueux, score ISTH-BAT supérieur 6, maladie de Willebrand exclue » doit faire évoquer une thrombopathie jusqu'à preuve du contraire⁴⁰.

Différentes méthodologies sont actuellement disponibles pour l'étude des fonctions plaquettaires, mais elles relèvent de laboratoires très spécialisés et sont peu réalisées en pratique courante³⁰. De plus, leur place respective dans la stratégie diagnostique reste encore mal définie. Bien souvent, les seuls tests fonctionnels effectués en pratique clinique sont des tests d'agrégation plaquettaire, pourtant peu sensibles aux anomalies des granules denses, avec comme conséquence un sous-diagnostic de ce type de thrombopathie¹⁹. À ce titre, l'étude publiée par l'ISTH en 2014 montrait que moins de la moitié des laboratoires spécialisés dans l'exploration des fonctions plaquettaires évaluaient les granules denses plaquettaires en pratique clinique³⁰. Pour pallier à ces errances diagnostiques, des recommandations relatives à l'étude de la sécrétion plaquettaire sont actuellement en cours de rédaction par l'ISTH, mais

il n'existe encore pour l'instant aucun consensus sur les méthodologies à employer pour le diagnostic des déficits en granules denses plaquettaires.

La stratégie diagnostique actuelle des déficits en granules denses peut cependant s'appuyer sur des recommandations générales relatives au diagnostic des anomalies plaquettaires constitutionnelles émises par l'ISTH en 2014⁴¹. Compte-tenu de la proportion non-négligeable d'anomalies des granules denses parmi les thrombopathies constitutionnelles, l'ISTH recommande ainsi d'étudier systématiquement, en première ligne, la sécrétion des granules plaquettaires par des méthodes adaptées (figure 14).

[Figure 14] : Recommandations diagnostiques des anomalies plaquettaires constitutionnelles : Examens à réaliser en 1^{ère} intention selon l'ISTH⁴¹



A l'inverse, en France, les recommandations émises par le Centre de Référence des Pathologies Plaquettaires (CRPP), et rapportées dans l'article de *Fiore et al.* en 2017¹⁹, proposent une exploration des granules uniquement dans un deuxième temps, en cas de syndrome hémorragique inexpliqué et significatif.

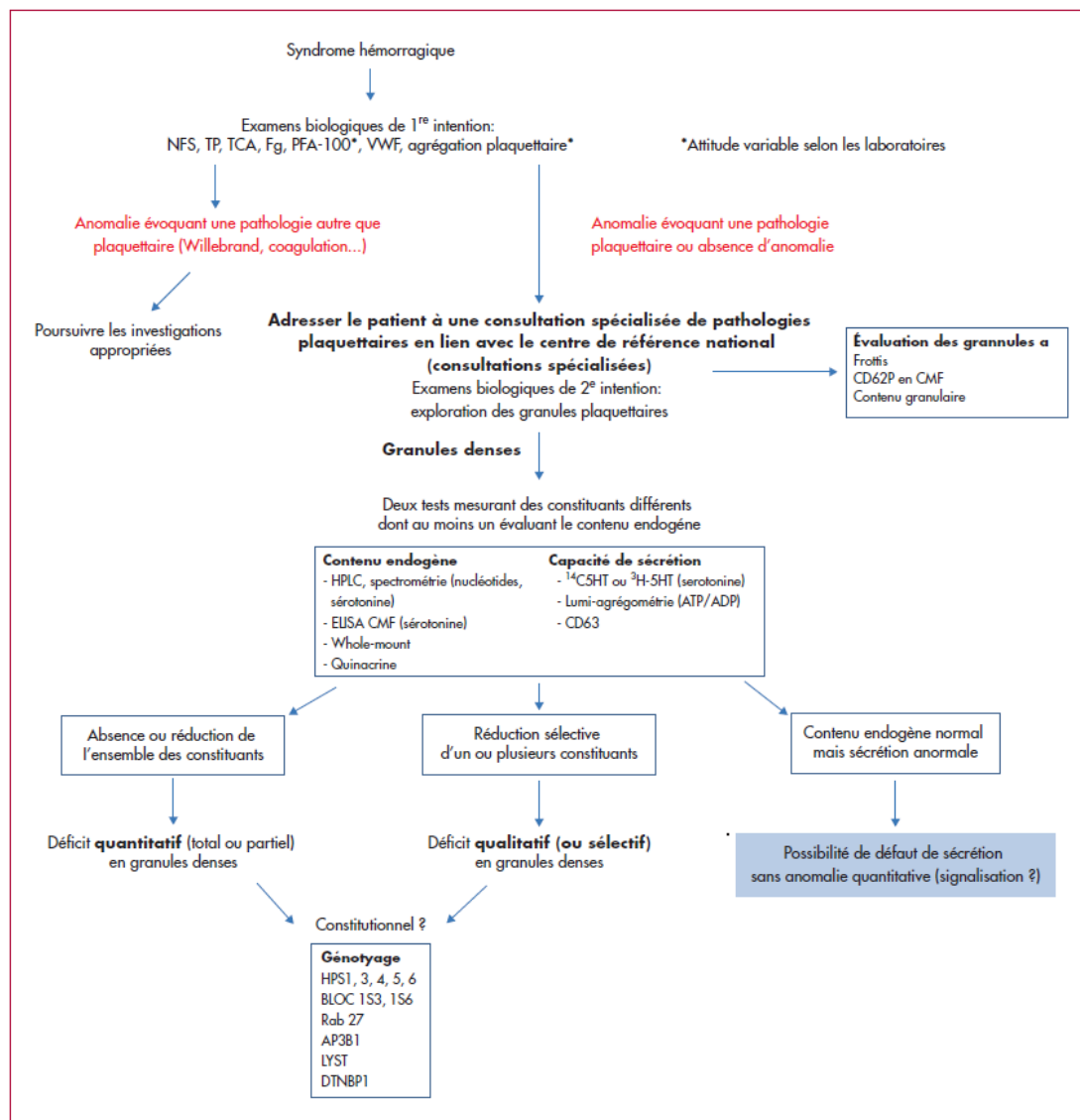
Ces discordances appuient à nouveau le fait qu'aucune stratégie claire n'existe actuellement pour le diagnostic de la maladie du pool vide delta-plaquettaire. Ceci explique en partie les difficultés diagnostiques majeures rencontrées pour le diagnostic de ces thrombopathies.

De façon intéressante, l'algorithme décisionnel proposé par *Fiore et al.* sous l'égide du CRPP en 2017¹⁹, et présenté dans la figure 15, propose de combiner plusieurs tests car tous ne sont pas équivalents en terme de sensibilité et de spécificité, et certains permettent de mettre en évidence un déficit quantitatif (diminution ou absence de granules) et/ou qualitatif (anomalie de leur contenu), tandis que d'autres renseigneront uniquement sur l'existence d'un défaut de sécrétion.

- En première intention, la réalisation d'un **bilan d'hémostase standard** (Temps de Quick/Taux de Prothrombine, Temps de Céphaline avec Activateur, fibrinogène) et l'exploration du facteur Willebrand permettront d'écarter des anomalies non-plaquettaires à risque hémorragique, telles qu'un déficit en facteur de la coagulation ou une maladie de Willebrand. Ce deuxième point est essentiel car la maladie de Willebrand est l'anomalie de l'hémostase primaire la plus fréquemment diagnostiquée en France. Dans sa forme modérée, elle est considérée comme la plus fréquente des maladies hémorragiques familiales avec une fréquence estimée entre 0,5 et 1,1 %⁴², variant en fonction du type d'atteinte, et sa présentation hémorragique est semblable à celle des thrombopathies, de type cutanéomuqueux essentiellement.
- Ce bilan devra être complété par une **Numération Formule Sanguine (NFS)**, qui renseignera sur l'existence d'une thrombopénie et d'anomalies morphologiques plaquettaires. L'hémogramme permet de rechercher une thrombopénie, d'évaluer sa profondeur et d'estimer le Volume Plaquettaire Moyen (VMP), qui pourra orienter sur le type de thrombopathie. La réalisation associée d'un frottis sanguin coloré au May-Grünwald Giemsa (MGG) est utile afin de rechercher des anomalies de taille des

plaquettes, en complément de la mesure du VMP, et permet d'observer la morphologie plaquettaire, en particulier les granules alpha. Il est cependant important de noter que le recours à des techniques ultraspecialisées et plus complexes, notamment de microscopie électronique, est indispensable pour analyser les granules denses qui ne sont pas visualisables par la coloration de MGG.

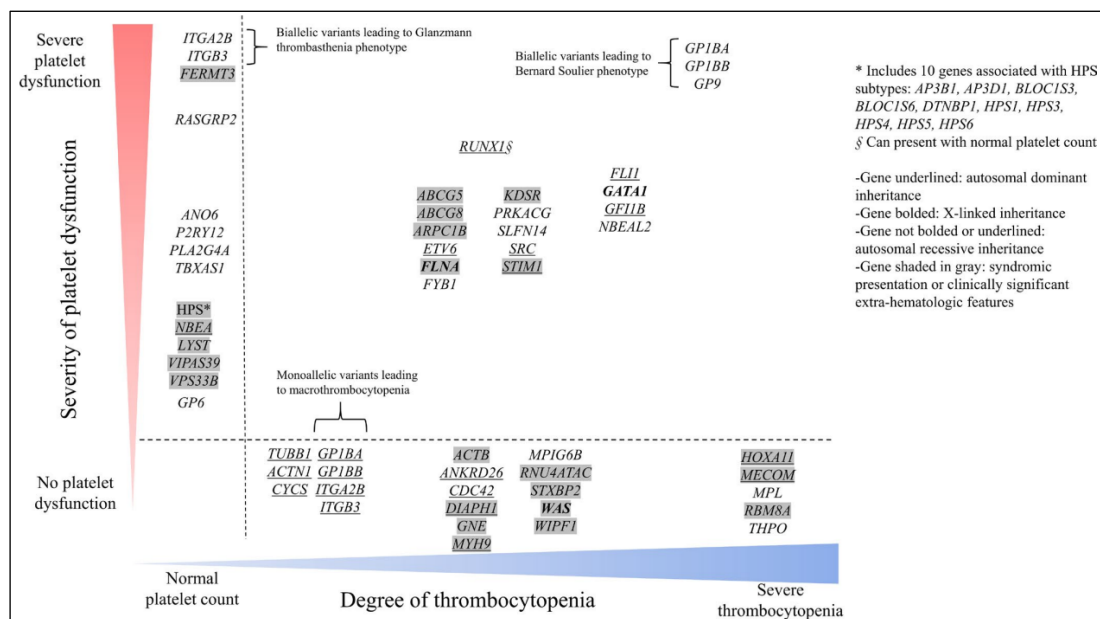
[Figure 15] : Algorithme diagnostique d'un déficit en granules denses plaquettaires selon les propositions du CRPP¹⁹



NFS = numération formule sanguine ; TP = taux de prothrombine (temps de quick) ; TCA = temps de céphaline avec activateur ; Fg = fibrinogène ; VWF = facteur Willebrand ; PFA = *platelet function analyser* ; CMF = cytométrie en flux ; HPLC = chromatographie phase liquide à haute performance ; ELISA = *enzyme-linked immunosorbent assay* ; ¹⁴C5HT = étude de la sécrétion de sérotonine marquée au carbone 14 ; ³H-5HT = sécrétion de sérotonine marquée au tritium.

Certaines thrombopathies peuvent être associées à une thrombopénie plus ou moins sévère, qui peut parfois constituer le point d'appel initial pour la réalisation d'explorations biologiques²³. À ce titre, l'existence de manifestations hémorragiques non explicables par la profondeur de la thrombopénie doit faire suspecter une thrombopathie associée. La figure 16, tirée de l'article de *Botero et Di Paola* de 2021, résume les gènes majeurs impliqués dans les thrombopathies constitutionnelles et les classent selon l'existence et la sévérité d'une thrombopénie associée⁴³

[Figure 16] : Classement des gènes majeurs impliqués dans les thrombopathies constitutionnelles selon la sévérité d'une thrombopénie associée⁴³



- Les deux tests de dépistage évaluant de façon globale l'hémostase primaire, que sont le **temps de saignement in vivo** et le **temps d'occlusion in vitro** (réalisé à l'aide du *Platelet Function Analyzer*, PFA), manquent de sensibilité et de spécificité pour détecter les anomalies fonctionnelles plaquettaires, notamment les plus modérées, et ne sont donc pas recommandés aujourd'hui pour leur dépistage^{41,44}.

Le **temps de saignement in vivo** est obsolète, tandis que le **PFA** est largement utilisé pour explorer l'hémostase primaire en urgence car réalisable rapidement, automatisé, standardisé et ayant une bonne valeur prédictive négative pour exclure la maladie de Willebrand. Son principe est simple : le sang du patient est mis au contact d'une membrane recouverte de plusieurs agonistes plaquettaires (collagène/épinéphrine, ou

collagène/ADP selon les cartouches) et présentant une ouverture centrale. Les plaquettes adhèrent à la membrane entourant l'ouverture, s'activent, puis, progressivement, s'agrègent pour former un bouchon recouvrant complètement l'ouverture. Le temps requis pour son occlusion complète est enregistré et correspond ainsi au « temps d'occlusion plaquettaire ». Ce test n'est cependant pas adapté au dépistage des thrombopathies car il est sensible aux formes majeures, comme la Thrombasthénie de Glanzmann ou le syndrome de Bernard Soulier, mais il est la plupart du temps incapable de détecter les thrombopathies modérées/mineures comme les troubles de la sécrétion ou de la signalisation. Dans le cadre d'un déficit en granules denses, le temps d'occlusion plaquettaire est le plus souvent normal, notamment avec la cartouche d'agonistes collagène/ADP, parfois légèrement allongé avec la cartouche collagène/épinéphrine. Aussi, le manque de sensibilité de ce test ne lui permet pas de dépister correctement les déficits en granules denses et ne constitue donc pas un test de dépistage adapté de la maladie du pool vide delta-plaquettaire. De ce fait, il n'est pas recommandé de le réaliser dans le seul but d'éliminer cette pathologie précise^{45,46}.

- Les **tests d'agrégation plaquettaire**, détaillés plus précisément dans la partie suivante, constituent l'examen de dépistage de première intention d'un trouble fonctionnel plaquettaire, et doivent être réalisés de façon systématique. Ils ne permettent cependant pas d'étudier spécifiquement les granules et présentent une sensibilité limitée, de l'ordre de 50 %, pour détecter leurs anomalies⁴⁷.

Ainsi, dans le cadre de l'exploration des granules plaquettaires, les tests d'agrégation doivent toujours être associés à des tests ayant pour but l'évaluation du contenu endogène des granules denses, le plus souvent par quantification de ces granules en microscopie électronique en transmission (technique « whole-mount »), et l'évaluation de leur sécrétion, fréquemment par lumi-agrégométrie ou cytométrie en flux. La détermination biochimique de leur contenu (ADP/ATP et sérotonine) sera quant à elle utile pour la mise en évidence des déficits qualitatifs. Ces différentes approches sont abordées successivement dans la suite de ce travail.

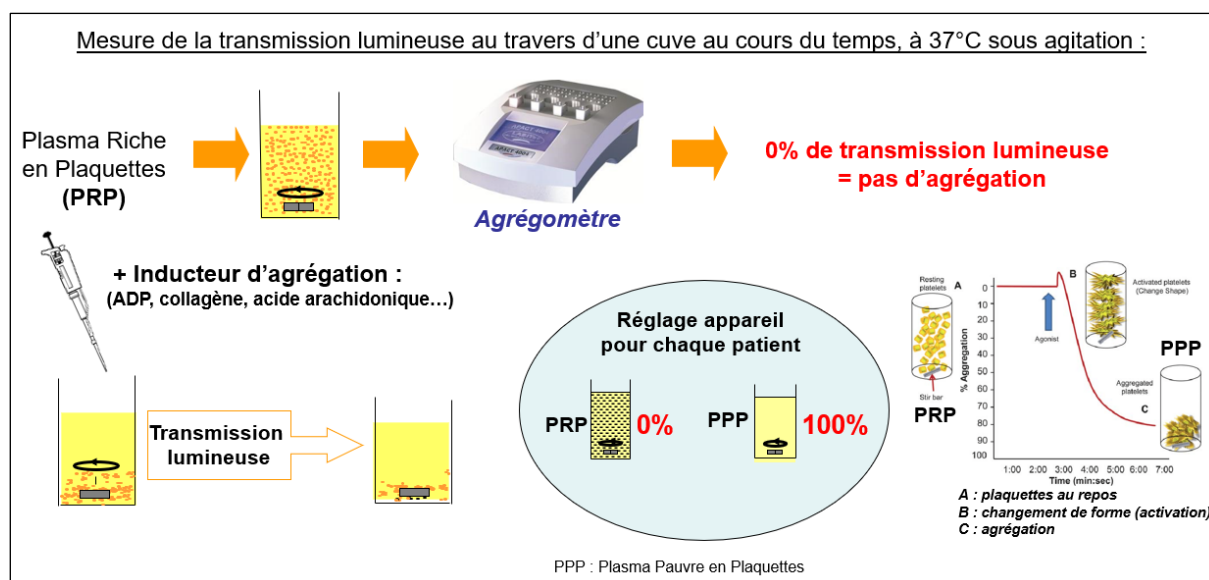
II. Dépistage d'un trouble fonctionnel plaquettaire par agrégométrie par transmission lumineuse

Les **Tests d'Agrégation Plaquettaire (TAP)** par mesure de la transmission lumineuse restent à l'heure actuelle l'examen de référence pour évaluer la fonctionnalité des plaquettes sanguines.

Les enjeux actuels de ces tests sont un manque de standardisation méthodologique, d'interprétation et de normalisation des résultats. Ces problèmes de standardisation ont conduit un consensus d'experts du sous-comité « physiologie plaquettaire » de l'ISTH a publié dans un article de 2013, des recommandations de bonnes pratiques concernant le prélèvement, le traitement de l'échantillon, le choix des agonistes et la réalisation de ces tests⁴⁸. Une étude multicentrique actuellement en cours sous l'égide de ce sous-comité, dénommée PAPS (*Platelet Aggregation Project Standardization*), devrait cependant apporter de nouveaux éléments de standardisation de ces tests²³.

Le principe des TAP est illustré sur la figure 17. Il repose sur l'évaluation de l'agrégation plaquettaire, par mesure de l'augmentation de la transmission lumineuse, dans une cuvette sous agitation à 37°C, en réponse à différents agonistes.

[Figure 17] : Principe des tests d'agrégation plaquettaire



Selon les recommandations de l'ISTH⁴⁸, cette technique est classiquement réalisée sur Plasma Riche en Plaquettes (PRP), obtenu par centrifugation à faible vitesse (200 x g) pendant 10 minutes à partir d'échantillons de sang veineux périphérique, prélevés sur citrate de sodium. En première ligne, le sous-comité « physiologie plaquettaire » de l'ISTH recommande d'utiliser un panel incluant les agonistes suivants : adrénaline, ADP, collagène, acide arachidonique, ristocétine, mais d'autres textes de référence suggèrent un choix et des concentrations d'agonistes légèrement différents, comme le résume le tableau 5 issu de la revue de 2021 de C. Vayne et Y. Gruel²³.

[Tableau 5] : Concentrations d'agonistes recommandées pour les tests d'agrégation plaquettaire par transmission lumineuse selon plusieurs textes de références internationaux²³

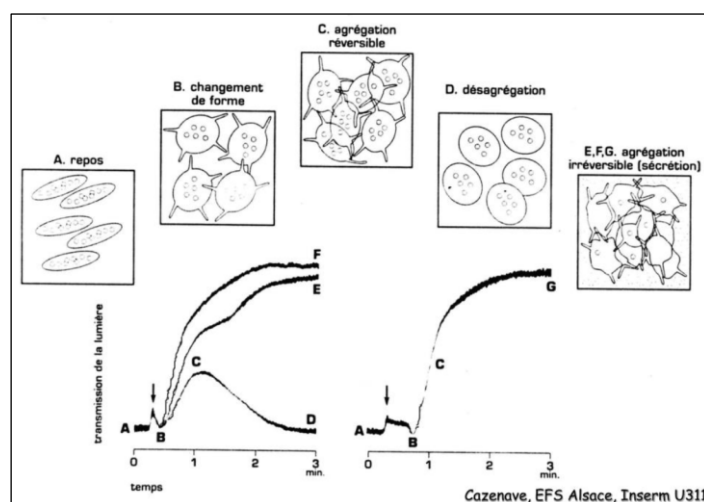
	Concentration finale	Hayward <i>et al.</i> , 2010	Harrison <i>et al.</i> , 2011	Cattaneo <i>et al.</i> , 2013	Alessi <i>et al.</i> , 2020
ADP	2 µM	X	X	X	X
	5 µM		X		
	10 µM	X			X
	100 µM				X
Collagène	1 µg/mL		X		
	2 µg/mL	X		X	X
	10 µg/mL				X
	25 µg/mL		X		
	Type :	Type I fibrillaire	Type I	Horm	Non mentionné
Adrénaline	5 µM	X	X	X	X
	10 µM	X		X	
	25 µM				X
TRAPs	10 µM		X	X	X
	50 µM				X
	Type :		PAR-1 (SFLLRN) 10-100 µM et PAR-4 (AYPGKF) 100-500 µM TRAPs	PAR1 (-AP)	TRAP-6
Acide arachidonique	1 mM	X (0,5-1,6)	X (0,5-1,0)	X	X
Thromboxane A2 (analogue U46619)	1 µM	X	X	X	X
	2 µM				
	3 µM				X
	5 µM				X
Ristocétine	faible dose	0,5-0,6	0,5-0,7		
	forte dose	1,2-1,5	1,2-1,5	1,2*	1,2*
Collagen-related peptide (CRP) - Convulxine	1 µg/mL				Concentration non mentionnée
	2 µg/mL		X (0,01-1)		
Gamma-thrombine	50-200 ng/mL		X		
Ca-ionophore A23187	1,25-10 µM		X		
Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)	30 nmol/L		X		Concentration non mentionnée

- Dépistage
 - Diagnostic des déficits complets en récepteur P2Y12
 - Distinction des anomalies du récepteur TP au TXA2 des anomalies de synthèse du TXA2
 - En cas d'agrégation anormale à l'acide arachidonique
 - En cas d'agrégation anormale à la thrombine
 - En cas d'anomalie des récepteurs à la thrombine : mobilisation du calcium et activité procoagulante
 - Évaluation de la voie de signalisation de la PKC
 - Activateurs spécifiques de GPVI
 - Diagnostic du déficit en CalDAG-GEFI
 - Étude des récepteurs à la thrombine sans génération de fibrine
- * si normal : tester entre 0,5-0,7 mg/mL ; si absent : tester 2 mg/mL

La stimulation des plaquettes par les différents inducteurs entraîne leur activation et leur dégranulation, pour aboutir in fine à leur agrégation. Cette dernière est mesurée par une

technique photométrique, avec une calibration où le 0 % de transmission optique correspond au signal recueilli lorsque le faisceau lumineux traverse le Plasma Riche en Plaquettes (PRP), et le 100 % correspond au signal obtenu en présence d'un Plasma Pauvre en Plaquettes (PPP), l'agrégation plaquettaire entraînant l'éclaircissement du milieu et donc l'augmentation de la transmission lumineuse. La réponse plaquettaire à chaque agoniste est mesurée au cours du temps, ce qui permet d'évaluer différentes phases, représentées sur la figure 18 : latence, changement de forme des plaquettes, première vague d'agrégation réversible, deuxième vague d'agrégation irréversible. Les paramètres mesurés peuvent inclure, selon l'agoniste, le temps de latence, la pente de la courbe d'agrégation et le pourcentage maximal d'agrégation, paramètre systématiquement étudié⁴⁴.

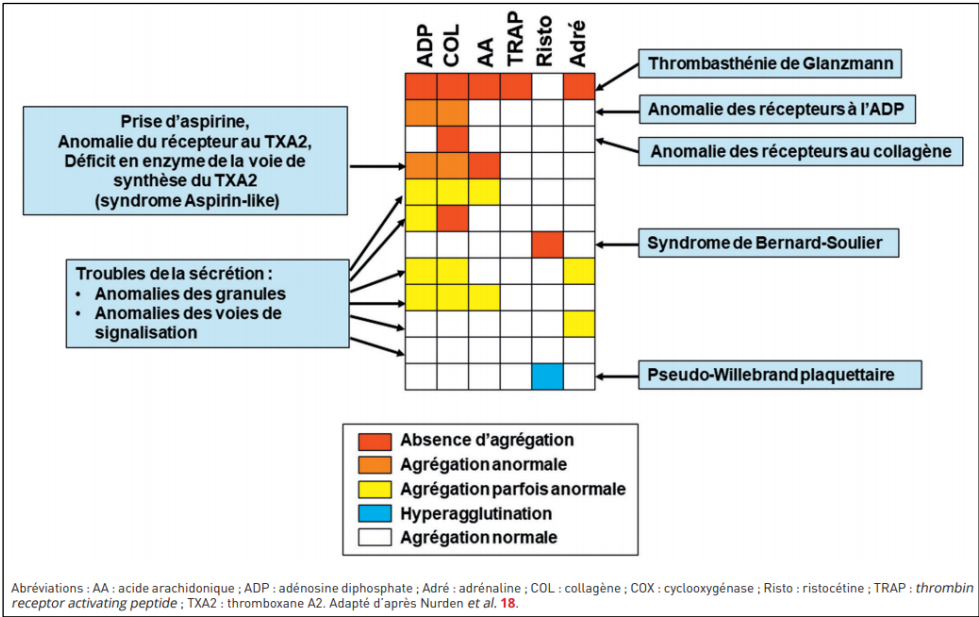
[Figure 18] : Différentes phases des profils d'agrégation plaquettaire, issue de la présentation du Pr Thomas Lecompte, Service d'Hématologie Biologique, CHU Nancy



Une diminution de l'agrégation plaquettaire induite par un ou plusieurs de ces agonistes permet d'évoquer une anomalie fonctionnelle plaquettaire.

En effet, l'agrégométrie par transmission lumineuse permet aisément d'identifier les troubles de l'adhésion, de l'agrégation, les anomalies de la voie de synthèse du TXA₂, et certains déficits en récepteurs membranaires. Cependant, cette technique est nettement moins sensible aux anomalies de la sécrétion, ce qui explique que des anomalies des granules denses ne seront pas systématiquement mises en évidence car elles n'affecteront pas toujours le profil d'agrégation plaquettaire (figure 19).

[Figure 19] : Profils d'agrégation plaquettaire observables au cours des principales thrombopathies²³



Il est important d'avoir à l'esprit qu'en cas de maladie du pool vide delta-plaquettaire, les anomalies d'agrégation sont souvent modérées, surtout lorsque de fortes concentrations d'agonistes sont testées²⁷.

Un profil d'agrégation plaquettaire caractéristique d'anomalies des granules denses a cependant été suggéré par plusieurs auteurs, et ce profil serait présent chez environ un tiers des patients^{17,19} :

- Anomalies de l'agrégation plaquettaire en réponse au collagène, en particulier à de faibles concentrations ($< 2,5 \mu\text{g/mL}$), se traduisant notamment par un allongement du temps de latence et une diminution de l'amplitude maximale d'agrégation (figure 20).
- Anomalies de l'agrégation plaquettaire en réponse à l'ADP, testée à faibles concentrations ($< 5 \mu\text{M}$), caractérisées par une agrégation souvent réversible. Les anomalies des granules denses impactent la capacité des plaquettes à agréger de façon irréversible, par absence d'amplification de l'activation plaquettaire, se traduisant sur le profil d'agrégation par une absence de « seconde vague » (figure 20).

[Figure 20] : Profils d'agrégation plaquettaire à l'ADP et au collagène observés chez certains patients avec déficit en granules denses⁹

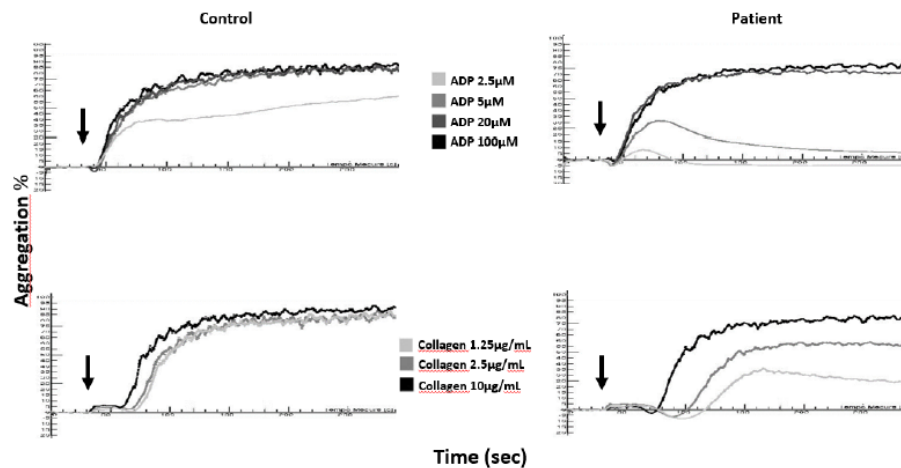


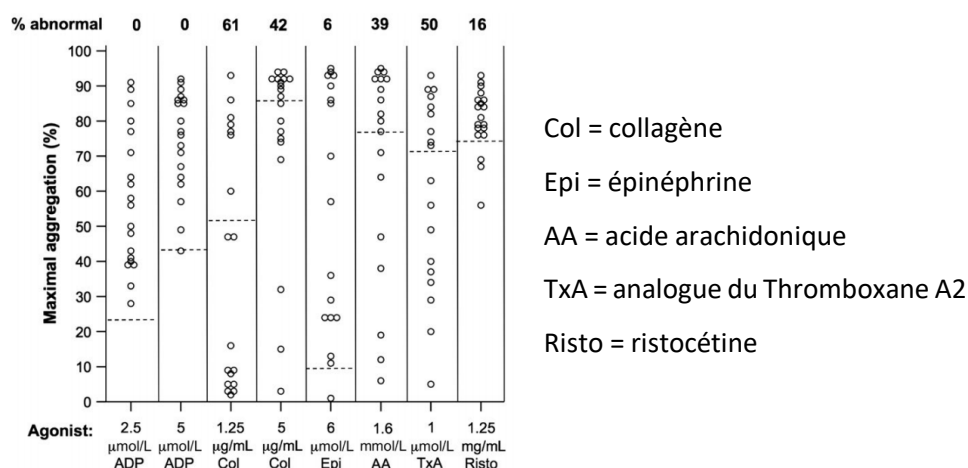
Figure 1. Aggregation curves in citrated platelet-rich plasma (cPRP) of a δ -SPD patient and a healthy control (Control) in response to ADP (2.5, 5, 20, and 100 μ M) and collagen (1.25, 2.5, and 10 μ g/mL); arrows denote the times of addition of the agonists to cPRP.

- De manière plus inconstante, l'agrégation à l'acide arachidonique peut être perturbée lorsque de faibles concentrations d'agoniste sont utilisées (< 1 mM), en relation avec l'absence d'amplification par l'ADP.
- L'agrégation à l'adrénaline (aussi appelée épinéphrine) peut être anormale, mais, elle est également souvent très variable chez les sujets sains. Par ailleurs, l'étude de *Brunet et al.* en 2018 retrouve des anomalies de l'agrégation plaquettaire en réponse à l'adrénaline chez seulement 6 % des patients ayant un déficit confirmé en granules denses⁴⁷.
- En revanche, l'agglutination en présence de ristocétine est le plus souvent normale en cas de déficit en granules denses, puisqu'elle dépend uniquement de l'interaction entre le facteur Willebrand et la glycoprotéine GPIbIXV des plaquettes, qui n'est à priori pas affectée en cas d'anomalie des granules denses.

Malgré tout, il est important de noter qu'un diagnostic de maladie du pool vide plaquettaire ne peut être écarté devant la normalité des tests d'agrégation plaquettaire, puisqu'environ un quart des patients présenteraient un profil d'agrégation parfaitement normal²⁷. Cette constatation de *Nieuwenhuis* en 1987 est corroborée par celles de *Brunet* en 2018 qui suggère que la sensibilité des TAP ne serait que de 52 % seulement pour la détection d'anomalies des granules denses plaquettaires⁴⁷. Selon cette étude, certains agonistes ne

seraient pas du tout sensibles (ADP), ou peu sensibles (adrénaline, ristocétine) pour détecter un déficit en granules denses, comme le montre la figure 21.

[Figure 21] : Agrégation plaquettaire en réponse à divers agonistes chez des sujets atteints de déficits en granules denses⁴⁷



Bien que la méthodologie relative aux tests d'agrégation plaquettaire soit qualifiée de « relativement simple » par l'ISTH, les contraintes pré-analytiques et analytiques de ces tests sont importantes. De plus, ils manquent de standardisation, rendant délicate toute comparaison des résultats entre différents centres. Ils sont chronophages, nécessitent une certaine expertise du personnel, de gros volumes de sang (plusieurs dizaines de millilitres) et sont d'interprétation parfois difficile. Ceci est particulièrement vrai en cas de thrombopénie, qui impacte les TAP dès lors que la numération plaquettaire est inférieure à 150 G/L, voire empêche leur réalisation en dessous de 100 G/L de plaquettes²³.

Les tests d'agrégation plaquettaire réalisés en première ligne pour rechercher une thrombopathie manquent donc clairement de sensibilité pour la mise en évidence des troubles sécrétoires plaquettaires et notamment des anomalies des granules denses, spécifiquement si une thrombopénie est associée⁹. Ainsi, en cas de syndrome hémorragique significatif et inexpliqué, il est recommandé et pertinent d'explorer les granules denses plaquettaires à l'aide de méthodologies adaptées. Dans cette optique, deux approches complémentaires doivent être envisagées, et seront abordées ci-après : dans un premier temps, les méthodes permettant d'évaluer la sécrétion des granules denses, puis celles explorant leur contenu endogène.

III. Exploration des granules denses plaquettaires : évaluation des capacités sécrétoires

Plusieurs méthodologies permettent d'évaluer les capacités de sécrétion des plaquettes sanguines. Ces examens permettent d'orienter vers l'existence d'un trouble sécrétoire plaquettaire, mais ne permettent pas de distinguer un déficit en granules denses (quantitatif ou qualitatif) d'un trouble sécrétoire isolé.

1) Étude de la sécrétion de sérotonine radiomarquée

La sérotonine étant l'un des principaux constituants des granules denses plaquettaires, sa quantification peut être utile pour évaluer leur sécrétion.

A ce titre, l'**étude de l'incorporation et de la sécrétion de sérotonine** radiomarquée est toujours considérée comme le test de référence pour l'évaluation des capacités de sécrétion des granules denses^{9,19}.

Le principe de ce test repose sur l'utilisation de sérotonine marquée par un radio-isotope, le plus souvent du Carbone 14 (¹⁴C) ou du Tritium (³H). Lorsqu'elle est incubée avec des plaquettes, la sérotonine radiomarquée est très rapidement incorporée dans les granules denses. Les cellules sont ensuite stimulées par des agonistes tels que le collagène (10 µg/mL) ou le TRAP (*Thrombin Receptor Activating Peptide*), un agoniste peptidique puissant du récepteur PAR-1 à la thrombine (50 µM). Ceci conduit à la sécrétion des granules denses et à une libération de sérotonine radiomarquée dans le milieu extracellulaire, qui peut être quantifiée à l'aide d'un compteur à scintillation.

Il s'agit d'une technique reproductible qui permet une évaluation quantitative objective de la capacité des plaquettes à incorporer et à sécréter la sérotonine. Cependant, l'interprétation de cet examen est parfois délicate compte tenu de possibles interférences médicamenteuses mais aussi alimentaires, qui peuvent faire varier les concentrations de sérotonine intraplaquettaire. Par exemple, certains antidépresseurs psychotropes, les Inhibiteurs Sélectifs de la Recapture de la Sérotonine (ISRS), empêchent l'incorporation de la

sérotonine dans les plaquettes, tandis que la tomate, la banane, le pamplemousse, le kiwi, l'avocat, ou encore le chocolat et les fruits secs ont tendance à augmenter ses concentrations du fait de leur richesse naturelle en tryptophane, un précurseur de la sérotonine²³.

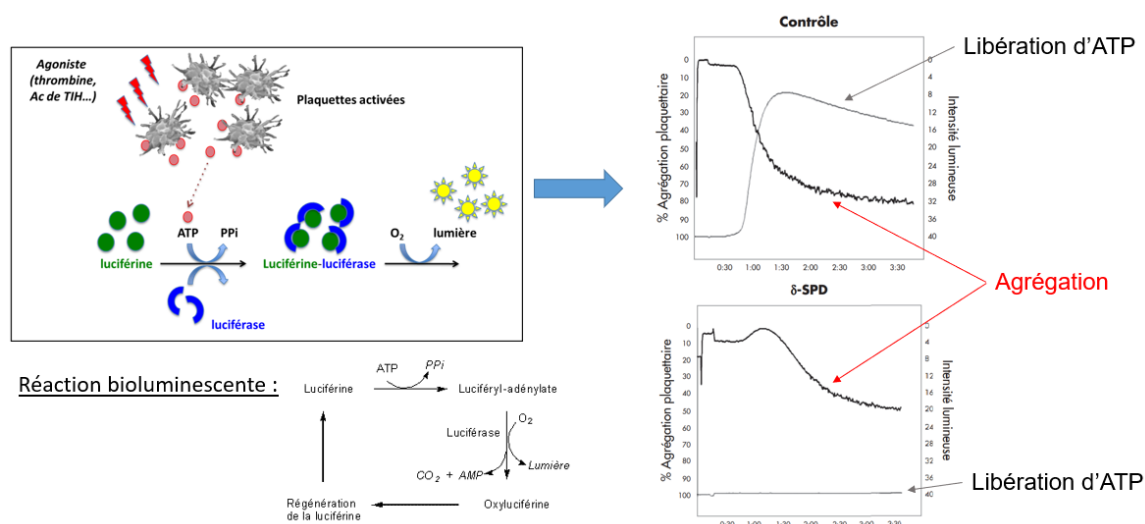
Cette technique n'est quasiment plus utilisée. En effet, seuls certains laboratoires spécialisés ont encore recours à ce test, à cause des contraintes importantes liées à l'utilisation de radioéléments, nécessitant de disposer de locaux et d'équipements adaptés à leur manipulation.

2) Étude de la libération d'ATP par lumi-agrégométrie

L'**étude de la libération d'ATP par lumi-agrégométrie** est une technique développée il y a plus de quarante ans par *Feinman et al.*⁴⁹, mais qui fait à l'heure actuelle partie des outils les plus employés pour explorer la sécrétion des granules denses plaquettaires au sein des laboratoires spécialisés³⁰. En effet, cette technique présente l'avantage d'étudier de façon simultanée l'agrégation plaquettaire et la quantité d'ATP libérée des granules denses sous l'effet d'agonistes.

Cet examen consiste en l'étude de la sécrétion d'ATP dans le milieu extracellulaire, tout au long du processus d'agrégation plaquettaire (qui peut être mesurée par transmission lumineuse ou impédance). C'est pour cela que la dénomination « *ATP release* » est couramment rencontrée pour désigner ce test, dont le principe (figure 22) repose sur une réaction de bioluminescence catalysée par le complexe luciférine/enzyme luciférase, en présence d'ATP et d'oxygène moléculaire (O₂). La luciférine, en présence de l'ATP libérée, est convertie en luciféryl-adénylate qui subit ensuite une réaction de décarboxylation oxydative sous l'action de la luciférase et d'O₂, permettant sa transformation en oxyluciféryl-adénylate et l'émission de lumière quantifiable²⁰. Par cette méthode, seule l'ATP sécrétée des granules est mesurée, le pool métabolique restant dans le cytoplasme. Théoriquement, le contenu en ADP des granules denses semble pouvoir être déduit : la conversion de l'ADP en ATP par une réaction phosphoénolpyruvate-pyruvate kinase, suivie d'une nouvelle mesure de l'ATP, permettrait de calculer l'ADP plaquettaire par soustraction²⁰.

[Figure 22] : Exploration de la sécrétion d'ATP par lumi-agrégométrie, adaptée de Fiore¹⁹



Sur la gauche : principe de la réaction bioluminescente permettant l'évaluation de la concentration d'ATP sécrétée. Sur la droite : Exploration par lumi-agrégométrie de la sécrétion d'ATP (tracé gris) en PRP en réponse au collagène, en parallèle de l'agrégation (tracé noir), chez un sujet sain et présentant une maladie du pool vide delta-plaquettaire (δ-SPD)

Même si cette technologie reste encore peu évaluée, elle semble plus sensible que les tests d'agrégation plaquettaire classiques pour le dépistage des anomalies de sécrétion des granules denses. En effet, l'article de Brunet en 2018 suggère que la sensibilité de l'étude de la libération d'ATP par lumi-agrégométrie serait de 70 % pour la détection d'anomalies des granules denses plaquettaires, contre seulement 52 % pour les TAP⁴⁷. Cependant, il est mis en évidence que seulement 30 % des sujets atteints de déficits confirmés en granules denses avaient une libération altérée d'ATP avec tous les agonistes. De plus, il est important de noter que cet examen ne permet pas non plus de distinguer un défaut de sécrétion isolé, potentiellement en lien avec une anomalies des voies de signalisation, d'un déficit en granules denses plaquettaires. Par ailleurs, il est uniquement disponible sur la gamme d'agrégomètres Chronolog®, nécessite le recours à des réactifs coûteux et semble manquer de reproductibilité, avec d'importantes variabilités intra- et interindividuelles rapportées, en particulier lorsque de faibles concentrations d'agonistes sont utilisées⁵⁰. L'étude publiée par Pai et al en 2011 s'est intéressée à l'intérêt d'une combinaison d'agonistes, et a étudié ceux les plus à même de détecter une anomalie fonctionnelle plaquettaire. Les auteurs recommandent ainsi de tester la libération d'ATP des granules denses à l'aide d'un panel comprenant l'U46619, un agoniste du récepteur au TXA₂ à 1 µmol/L, l'adrénaline à 6 µmol/L et le collagène à 5,0 µg/mL, voire la thrombine à 1 U/mL⁵¹.

3) Mesure biochimique de la sécrétion de sérotonine

La **mesure de la sécrétion de sérotonine** par méthode chimique ou biochimique représenterait une alternative à la quantification de l'ATP libérée, et surtout à la mesure de la libération de sérotonine radiomarquée décrites précédemment⁹. Cependant, cette méthode semble peu utilisée en pratique courante.

Après une étape d'activation des plaquettes, la sérotonine peut être mesurée dans le surnageant plaquettaire par méthode immuno-enzymatique à l'aide d'un kit ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) commercial, ou bien par HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) couplée à un spectrofluoromètre (excitation à 285 nm et émission à 350 nm), soit à l'aide d'un détecteur électrochimique (généralement une électrode en verre/carbone avec une électrode de référence argent/chlorure d'argent). Initialement, selon des études de *Ge et al.*, la détection électrochimique ou ampérométrique a été utilisée pour mesurer la libération de sérotonine à partir d'une seule plaquette grâce à une microélectrode en fibre de carbone⁵². La méthode a ensuite été adaptée pour suivre la cinétique de libération de sérotonine simultanément à l'agrégation plaquettaire, grâce à une mesure en temps réel de la sécrétion des granules denses par un système de voltampérométrie cyclique à balayage rapide⁵³. Il s'agit d'une technique permettant l'enregistrement d'une réponse sous forme de courant, résultant d'une variation du potentiel de l'électrode de travail sur laquelle se produit la réaction électrochimique étudiée.

4) Étude de l'expression du CD63 en cytométrie en flux

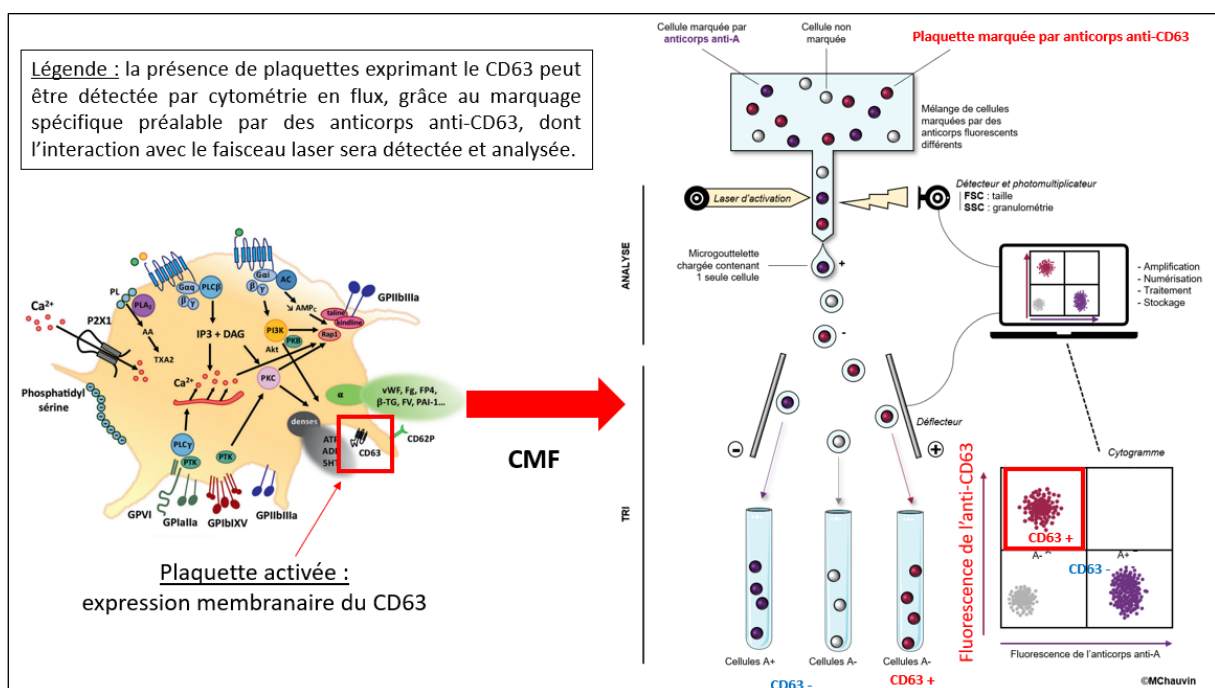
L'**étude de l'expression de l'antigène CD63 par cytométrie en flux** au repos et après activation plaquettaire est maintenant très utilisée pour diagnostiquer les troubles des granules denses^{9,19}.

En effet, la cytométrie en flux (CMF) est aujourd'hui largement utilisée en hémostase pour étudier les plaquettes sanguines. Elle permet de quantifier facilement certains récepteurs glycoprotéiques de surface, mais aussi d'évaluer la réponse des plaquettes à

différents agonistes (ADP, TRAP, etc...) en mesurant l'expression de marqueurs uniquement exprimés à leur surface après stimulation. Cette technologie présente aussi plusieurs avantages : elle est assez rapide à réaliser, nécessite un faible volume de PRP ou de sang total (adaptée à une population pédiatrique) et reste interprétable même en cas de thrombopénie marquée, contrairement à la plupart des autres méthodes fonctionnelles d'exploration des plaquettes. Des efforts de standardisation ont déjà été effectués et d'autres sont actuellement en cours, puisque l'ISTH a constitué un groupe de travail pour rédiger des recommandations sur la standardisation de la cytométrie en flux pour l'évaluation des anomalies héréditaires et acquises du nombre et de la fonction des plaquettes²³.

Le CD63 (granulophysine) est une protéine transmembranaire normalement présente dans la plaquette non activée au sein des granules denses et des lysosomes. Il s'agit d'un marqueur spécifique d'activation, dont l'expression à la surface des plaquettes, avant et après activation par des agonistes, est facilement mesurée par cytométrie en flux (figure 23). L'expression du CD63, en réponse aux agonistes, est ainsi rapportée abaissée en cas de déficit en granules denses plaquettaires.

[Figure 23] : Etude de l'expression du CD63 par cytométrie en flux, adaptée de la figure de Manon Chauvin⁵⁴



Ce test a cependant lui aussi des limites : comme les autres tests évaluant la sécrétion des granules, il ne permet pas de distinguer un défaut de sécrétion d'un déficit en granules denses. Par ailleurs, cette glycoprotéine étant aussi exprimée par les lysosomes, elle n'est pas complètement spécifique des granules denses plaquettaires. Cet examen a été évalué en 2014 pour le dépistage des anomalies de sécrétion plaquettaire⁵⁵, et l'analyse, effectuée sur 61 patients, a montré une bonne corrélation entre cette approche et la lumi-agrégométrie (concordance du diagnostic dans 84 % des cas). Cette étude a montré que le CD63 est un bon marqueur des granules denses plaquettaires, comme en témoigne son expression membranaire très réduite après activation plaquettaire chez des patients atteints du syndrome d'Hermansky-Pudlak. Néanmoins, le marquage doit toujours être réalisé sur des plaquettes au repos et après activation, car certains déficits en granules denses seraient associés à une accumulation de CD63 dans la membrane plasmique, pouvant laisser penser à tort à une sécrétion correcte de ces granules⁵⁵. Des études complémentaires sur de plus larges cohortes de patients sont nécessaires afin de confirmer ces premiers résultats, mais cet examen pourrait néanmoins constituer un bon test de dépistage des déficits en granules denses.

5) Test à la mépacrine

Le **test à la mépacrine** est un examen simple et largement utilisé qui permet d'évaluer les capacités d'incorporation et de sécrétion des granules denses plaquettaires.

La mépacrine est un marqueur fluorescent dérivé de l'acridine orange possédant une forte affinité pour l'ATP et l'ADP, qui lui permet donc de s'incorporer de façon rapide et sélective dans les granules denses des plaquettes vivantes, via le même transporteur que la sérotonine (SERT)⁹. La spécificité de la mépacrine pour les granules denses (absence de marquage des lysosomes) a été démontré en 1981 par *Skaer et al.*⁵⁶.

Lors du test, la mépacrine est incubée en présence des plaquettes, qui sont ensuite stimulées par divers agonistes, ce qui permet de mesurer à la fois son incorporation et sa sécrétion par des méthodes fluorimétriques. La fluorescence plaquettaire peut en effet être

quantifiée par microscopie ou en cytométrie en flux, avant et après stimulation. La comparaison de la fluorescence émise à l'état basal et après stimulation, permet l'analyse semi-quantitative du contenu des granules denses et des capacités sécrétoires des plaquettes (plus aisé en CMF).

Bien que cette méthode puisse être utilisée pour évaluer la présence et la sécrétion de granules denses, elle présente des inconvénients. Il existe des limitations dues à la fluorescence : cette dernière est instable, s'éteint rapidement et il peut exister un bruit de fond lié à une rétention excessive de mepacrine dans le cytoplasme. C'est pourquoi, il est recommandé de ne pas utiliser des concentrations trop élevées de mepacrine ($\leq 2,5 \mu\text{M}$)¹⁹. Une étude publiée en 2019 et portant sur 156 patients atteints de thrombopathie, dont 11 avec une maladie du pool vide delta-plaquettaire, a évalué les performances du test à la mepacrine à un test de référence déterminant le contenu en nucléotides (ADP/ATP)⁵⁷. Elle met en évidence que la précision du test à la mepacrine n'est que modérée, avec une sensibilité rapportée de 76 % et une spécificité de 83 %. Cependant, la valeur prédictive négative calculée pour ce test apparaissait meilleure (97 %), ce qui a motivé les auteurs à conclure que le test à la mepacrine pouvait être utilisé pour exclure un déficit en granules denses chez les patients ayant une tendance hémorragique, ou encore pour caractériser les déficits sévères.

6) Étude de la sécrétion des polyphosphates

L'étude de la sécrétion des polyphosphates ne semble pas courante dans le cadre de l'évaluation des capacités sécrétoires des plaquettes.

Cette technique nécessite l'utilisation du DAPI (*Di Aminido Phenyl Indol*) qui est une molécule fluorescente capable de se lier fortement aux bases adénine (A) et thymine (T) de l'ADN, et formant des complexes avec les polyphosphates plaquettaires, permettant ainsi leur quantification. Le complexe peut être détecté grâce à un microscope à fluorescence ou par cytométrie en flux, à une longueur d'onde de 550 nm après excitation à 415 nm, sans interférence de marquage avec l'ADN/ARN ou l'ATP/ADP. Après extraction-purification des plaquettes, cette méthode peut ainsi être utilisée pour mesurer la libération des

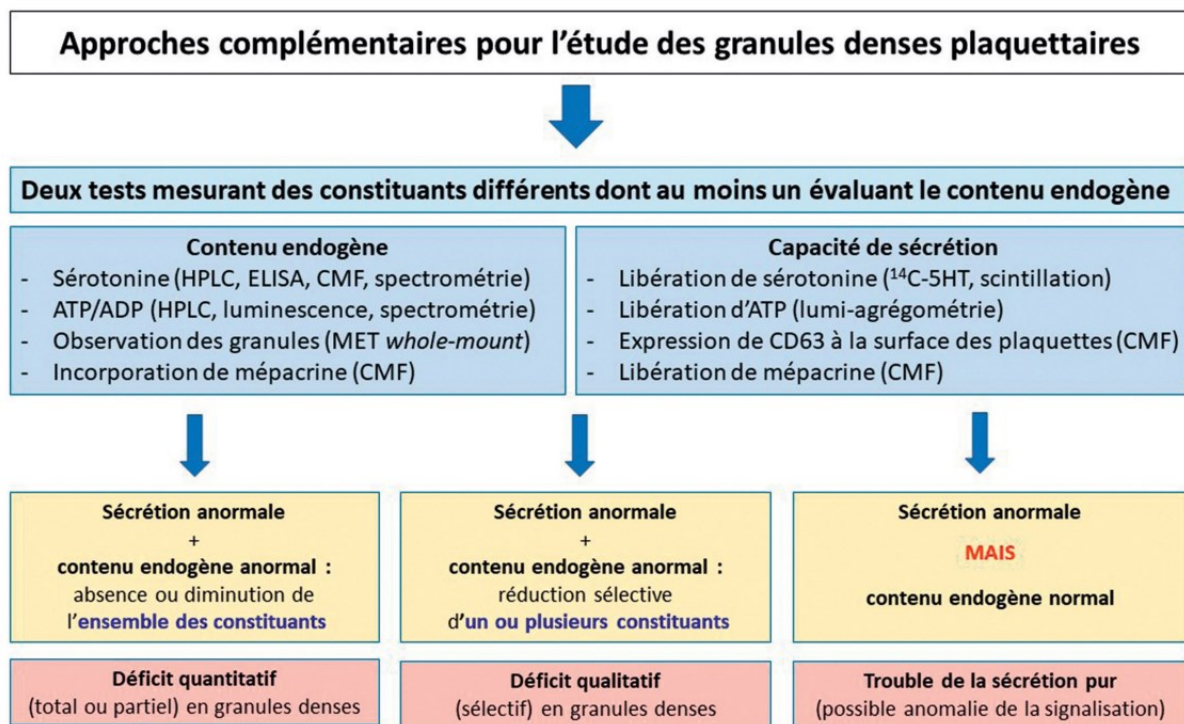
polyphosphates, avec un seuil de quantification de l'ordre de 25 ng/mL⁹. Elle n'est cependant pas adaptée au comptage des granules denses au microscope en raison de l'autofluorescence non spécifique d'autres composants plaquettaires et l'extinction rapide du DAPI⁹. Des méthodes de coloration très sensibles et spécifiques en gels d'électrophorèse ont aussi été étudiées. *Smith et Morrissey*⁵⁸ expliquent que le DAPI lié au polyphosphates donne une fluorescence jaune dans les gels de polyacrylamide, tandis que sa liaison aux acides nucléiques donne une fluorescence bleue. La découverte du photoblanchiment rapide du DAPI lié aux polyphosphates, à pH alcalin (10,5), a permis de développer une méthode de coloration négative sur gels, encore plus sensible et spécifique, qui distingue les polyphosphates des acides nucléiques et améliore considérablement la limite de détection des polyphosphates. Dans leur publication de 2009, *Hernandez et al.* ont établis les concentrations en polyphosphates retrouvées dans les plaquettes de la population générale, et démontrent des concentrations notablement plus faibles au cours de la maladie du pool vide delta-plaquettaire⁵⁹.

IV. Exploration des granules denses plaquettaires : dénombrement et étude du contenu endogène granulaire

En l'état actuel des connaissances, il est recommandé dans la mesure du possible, et en complément des tests évaluant les fonctions plaquettaires, d'évaluer le contenu des granules denses par dosage de sérotonine, quantification des nucléotides et/ou étude en microscopie électronique (notamment par la technique dite de « whole-mount »).

La figure 24 est une proposition concernant la stratégie d'exploration des granules denses, adaptée des propositions du CRPP en 2017¹⁹, et ayant pour but d'aider au diagnostic et à la caractérisation des déficits en granules denses plaquettaires.

[Figure 24] : Stratégie proposée d'exploration des granules denses plaquettaires, adaptée de Fiore et al.²³



Abréviations : ADP : adénosine diphosphate ; ATP : adénosine triphosphate ; CMF : cytométrie en flux ; ELISA : enzyme-linked immunosorbent assay ; HPLC : chromatographie liquide haute performance ; MET : microscopie électronique à transmission ; ¹⁴C-5HT : sérotonine radiomarquée au ¹⁴carbone.

En 2021, il est difficile de proposer une hiérarchie précise concernant ces explorations, compte tenu de l'absence de réelles comparaisons des méthodologies entre elles, et de leur manque de standardisation. Cependant, leur utilisation est essentielle pour confirmer un

diagnostic de déficit en granules denses, en mettant en évidence la diminution ou l'absence d'un ou plusieurs constituants endogènes granulaires. En pratique, il est recommandé de rechercher un déficit d'au moins deux constituants, afin d'apporter de la robustesse au diagnostic et de caractériser de façon plus précise le type de déficit ; ce dernier pouvant être quantitatif (déficit global du nombre de granules denses) ou qualitatif (déficit sélectif d'un ou plusieurs constituants endogènes). Par exemple, pour le diagnostic des déficits qualitatifs, l'analyse de l'ensemble des constituants granulaires sera nécessaire pour préciser et caractériser la maladie du pool vide delta-plaquettaire¹⁹.

1) Évaluation du contenu granulaire et dosages spécifiques (nucléotides, sérotonine et autres protéines)

Les nucléotides à adénine (ATP/ADP) et la sérotonine sont mesurables après activation des plaquettes pour évaluer la sécrétion des granules denses, mais ces molécules peuvent également être quantifiées après lyse des plaquettes afin d'évaluer leur présence à l'état basal dans ces granules.

Si **l'ATP et l'ADP** sont présentes à des concentrations élevées au sein des granules denses plaquettaires, l'ATP est également retrouvée de façon significative dans le cytoplasme des plaquettes (pool métabolique), expliquant qu'elles contiennent globalement plus d'ATP que d'ADP (ratio total ATP/ADP = 1,5-2,0). En revanche, au sein des granules denses, c'est l'ADP qui est majoritaire, avec un ratio ATP/ADP de 0,65 à 0,78²⁰. La sécrétion nucléotidique plaquettaire en réponse à une activation comprenant normalement plus d'ADP que d'ATP, un ratio total ATP/ADP augmenté (supérieur à 4) orienterait fortement vers un déficit du contenu granulaire en ADP²⁰. Ce dernier peut avoir comme origine, soit un déficit en granules denses (quantitatif), soit un défaut isolé du stockage de l'ADP dans les granules (qualitatif), comme au cours du déficit en transporteur MRP4³⁶.

Bien que le dosage des nucléotides plaquettaires totaux (lysat plaquettaire) et après stimulation puisse être effectué par Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC), bioluminescence, ou encore spectrométrie de masse, il reste cependant restreint à quelques laboratoires spécialisés¹⁹. En effet, la chromatographie en phase liquide et la spectrométrie

de masse sont des techniques spécialisées très sensibles, spécifiques, précises et peu coûteuses en réactifs. Cependant, ces méthodes nécessitent un équipement onéreux, et le dosage des nucléotides présente des contraintes, liées à l'instabilité de l'ATP/ADP qui sont rapidement dégradées, et aux conditions pré-analytiques, notamment le traitement délicat de l'échantillon pour extraction des nucléotides (nécessité de précipitation des protéines à l'acide perchlorique concentré)¹⁹.

La **sérotonine** peut également être quantifiée en cas de suspicion d'anomalies des granules denses. Il est intéressant de noter que la quasi-totalité de la sérotonine circulante est contenue dans les granules denses des plaquettes. Son dosage peut donc être effectué sur Plasma Riche en Plaquettes (PRP), après lyse des plaquettes et libération de la sérotonine dans le milieu extracellulaire. Bien que ce dosage soit le plus souvent effectué par HPLC, des tests immuno-enzymatiques, en cytométrie en flux (CMF) ou en spectrométrie de masse ont également été proposés¹⁹. Les méthodes immuno-enzymatiques de type ELISA semblent avoir une bonne sensibilité⁶⁰, et des troussees commerciales sont disponibles. La disponibilité d'anticorps dirigés contre la sérotonine est également mise à profit pour sa détection en cytométrie en flux, une technologie dorénavant accessible à la plupart des établissements de biologie médicale. En pratique, des plaquettes à l'état basal sont fixées, perméabilisées, puis incubées avec un anticorps monoclonal dirigé contre la sérotonine humaine et couplé à un marqueur fluorescent qui sera détectable en CMF (semi-quantitatif) après excitation lumineuse¹⁹. Ainsi, un dosage faible de sérotonine peut faire évoquer un déficit en granules denses, il est toutefois important de garder à l'esprit que certains facteurs peuvent diminuer (inhibiteurs de la recapture de la sérotonine) ou augmenter (banane, kiwi, pamplemousse, tomate, avocat, chocolat, fruits secs...) les concentrations de sérotonine intra-plaquettaire²³.

La mesure des **polyphosphates** intraplaquettaires peut être réalisée grâce au DAPI, comme précisé dans le chapitre précédent, mais cette approche présente des limites liées à l'autofluorescence non spécifique du DAPI et une extinction rapide du signal, expliquant qu'elle ne soit pas utilisée en pratique courante⁹.

Enfin, le marquage de protéines membranaires, telles que le CD63, peut être utilisé pour analyser les granules denses plaquettaires. Le **marquage de CD63** à l'aide d'une méthode d'imagerie bicolore en microscopie à haute résolution, a été proposé en 2016 par *Westmoreland et al.*⁶¹. Une acquisition séquentielle durant l'excitation de l'échantillon à deux longueurs d'ondes différentes (488 nm pour le CD63 et 561 nm pour la tubuline) permet de délimiter différentes zones plaquettaires. Cette méthode permettrait ainsi d'orienter le diagnostic vers un déficit quantitatif en granules denses, en cas d'absence de marquage visible de CD63. Cependant, sa principale limite semble être liée au marquage non spécifique des granules denses, puisque le CD63 est aussi présent dans la membrane des lysosomes.

L'étude pratique qui découlera de ce travail bibliographique s'intéressera à l'apport de la microscopie électronique pour le diagnostic des déficits en granules denses plaquettaires. C'est pourquoi, la suite de ce manuscrit s'attachera tout particulièrement à décrire cette approche. La place de la microscopie électronique dans la stratégie diagnostique des anomalies des granules denses plaquettaire n'est pas unanime. En effet, les recommandations diagnostiques des anomalies plaquettaires constitutionnelles de l'ISTH en 2014⁴¹, sont d'avoir recours à la microscopie électronique en première ligne pour explorer les granules denses, tandis que le CRPP propose, dans son algorithme décisionnel en 2017¹⁹, d'explorer les granules denses seulement en deuxième ligne, en partie grâce à la technique de microscopie électronique en transmission. En pratique, le caractère actuellement peu répandu des plateformes de microscopie électronique à usage hospitalier, et le manque de personnel formé, placent bien souvent cette méthodologie en deuxième voire troisième ligne, alors qu'elle est toujours considérée comme l'examen de référence pour identifier un déficit en granules denses.

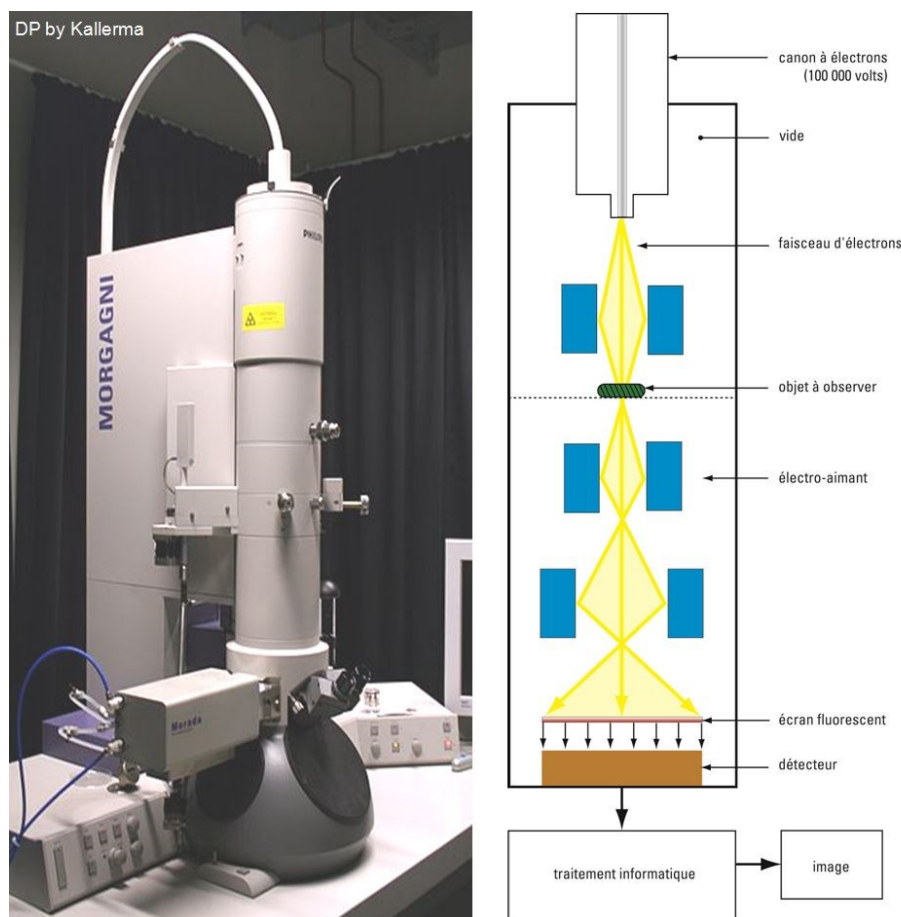
2) Microscopie électronique en transmission

La Microscopie Electronique en Transmission (MET) contribue depuis plus de 50 ans à apporter des connaissances majeures en biologie cellulaire⁶², et prend une place de plus en plus importante compte tenu de sa capacité à analyser très finement l'ultrastructure des échantillons biologiques.

En effet, cette technique permet d'obtenir une image agrandie (avec un grossissement allant jusqu'à $\times 100.000$) d'échantillons biologiques préparés. Le couplage à une analyse des rayons X émis lors de l'interaction du faisceau d'électrons avec l'échantillon, détaillée plus loin, permet également l'analyse de sa composition atomique, via une sonde EDS (*energy dispersive spectroscopy*)⁶³.

La MET est basée sur l'émission d'un faisceau d'électrons dans une colonne sous vide, focalisé grâce à un système de lentilles magnétiques, permettant d'obtenir une image agrandie de l'échantillon (figure 25). Les électrons traversant l'échantillon ou « électrons transmis » sont ensuite détectés par un écran fluorescent ou le capteur d'une caméra numérique. L'image ainsi obtenue est une section de l'échantillon, sur laquelle les structures denses aux électrons apparaîtront plus sombres que les structures peu denses aux électrons.

[Figure 25] : Représentation du microscope électronique en transmission⁶⁴



Tout l'intérêt de cette technique réside dans la longueur d'onde courte du faisceau d'électrons, 100.000 fois plus courte que celle des photons du spectre de lumière visible. De ce fait, la MET permet d'atteindre une résolution nanométrique, voire subnanométrique (jusqu'à 0,2 nm)⁶⁵, bien inférieure à celle des microscopes optiques à haute résolution. La MET s'avère précieuse dans l'analyse des organites car elle est la méthode permettant de visualiser le mieux toute la complexité de ces structures subcellulaires.

Néanmoins, cette technique reste un outil plus fréquemment utilisé dans le domaine de la recherche que dans le domaine du diagnostic hospitalier. En effet, comme d'autres méthodes d'imagerie, la MET souffre d'un manque de standardisation (variabilité de l'échantillon, des réglages du microscope, du nombre de plaquettes comptées, subjectivité dans l'identification des granules...). De plus, malgré ses performances, son utilisation est restreinte à quelques laboratoires spécialisés car elle présente également plusieurs limites. Parmi ces dernières, on peut noter la nécessité de disposer d'équipements coûteux et d'un personnel formé et expérimenté à l'utilisation et l'analyse en MET. De plus, le caractère chronophage de l'analyse limite de fait le nombre de sections cellulaires observables. Compte-tenu du principe même de cette technique, il est également impossible d'observer des cellules vivantes en temps réel, du fait de l'observation sous vide et de la fixation nécessaire. De plus, la présence d'artefacts liés à un défaut de fixation ou au contrastant peut gêner l'observation.

Deux types d'approches complémentaires par technique de microscopie électronique en transmission peuvent être utilisées pour étudier les plaquettes sanguines, et ont un intérêt potentiel pour le diagnostic des thrombopathies. L'analyse ultrastructurale plaquettaire par technique classique et le whole-mount, permettent d'une part d'étudier le contenu des plaquettes à travers l'analyse de coupes, et d'autre part de quantifier le nombre de granules denses par plaquette sur plaquettes entières.

La technique de MET par « whole-mount » sera abordée en premier lieu puisqu'il s'agit du « gold-standard » utilisé dans le cadre du diagnostic d'une maladie du pool vide delta-plaquettaire. L'analyse ultrastructurale plaquettaire par technique classique sera abordée par la suite, puisqu'elle reste la technique historique permettant d'apprécier la totalité du

contenu plaquettaire, et notamment de quantifier les granules alpha, ce qui peut avoir un intérêt pour rechercher un déficit combiné.

a. Whole-mount plaquettaire

Principe de la méthode et préparation de l'échantillon :

L'analyse plaquettaire en microscopie électronique en transmission (MET) par technique « whole-mount » (soit sur plaquettes entières) est considérée comme la technique de référence pour le dénombrement et la confirmation d'un déficit en granules denses. C'est un examen essentiel qui permet l'évaluation quantitative voire qualitative des granules denses, et qui est donc recommandé pour le diagnostic de la maladie du pool vide delta-plaquettaire, en complément des tests fonctionnels plaquettaires, et, dans l'idéal, de l'évaluation du contenu granulaire.

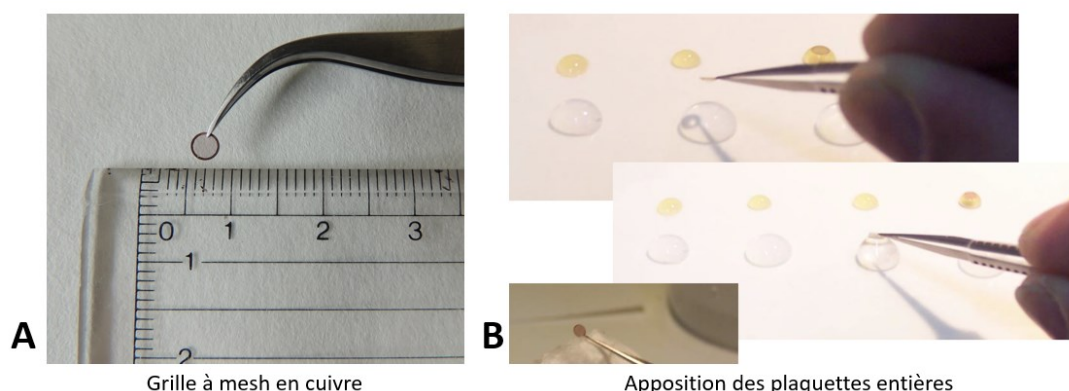
Pour replacer la méthode dans une perspective historique, la première publication à faire référence à cette technique est probablement celle de *Brian S. Bull en 1966*⁶⁶, où il était question d'analyser des « plaquettes entières non fixées et non colorées » en microscopie électronique en transmission. Au sein de ces plaquettes, il a été décrit des corps denses aux électrons et ronds ou « en forme de têtards », qui correspondront aujourd'hui aux granules denses plaquettaires. Concernant l'étude du contenu plaquettaire, la localisation de la sérotonine plaquettaire au sein de granules naturellement denses aux électrons, a été suggérée dans les années suivantes lors qu'ils ont été examinés par *White en 1969*⁶⁷. Le rôle du calcium dans cette opacité naturelle aux électrons n'a été démontré que dans la décennie suivante, en 1974 par *Martin et al.*⁶⁸, tout comme la co-localisation du calcium et du phosphore, par *Skaer et al.*⁶⁹. La co-localisation de la sérotonine et de l'ATP avait été mentionnée plus tôt, en 1958 par *Born et al.*⁷⁰. Plus récemment dans les années 1980-2000, les pyrophosphates et les polyphosphates ont été identifiés comme participant à l'opacité électronique des granules denses⁷¹.

Le dénombrement des granules denses plaquettaires est aujourd'hui couramment effectué à l'aide de la méthode de préparation et d'analyse qui a été décrite par *White*⁷², dite

du « whole-mount ». Cette technique permet une analyse spécifique des granules denses plaquettaires qui peuvent être dénombrés, tout en appréciant leur taille et leur forme.

La préparation de l'échantillon est plus simple et plus rapide que la technique de MET « classique ». Les plaquettes sont apposées natives, entières et non fixées sur des « grilles à mesh » d'environ 3 mm de diamètre, recouvertes d'une fine couche de plastique formvar (figure 26A). Chaque grille est incubée pendant 1 minute dans une petite goutte de plasma riche en plaquette, puis brièvement lavée dans une goutte d'eau stérile (l'excédent étant rapidement éliminé par capillarité au bord d'un papier de soie), et séchée par mouvements lents et larges à l'air libre (figure 26B). Un avantage majeur de cette technique est qu'aucune étape de fixation ni de marquage ne sont nécessaires. Il est cependant possible d'utiliser des techniques cytochimiques afin de renforcer l'opacité naturelle des granules denses aux électrons, en particulier par la réaction uraffine de *Richards et Da Prada* qui favorise la visualisation des nucléotides⁷³. La grille peut ensuite directement être insérée dans la colonne du microscope électronique en transmission, à l'aide d'un porte-échantillon qui place l'échantillon dans l'axe du faisceau d'électrons ; l'analyse microscopique des plaquettes « entières » peut alors commencer.

[Figure 26] : Préparation des plaquettes par technique whole-mount



L'accès à une plateforme de microscopie électronique avec des opérateurs formés au dénombrement des granules denses est un facteur limitant de la réalisation du whole-mount. En revanche, la préparation des échantillons est simple, nécessite peu de matériel et permet de les adresser dans les plus brefs délais à un laboratoire de microscopie électronique habilité.

L'adressage des échantillons se fait dans un contenant de transport à température ambiante assurant la protection vis-à-vis de la poussière, de la lumière et de l'humidité¹⁹.

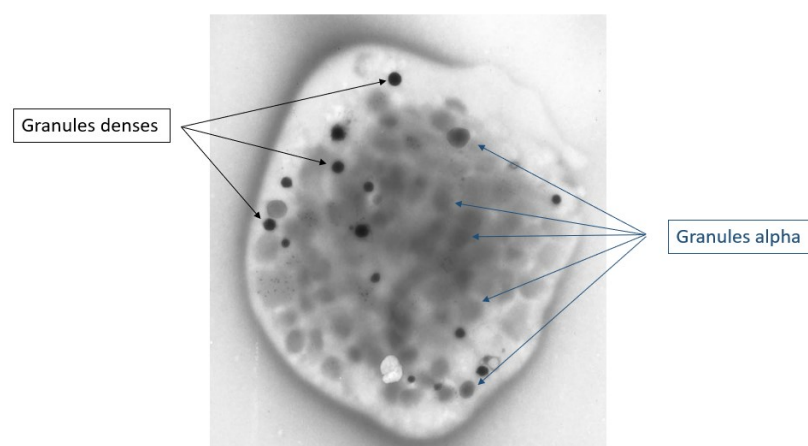
Analyse ultrastructurale et morphométrique des granules denses :

Cette technologie permet d'observer et de quantifier assez facilement les granules denses grâce à leur richesse en calcium et phosphates qui les rend opaques aux électrons. Bien que moins accessible que l'agrégométrie ou l'étude de la libération d'ATP en lumi-
agrégométrie, elle semble plus sensible et reproductible pour détecter un déficit en granules denses⁴⁷.

L'analyse ultrastructurale des caractéristiques morphologiques des granules denses est indispensable pour leur dénombrement, afin de reconnaître ces organites spécifiques. L'observation d'une centaine de plaquettes, avec un grossissement allant de x 2.000-4.000 à x 80.000-150.000, est en général nécessaire pour l'identification et le dénombrement des granules denses⁹.

La figure 27 présente une plaquette visualisée en MET par technique whole-mount : les granules denses apparaissent noirs (opaques aux électrons) en raison de leur teneur en calcium, mais ils varient à la fois en taille et en densité. De nombreux éléments gris beaucoup moins denses aux électrons peuvent être visualisés et correspondent aux granules alpha, environ 10 fois plus nombreux que les granules denses.

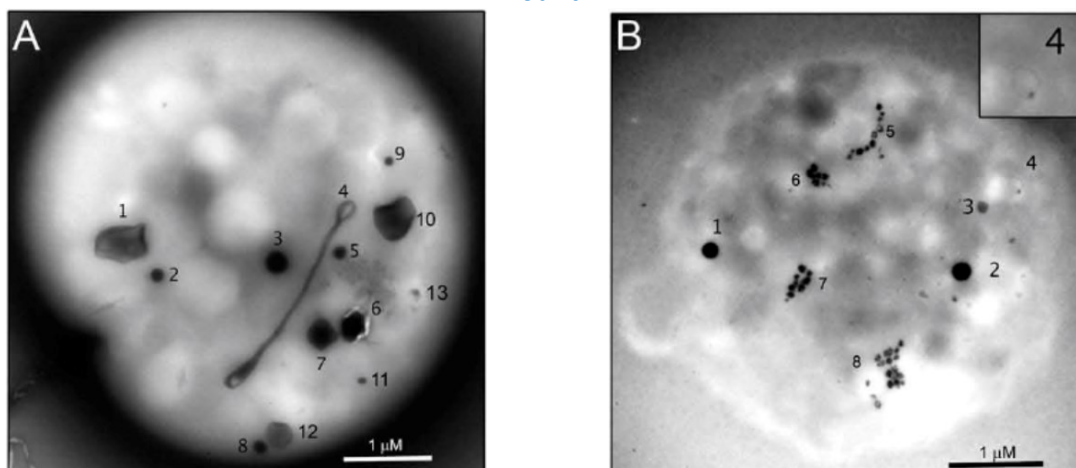
[Figure 27] : Whole-mount plaquettaire en microscopie électronique en transmission⁷⁴



Les critères morphologiques actuellement utilisés pour la reconnaissance des granules denses en whole-mount par MET sont décrits et illustrés ci-après (figure 28)⁷⁵ :

- Les granules denses « typiques », représentés sur le cliché A par les numéros 2,3,5,6 et 8 ; et sur le cliché B par les numéros 1 et 2, sont décrits comme :
 - Uniformément denses (noirs opaques)
 - Parfaitement ronds avec un contour net
 - De diamètre supérieur à 50 nm
- Quelques variations morphologiques peuvent s'observer :
 - Présence d'une expansion périphérique (queue) : élément 4 du cliché A
 - Présence de processus périphériques fins donnant un aspect chevelu
 - Forme d'anneaux ou de « paniers de baskets » : élément 4 du cliché B
- A l'inverse, il ne faut pas inclure dans l'analyse les éléments suivants, assimilés à de « faux » granules denses, qui pourraient correspondre à des formes non matures de granules delta ou des éléments qui n'ont pas été incorporés au sein de ces organites (calcium, phosphore...)
 - Éléments larges et de densité faible ou hétérogène (cliché A : 1, 7, 10 et 12)
 - Amas ou chaînettes de petites particules plus ou moins denses (cliché B : 5, 6, 7 et 8)
 - Éléments très petits (moins de 50 nm) ou punctiformes, plus ou moins denses (cliché A : 9 et 11 ; cliché B : 3)
 - Divers artefacts ou débris visualisables par la technique (cliché A : 13)

[Figure 28] : Caractéristiques des vrais et « faux » granules denses par technique whole-mount⁷⁵



Dénombrement des granules denses plaquettaires :

L'analyse quantitative des granules denses en MET par technique « whole-mount » nécessite une certaine expérience de la part de l'observateur, et reste relativement chronophage. L'observation de 50 à 100 plaquettes est la stratégie la plus répandue et semble adaptée à l'obtention d'une moyenne représentative du nombre de granules denses par plaquette. Cependant, la littérature montre que ce nombre de plaquettes observées varie d'une équipe l'autre, allant de 20 selon *Asher et al.*⁷⁶, à 200 selon *Chen et al.*⁷⁵.

Il est important de noter que, comme le montre le tableau 6, il existe une grande disparité des données de la littérature concernant les valeurs de référence relatives au nombre de granules denses par plaquette. Elles sont en effet très variables entre les centres⁹, qui tentent d'établir leurs propres valeurs de référence, malgré l'absence de consensus actuel.

[Tableau 6] : Intervalles de référence du nombre de granules denses par plaquette chez des sujets sains selon plusieurs études récentes

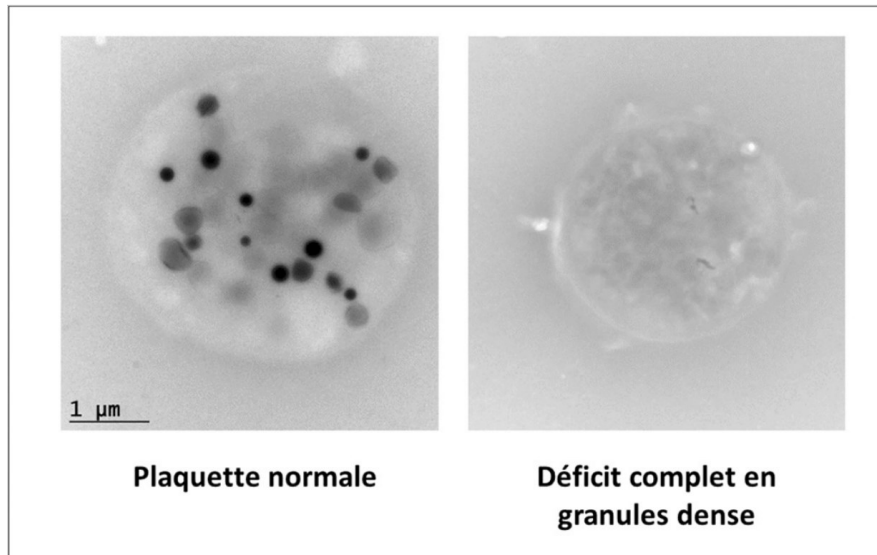
GD / plaquette	Nombre de sujets	Age des sujets	Références (études)
> 3,68	NC	NC	<i>Gunning et al. 2000</i> ⁷⁷
4,53 – 4,75	49	« adultes »	<i>Gunning et al. 2020</i> ⁷⁴
1,2 – 4	113 (65 H + 48 F)	18 – 70 ans	<i>Chen et al. 2018</i> ⁷⁵
4,9 – 8,2	60 H	15 – 64 ans	<i>Brunet et al. 2018</i> ⁴⁷
4,9 – 8,8	66 F	15 – 64 ans	<i>Brunet et al. 2018</i> ⁴⁷
4,14 – 7,74	54	NC	<i>Dupuis et al. 2020</i> ⁹
4.14 – 7.74	54	18 – 70 ans	<i>Pennamen et al. 2020</i> ³³
1,95 – 4,37	40 (19 H + 21 F)	2 mois – 21 ans	<i>Sorokin et al. 2016</i> ⁷⁸
> 3	300	6 semaines – 21 ans	<i>Asher et al. 2020</i> ⁷⁶

GD : granules denses ; NC : non connu ; H : homme ; F : femme

En pathologie, le nombre de granules denses observés dans une plaquette varie considérablement, de l'absence totale dans le syndrome d'Hermansky-Pudlak, à plus de 150 dans les macro-thrombocytes d'une plaquette grise par exemple⁹. Dans leur étude de 2018, *Brunet et al.* confirment une quantité plus faible de granules denses par plaquette (moins de 4) chez des sujets atteints de maladie du pool vide delta-plaquettaire⁴⁷. La figure 29 est un exemple de clichés obtenus par observation de plaquettes entières en microscopie électronique en transmission par la technique « whole-mount », obtenus chez un sujet sain (à

gauche) et chez un patient atteint d'un déficit quantitatif complet en granules denses (à droite)²³.

[Figure 29] : Whole-mount plaquettaire d'un sujet sain et atteint de déficit en granules denses²³



De façon intéressante, une étude de 2020 menée par *Gunning et al.*⁷⁴ a également mis en avant l'intérêt potentiel de déterminer le volume total des granules denses par plaquette, suggérant l'existence d'une nouvelle sous-catégorie de déficits nommée « *microgranular storage pool deficiency* ». En effet, cette étude a montré que près de 30 % des patients avec des manifestations hémorragiques et un nombre normal de granules denses, avaient en réalité des granules plus petits, conduisant à un volume granulaire total réduit, et une véritable thrombopathie.

b. Analyse ultrastructurale plaquettaire par technique classique

L'analyse ultrastructurale en microscopie électronique en transmission se fait le plus souvent grâce à la préparation « classique » des échantillons. Les plaquettes, obtenues en général à partir de plasma riche en plaquettes, doivent être préparées selon des étapes successives bien établies. Après la fixation chimique, puis la déshydratation, l'échantillon est inclus en résine afin d'être découpé en coupes ultrafines d'épaisseur inférieure à 100 nm, qui

seront déposées sur des grilles en cuivre ou en nickel, avant de subir une étape de contraste grâce à des métaux lourds⁶².

- La **fixation** « traditionnelle » de l'échantillon se caractérise par une double-fixation chimique utilisant des fixateurs aqueux, permettant à la fois une excellente conservation morphologique des structures biologiques ainsi qu'une conservation relative des épitopes, permettant de réaliser un immunomarquage complémentaire. Elle utilise dans un premier temps une association d'aldéhydes qui vont entraîner la formation de liaisons intermoléculaires de « *cross-linking* » entre les protéines, par un phénomène de réticulation. Dans la littérature, on retrouve l'utilisation fréquente du glutaraldéhyde⁶². Une seconde fixation est réalisée via le tétroxyde d'osmium, qui réagit fortement avec les lipides membranaires ainsi qu'avec les protéines. L'osmium est un métal lourd, dense aux électrons, qui va réaliser un premier contraste en se liant aux membranes⁶². La fixation des plaquettes doit être réalisée à 37°C, permettant aux cellules de conserver leur forme ellipsoïdale, adaptée à l'analyse ultrastructurale en microscopie électronique en transmission⁶⁵.
- La **déshydratation** des échantillons, par contact avec des solvants de concentrations croissantes, permet l'extraction progressive de l'eau contenue dans les cellules. Ces réactifs, la plupart du temps de l'acétone ou de l'éthanol, servent aussi de solvants pour la résine d'enrobage⁶².
- L'**enrobage** est le processus d'inclusion de l'échantillon dans une résine qui polymérise en un plastique dur, formant un bloc adapté à la coupe mince. Il existe une variété de résines d'enrobage⁶², les plus couramment utilisées étant les résines époxy, polymérisées à une température de 60-70°C et qui sont parmi les plus faciles à découper mais qui ne sont pas adaptées à l'immunomarquage.

D'autres méthodes de fixation, utilisant la congélation, sont particulièrement adaptées à la réalisation d'immunomarquages en s'affranchissant de l'altération des épitopes liée à la fixation chimique des échantillons. Au cours de ces procédés de cryofixation, l'échantillon est

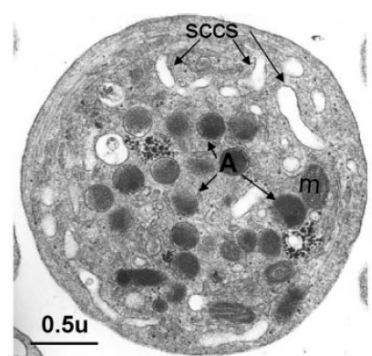
directement observé au microscope, maintenu à basse température en azote liquide⁶². Un enrobage par des résines adaptées est possible, à basse température et conservant l'antigénicité pour immunomarquage éventuel.

- La **découpe** du bloc de résine grâce à un ultramicrotome permet d'obtenir des sections ultra-fines d'échantillon (environ 60 à 80 nm), qui sont déposées sur des « grilles à mesh » (figure 26A), recouvertes d'un plastique mince (le plus souvent du formvar) qui peut être renforcé avec un revêtement en carbone.
- La **coloration contrastante** est la dernière étape de préparation. Elle utilise des composés de métaux lourds, le plus souvent de l'acétate d'uranyle suivi de citrate de plomb, interagissant fortement avec les électrons et permettant d'améliorer le contraste des échantillons biologiques ne comportant que des atomes légers (carbone, azote, oxygène, phosphore...) ⁶².

L'analyse ultrastructurale des plaquettes ainsi préparées pourra être réalisée en insérant les grilles à mesh dans la colonne sous vide du microscope électronique en transmission, dans l'axe du faisceau d'électrons. Bien qu'historiquement les clichés étaient développés sur film photographique, les microscopes électroniques modernes disposent d'interfaces informatiques étendues, et d'appareils photo numériques qui permettent de réaliser l'acquisition d'images, de localiser et d'enregistrer des zones et images d'intérêt.

La figure 30 montre l'ultrastructure d'une plaquette normale observée en MET par technique classique⁶⁵. La forme sphérique est maintenue par un anneau circonférentiel de microtubules et la membrane plasmique s'invagine pour former le système canaliculaire ouvert connecté sur l'extérieur. Les granules alpha sont bien visualisés par cette technique en coupes ultra-fines, notamment grâce à leur nombre important (50 à 80 par plaquette), permettant ainsi d'avoir suffisamment d'éléments sur une section cellulaire. Ils présentent une morphologie caractéristique sur cette image : formes ovales de taille moyenne dispersées dans le cytoplasme et moyennement denses. On peut aussi observer d'autres organites tels que les mitochondries, plus clairsemées dans le cytoplasme.

[Figure 30] : Ultrastructure plaquettaire par microscopie électronique en transmission⁶⁵



SCCS = système canaliculaire ouvert

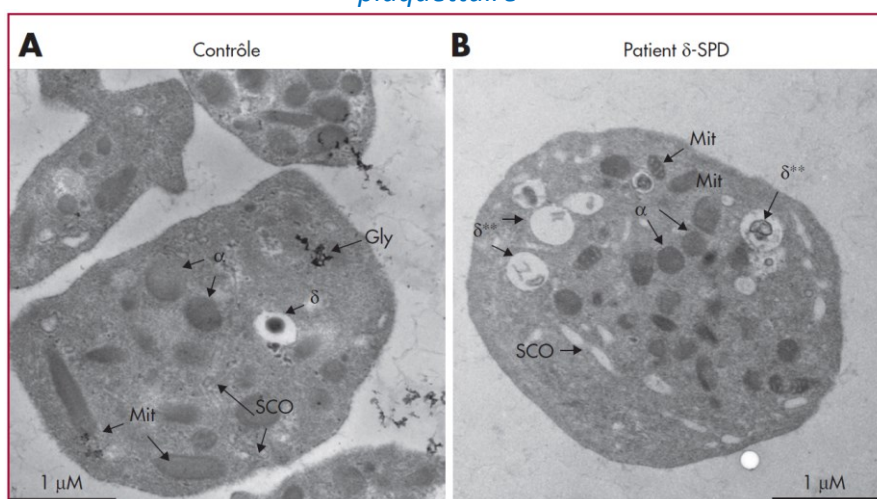
A = granules alpha

m = mitochondries

La figure 31 ci-après, illustre l'analyse d'une coupe de plaquette en MET par technique « classique » au grossissement x 20.000. On peut visualiser un granule dense au sein de cette plaquette qui a été préparée par fixation grâce au glutaraldéhyde et inclusion en résine époxy.

- L'image A, sur la gauche, représente la coupe de plaquettes d'un sujet contrôle : on peut observer l'ultrastructure plaquettaire avec les différents organites, notamment un granule delta de petite taille, très dense et avec dans ce cas une forme caractéristique appelée « œil de taureau ».
- L'image B, sur la droite, représente la coupe d'une plaquette d'un patient atteint de maladie du pool vide delta-plaquettaire : on observe une absence totale de granules denses normaux avec la présence de plusieurs granules anormaux de grande taille et de très faible densité.

[Figure 31] : Ultrastructure plaquettaire d'un sujet sain et atteint de maladie du pool vide delta-plaquettaire¹⁹



δ-SPD = maladie du pool vide delta-plaquettaire ; δ = granule dense normal ; δ** = granules denses anormaux ; Mit = mitochondries ; SCO = système canaliculaire ouvert ; Gly = glycogène ; α = granules alpha

L'utilisation de techniques cytochimiques complémentaires peut être utile dans certaines circonstances, notamment lorsqu'une évaluation des granules denses est nécessaire en cas de suspicion d'un déficit. Plusieurs techniques, nécessitant des préparations plus longues, sont disponibles pour renforcer la densité naturelle des granules denses aux électrons. Par exemple, la technique cytochimique de *Richards et Da Prada*, publiée en 1977⁷³, favorise la visualisation des nucléotides au sein des plaquettes, grâce à une réaction uraffine, caractérisée par l'interaction entre les ions uranyles UO_2^{++} et les groupements phosphates des nucléotides. Elle présente à la fois l'avantage de colorer le centre très dense du granule mais aussi de densifier sa membrane limitante, permettant de faciliter l'identification et le dénombrement des granules denses. Ils ont ainsi montré que les plaquettes de patients atteints de déficit en granules denses, tel que le syndrome d'Hermansky-Pudlak, avaient une réaction uraffine négative, du fait de l'appauvrissement du pool non métabolique des nucléotides, normalement présent dans les granules denses et représentant 2/3 des nucléotides plaquettaires. La technique cytochimique de *White* publiée en 1969⁶⁷, repose, quant à elle, sur la capacité de la sérotonine à être naturellement dense aux électrons, grâce à une réaction entre la sérotonine et le métal contenu dans les agents oxydants utilisés pour fixer les cellules à étudier. C'est ainsi qu'il développe la technique de préparation encore utilisée aujourd'hui, comprenant une « double-fixation » ayant recours aux aldéhydes puis au tétr oxyde d'osmium.

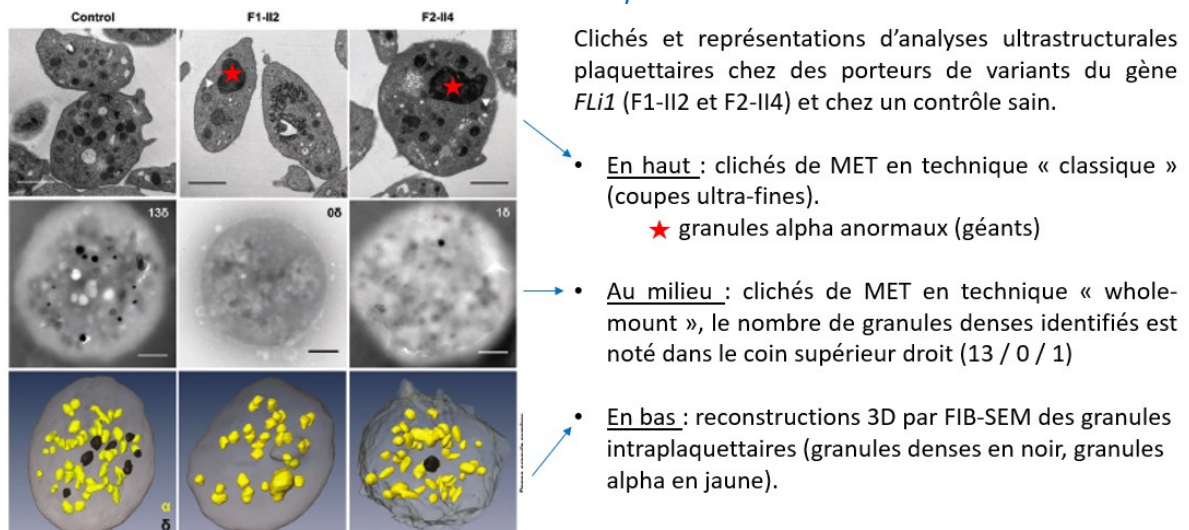
L'inconvénient majeur d'avoir recours à la microscopie électronique en transmission par technique « classique », qui utilise des coupes de l'ordre de 70 nm d'épaisseur, est la faible probabilité de pouvoir observer des organites peu représentés, tels que les granules denses (3 à 8 par plaquette) qui ne seront pas forcément dans le plan de coupe. Au total, la technique « classique » de préparation et d'analyse de plaquettes en microscopie électronique en transmission, permet ainsi une analyse semi-quantitative des granules denses, mais surtout d'évaluer la morphologie globale des plaquettes et d'analyser les granules alpha, dont l'exploration est indispensable et sera détaillée ultérieurement.

3) Microscopie électronique à balayage : FIB-SEM

La microscopie électronique à balayage à faisceau d'ions focalisé (FIB-SEM) est une approche d'imagerie qui permet la reconstruction en 3 dimensions des granules intraplaquettaires, à partir de coupes en série de plaquettes entières fixées. L'échantillon est progressivement abrasé par le faisceau d'ions, sur plusieurs couches d'épaisseur nanométrique, tandis que les images sont acquises simultanément et combinées pour permettre la reconstruction 3D des organites. Cette technique rapide, et en partie automatisée, permet ainsi d'apprécier le nombre et la forme des granules plaquettaires. La FIB-SEM a été utilisée pour dénombrer les granules denses plaquettaires dans l'étude d'Eckly publiée en 2016⁷⁹, où la reconstitution de 49 plaquettes a permis de déterminer une norme de 8 +/- 4,2 granules denses par plaquette, ce qui reste globalement en accord avec les résultats des études utilisant la technique de MET (tableau 6).

La figure 32 est tirée de l'étude de Saultier *et al.* de 2017⁸⁰, qui a permis de caractériser de nouveaux variants du gène *Fli1*. La ligne du bas permet de voir des exemples de reconstitutions plaquettaires par FIB-SEM. Chez le sujet sain, les granules alpha sont présents en grand nombre, tandis qu'on peut compter 7 granules denses. Les variants illustrés sur cette figure montrent des images caractéristiques avec quasi absence de granules denses et présence de quelques granules alpha géants, dans un contexte de macrothrombocytopénie.

[Figure 32] : Analyse ultrastructurale plaquettaire selon trois méthodes de microscopie électronique⁸⁰

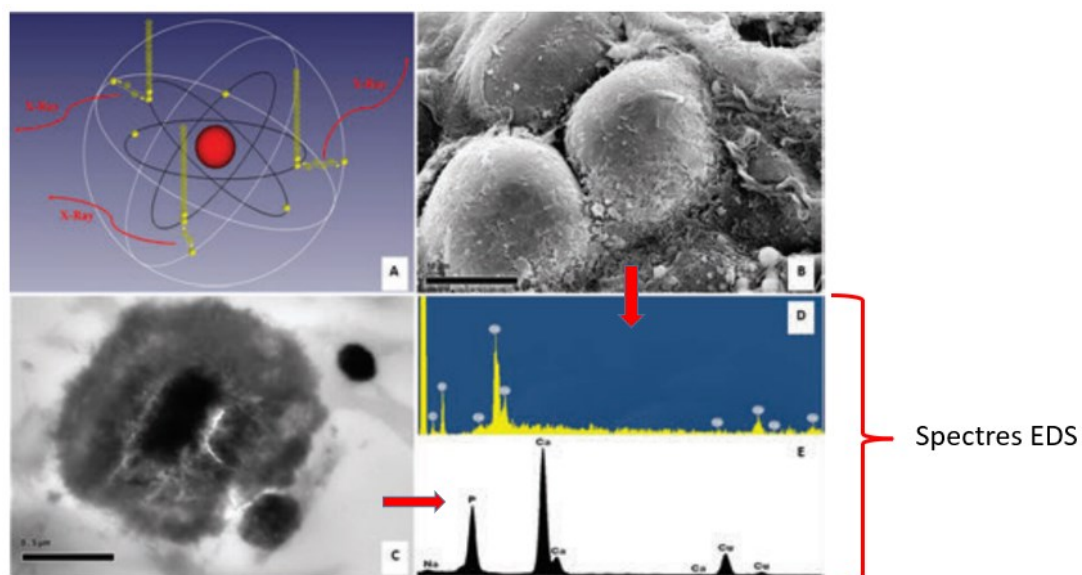


Cette technique de microscopie électronique reste à l'heure actuelle peu employée du fait de la nécessité de disposer de compétences très spécifiques pour utiliser ce matériel très spécialisé et onéreux. Le recours à la FIB-SEM a lieu majoritairement dans le domaine de la recherche, et peu de laboratoire l'utilisent dans un but de diagnostic hospitalier.

4) Analyse atomique par EDS

La microanalyse par rayons X à dispersion d'énergie (EDX ou EDS) est une technique d'analyse élémentaire (atomique) associée à la microscopie électronique, permettant d'obtenir la composition chimique d'un échantillon sous forme de spectre. Elle est basée sur l'émission par l'échantillon de rayons X caractéristiques de chaque élément⁶³. Elle peut être couplée à l'analyse d'un échantillon sur microscope électronique en transmission ou à balayage, comme l'illustre la figure 33, tirée de l'article de *Scimeca et al*⁶³.

[Figure 33] : Exemple de microanalyses EDS couplées à la microscopie électronique⁶³



- **Figure A** : les rayons X caractéristiques de chaque élément proviennent des transitions d'électrons des atomes de l'échantillon interagissant avec le faisceau d'électrons du microscope électronique.
- **Figure B** : cliché obtenu par microscopie électronique à balayage (MEB), montrant des cellules adipocytaires mammaires.
- **Figure C** : cliché obtenu par microscopie électronique en transmission (MET), montrant des « corps de psammoma » (collections de calcium) au sein d'une plaque carotidienne.
- **Figure D** : **Spectre EDS** obtenu par couplage au MEB, montrant la détection de l'osmium utilisé pour la fixation des échantillons.
- **Figure E** : **Spectre EDS** obtenu par couplage au MET, montrant que le corps de psammoma est constitué d'hydroxyapatite (forme minérale naturelle d'apatite de calcium).

Concernant son application en biologie plaquettaire, l'EDS permet de déterminer la composition ionique, notamment en cations divalents Ca^{2+} et Mg^{2+} , des granules denses plaquettaires. Elle permettrait d'explorer la composition chimique d'un élément de morphologie douteuse en whole-mount, et de confirmer qu'il s'agit d'un granule dense par la mise en évidence d'une concentration élevée de calcium. Cette technique a notamment permis de déterminer que les chaînettes ont une composition en calcium et phosphore proche de celle des granules delta, bien que le rapport phosphore/calcium soit plus faible⁹. Elle pourrait également permettre de quantifier le pool de calcium de la plaquette, en rapportant le volume des organites riches en calcium au volume de la cellule, une donnée quantitative et objective, là où l'identification des granules denses en whole-mount semble comporter une part de subjectivité. De plus, au-delà du simple comptage des granules denses, une analyse morphométrique mesurant leur diamètre et permettant le calcul du volume granulaire total pourrait aussi présenter un intérêt clinique.

Cette approche est cependant plus largement utilisée dans le domaine de la recherche, et peu de laboratoires de microscopie électronique l'utilisent actuellement dans un but diagnostique. Cet outil complémentaire est chronophage et plus complexe que l'analyse d'un whole-mount, et ne pourrait donc pas être utilisé systématiquement en analyse de routine. Cependant, les données issues de l'analyse chimique d'éléments atypiques en whole-mount sont à même de modifier les critères de dénombrement. En effet, certains éléments auparavant considérés comme de « faux » granules denses pourraient intégrer le comptage final, du fait de leurs caractéristiques chimiques évocatrices de « vrais » granules denses plaquettaires.

V. Explorations complémentaires : place de la génétique et évaluation des granules alpha

Des **analyses génétiques** doivent être systématiquement envisagées en cas de forte suspicion de déficit en granules denses d'origine constitutionnelle¹⁹.

Elles permettent souvent de poser un diagnostic définitif, et même de pallier certaines errances diagnostiques. Cependant, il est important de rappeler qu'à ce jour, les formes de déficits en granules denses plaquettaires sont dans la majorité des cas isolées (non-syndromiques) et restent sans diagnostic génétique. Ces analyses peuvent également contribuer à une prise en charge thérapeutique orientée et adaptée, et s'intégrer dans le cadre du conseil génétique²³.

Le séquençage « classique », qui consiste à rechercher des mutations sur un gène donné, ne s'envisage désormais qu'en cas de phénotype clinico-biologique très évocateur de quelques gènes donnés, tels que ceux impliqués dans les formes syndromiques de déficits en granules denses (notamment les gènes des familles *HPS*, impliqués dans le processus vésiculaire intracellulaire et *LYST*, qui régule l'organisation des organelles intracellulaires ; se référer au chapitre « déficits syndromiques » de la classification clinique précédemment décrite). Des mutations des gènes codants les facteurs de transcription RUNX1, GATA1 ou Fli1, impliqués dans certaines formes associées à une thrombopénie, pourraient aussi être recherchées.

Les techniques de « séquençage haut débit », de l'exome ou du génome entier, se substituent de plus en plus aux techniques de séquençage classique, de par leur gain de temps et leur capacité à séquencer un panel conséquent de gènes cibles pour une série de patients. De plus, elles jouent un rôle majeur dans la découverte régulière de nouvelles thrombopathies, en offrant la possibilité d'explorer et d'identifier de nouveaux gènes potentiellement impliqués dans les déficits en granules denses plaquettaires, et faciliteront très certainement le diagnostic de maladie du pool vide delta-plaquettaire dans les années à venir.

Certains déficits en granules denses s'intègrent dans une forme combinée à des anomalies des granules alpha. Lorsqu'un déficit en granules denses est mis en évidence, il est donc recommandé d'effectuer systématiquement une **étude des granules alpha**¹⁹.

- L'observation du frottis sanguin au microscope optique permet une analyse grossière des granules alpha. Une absence totale de ces derniers donnera un aspect pâle des plaquettes, visualisées comme vides et « grises ».
- L'évaluation de l'expression membranaire de P-sélectine (CD62-P) par cytométrie en flux après activation plaquettaire est la méthodologie la plus couramment employée pour étudier plus spécifiquement les granules alpha. Cette approche a l'avantage d'être rapide, spécifique et peu onéreuse¹⁹.

D'autres techniques complémentaires peuvent être utilisées, mais sont moins courantes.

- L'immunofluorescence sur lame en microscopie confocale peut révéler une absence ou une diminution du nombre de granules alpha, par l'utilisation d'anticorps dirigés contre le fibrinogène ou le facteur Willebrand contenus dans ces derniers⁸¹.
- Le dosage de protéines spécifiques contenues dans les granules alpha peut être envisagé afin de mieux caractériser les anomalies associées à un trouble de la sécrétion de ces granules. Ainsi, la mesure de la thromboglobuline ou du facteur plaquettaire 4 (FP4) en ELISA ou western blot sur lysat plaquettaire a été proposée afin d'évaluer le contenu endogène des granules alpha⁴⁴. Cependant, ces techniques souffrent d'un manque de standardisation et sont principalement utilisées en recherche. Une alternative simple et robuste est le dosage en ELISA du PAI-1 (*Plasminogen Activator Inhibitor*) circulant, dont une baisse significative semble être un bon reflet d'un déficit en granules alpha, puisque 95 % du PAI-1 est d'origine plaquettaire, stocké dans ces granules⁸⁰.
- La technologie d'imagerie haute résolution en microscopie électronique à balayage (*focused ion beam-scanning electron microscopy* ou FIB-SEM) décrite dans le chapitre précédent, permet une reconstruction 3D des plaquettes et de leur structure, et ainsi d'analyser les granules alpha. Cette technique de recherche a récemment permis de caractériser de nouveaux variants du gène *FLI1*, associés à une macrothrombopénie, un déficit en granules denses et la présence de granules alpha géants⁸⁰.

Partie 4 : Conclusion et discussion

La maladie du pool vide delta-plaquettaire est une entité clinico-biologique qui correspond à un déficit quantitatif et/ou qualitatif des granules denses intraplaquettaires.

La prévalence de la maladie dans sa forme isolée (non-syndromique) est probablement sous-estimée, principalement parce que cette pathologie est peu connue, a une expression clinique peu bruyante, et que son diagnostic biologique est complexe et non standardisé, nécessitant le recours à des analyses ultraspecialisées, coûteuses et peu accessibles.

Si cette maladie perturbe peu la vie quotidienne des patients, ces derniers peuvent cependant déclarer des hémorragies sévères, surtout en situation traumatique ou chirurgicale. C'est pourquoi, cette thrombopathie doit être correctement diagnostiquée afin d'assurer une prise en charge adaptée des patients, en particulier lorsqu'il est nécessaire de réaliser des gestes à risque hémorragique.

Sur le plan thérapeutique, la transfusion plaquettaire prophylactique n'est pas recommandée car la balance bénéfice/risque est défavorable en raison du risque d'immunisation associé à une perte d'efficacité des transfusions ultérieures. Celles-ci doivent donc être réservées aux événements hémorragiques massifs et aux saignements qui ne sont pas contrôlés par un traitement adjuvant classique ; le facteur VII recombinant humain pouvant être envisagé dans les cas les plus complexes. Un traitement prophylactique et post-opératoire par acide tranexamique ou desmopressine est à privilégier tant que le risque hémorragique est limité. Enfin, le risque hémorragique peut également être pallié chez ces patients en évitant, tant que possible, l'utilisation de tout médicament ayant un impact sur la fonctionnalité des plaquettes sanguines (antidépresseur type ISRS, agents antiagrégants).

Sur le plan diagnostique, les déficits en granules denses peuvent être associés à une réduction de l'agrégation plaquettaire, surtout en réponse aux faibles concentrations d'agonistes mais le profil d'agrégation peut aussi être normal ou associé à des anomalies non spécifiques. C'est pourquoi, le diagnostic de ces thrombopathies nécessite de recourir à une

combinaison d'examens biologiques souvent très spécialisés afin de mettre en évidence la diminution du nombre et/ou un contenu anormal des granules denses. En l'état actuel des connaissances, il est recommandé, dans la mesure du possible, de combiner un test permettant d'évaluer la sécrétion de ces granules (libération d'ATP, expression de CD63 le plus souvent) et un autre permettant d'évaluer le contenu granulaire (dosage de la sérotonine, quantification des nucléotides), ainsi que de réaliser un dénombrement des granules denses par microscopie électronique en transmission (technique whole-mount).

Le recours à la microscopie électronique est cependant encore peu fréquent ; seules quelques structures ayant l'équipement et l'expertise nécessaires, notamment au sein de Centres Hospitaliers Universitaires (CHU). Un exercice de contrôle de la reconnaissance des granules denses, à type d'Evaluation Externe de la Qualité (EEQ), est proposé deux fois par an aux laboratoires qui pratiquent le whole-mount plaquettaire, désireux de vérifier leurs pratiques. Il s'agit de dossiers « NASCOLA-ECAT » réalisés par le *Dr Dong Chen*, de la Fondation pour l'éducation et la recherche médicale de la clinique Mayo à Rochester⁹, qui peuvent être utiles comme outils de comparaison aux pairs, dans un souci d'harmonisation des pratiques.

En conclusion, comme l'a souligné *Dupuis* en 2020⁹, l'harmonisation des méthodes de diagnostic et le partage d'outils coûteux et sophistiqués tels que les microscopes électroniques, pourraient constituer une stratégie précieuse et payante pour améliorer la reconnaissance des déficits en granules denses plaquettaires. Une meilleure identification des patients atteints permettrait probablement des avancées considérables dans la recherche des gènes responsables des formes non-syndromiques de la maladie, tout en apportant une prise en charge adaptée de ces patients.

Avec le soutien du Centre de Référence des Pathologies Plaquettaires (CRPP), une étude est actuellement menée en France afin d'évaluer la prévalence globale des déficits granulaires et leur répartition par type (anomalie de nombre, de contenu ou de sécrétion) chez les patients présentant une symptomatologie hémorragique sans anomalie de la coagulation ou déficit en facteur Willebrand. Il s'agit de l'étude AGRAD pour « Diagnostic des Anomalies des GRANules Denses plaquettaires dans les syndromes hémorragiques inexpliqués », à laquelle 9 centres participent, dont le CHU de Tours (grâce aux laboratoires

d'Hématologie-Hémostase du site Trousseau et de Biologie cellulaire-Microscopie électronique du site Bretonneau)³¹.

En ce qui concerne mon travail, l'application pratique ultérieure de cette thèse bibliographique consistera à optimiser la technique du whole-mount plaquettaire au laboratoire de microscopie électronique du CHU de Tours.

Après une période de formation au dénombrement des granules denses en MET « whole-mount », mon premier objectif sera de déterminer un intervalle de référence du nombre « normal » de granules denses plaquettaires, grâce à l'analyse rétrospective des échantillons reçus ces dernières années au laboratoire de microscopie électronique, combinée à une analyse prospective des échantillons de l'étude AGRAD³¹.

Un objectif secondaire sera l'évaluation de l'apport potentiel de techniques complémentaires de microscopie électronique pour le diagnostic de déficits en granules denses plaquettaires, notamment l'analyse chimique par EDS des granules denses ou bien encore une analyse morphométrique plus poussée en déterminant le volume total des granules denses par plaquette.

Enfin, je m'intéresserai à l'apport de la MET « whole-mount » pour le diagnostic des déficits en granules denses plaquettaires depuis sa mise en place au CHU de Tours en 2018, en analysant les données cliniques et biologiques des patients ayant bénéficié d'une exploration des fonctions plaquettaires, pour suspicion de thrombopathie durant cette période.

Bibliographie :

- (1) Machlus, K. R.; Italiano, J. E. The Incredible Journey: From Megakaryocyte Development to Platelet Formation. *J. Cell Biol.* **2013**, *201* (6), 785–796. <https://doi.org/10.1083/jcb.201304054>.
- (2) Balduini, C. L.; Noris, P. Platelet Count and Aging. *Haematologica* **2014**, *99* (6), 953–955. <https://doi.org/10.3324/haematol.2014.106260>.
- (3) Segal, J. B.; Moliterno, A. R. Platelet Counts Differ by Sex, Ethnicity, and Age in the United States. *Ann. Epidemiol.* **2006**, *16* (2), 123–130. <https://doi.org/10.1016/j.annepidem.2005.06.052>.
- (4) MHEMO, F. des maladies hémorragiques constitutionnelles. Les pathologies plaquettaires <https://mhemo.fr/les-pathologies/les-pathologies-plaquettaires/>.
- (5) Harker, L. A. The Kinetics of Platelet Production and Destruction in Man. *Clin. Haematol.* **1977**, *6* (3), 671–693.
- (6) Tijssen, M. R.; Ghevaert, C. Transcription Factors in Late Megakaryopoiesis and Related Platelet Disorders. *J. Thromb. Haemost. JTH* **2013**, *11* (4), 593–604. <https://doi.org/10.1111/jth.12131>.
- (7) Huizing, M.; Helip-Wooley, A.; Westbroek, W.; Gunay-Aygun, M.; Gahl, W. A. Disorders of Lysosome-Related Organelle Biogenesis: Clinical and Molecular Genetics. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* **2008**, *9* (1), 359–386. <https://doi.org/10.1146/annurev.genom.9.081307.164303>.
- (8) Ambrosio, A. L.; Di Pietro, S. M. Storage Pool Diseases Illuminate Platelet Dense Granule Biogenesis. *Platelets* **2017**, *28* (2), 138–146. <https://doi.org/10.1080/09537104.2016.1243789>.
- (9) Dupuis, A.; Bordet, J.-C.; Eckly, A.; Gachet, C. Platelet δ -Storage Pool Disease: An Update. *J. Clin. Med.* **2020**, *9* (8), 2508. <https://doi.org/10.3390/jcm9082508>.
- (10) Nurden, P.; Stritt, S.; Favier, R.; Nurden, A. T. Inherited Platelet Diseases with Normal Platelet Count: Phenotypes, Genotypes and Diagnostic Strategy. *Haematologica* **2021**, *106* (2), 337–350. <https://doi.org/10.3324/haematol.2020.248153>.

- (11) Nurden, A.; Nurden, P. Advances in Our Understanding of the Molecular Basis of Disorders of Platelet Function. *J. Thromb. Haemost. JTH* **2011**, *9 Suppl 1*, 76–91. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2011.04274.x>.
- (12) Zucker-Franklin, D. Megakaryocyte and Platelet Structure in Thrombocytopoiesis: The Effect of Cytokines. *Stem Cells Dayt. Ohio* **1996**, *14 Suppl 1*, 1–17. <https://doi.org/10.1002/stem.5530140702>.
- (13) Zapata, J. C.; Cox, D.; Salvato, M. S. The Role of Platelets in the Pathogenesis of Viral Hemorrhagic Fevers. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2014**, *8* (6), e2858. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002858>.
- (14) Rouaud, M. Le rôle des microdomaines dans l'activation plaquettaire. **2018**.
- (15) Cai, H. Diagnostic Des Pathologies Plaquettaires : Optimisation de l'exploration Des Granules Denses Plaquettaires. Theses, Université de Lorraine, 2015.
- (16) Yadav, S.; Storrie, B. The Cellular Basis of Platelet Secretion: Emerging Structure/Function Relationships. *Platelets* **2017**, *28* (2), 108–118. <https://doi.org/10.1080/09537104.2016.1257786>.
- (17) Masliah-Planchon, J.; Flaujac, C.; Tapon-Bretonnière, J.; Cramer-Bordé, E. M.; Darnige, L. Mise Au Point : La Maladie Du Pool Vide Plaquettaire. *Ann. Biol. Clin. (Paris)* **2008**, *66* (4), 365–369. <https://doi.org/10.1684/abc.2008.0245>.
- (18) Flaumenhaft, R. Platelet Secretion. In *Platelets*; Elsevier, 2013; pp 343–366. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-387837-3.00018-3>.
- (19) Fiore, M.; Garcia, C.; Sié, P.; Favier, R.; Lavenu-Bombled, C.; Hurtaud, M.-F.; Gachet, C.; Alessi, M.-C.; Dupuis, A. δ -storage pool disease: an underestimated cause of unexplained bleeding. *Hématologie* **2017**, *23* (4), 243–254. <https://doi.org/10.1684/hma.2017.1287>.
- (20) Mumford, A. D.; Frelinger III, A. L.; Gachet, C.; Gresele, P.; Noris, P.; Harrison, P.; Mezzano, D. A Review of Platelet Secretion Assays for the Diagnosis of Inherited Platelet Secretion Disorders. *Thromb. Haemost.* **2015**, *114* (07), 14–25. <https://doi.org/10.1160/TH14-11-0999>.
- (21) Verhoef, J. J. F.; Barendrecht, A. D.; Nickel, K. F.; Dijkxhoorn, K.; Kenne, E.; Labberton, L.; McCarty, O. J. T.; Schiffelers, R.; Heijnen, H. F.; Hendrickx, A. P.; Schellekens, H.; Fens, M. H.; de Maat, S.; Renné, T.; Maas, C. Polyphosphate Nanoparticles on the Platelet Surface

- Trigger Contact System Activation. *Blood* **2017**, 129 (12), 1707–1717. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-08-734988>.
- (22) Golebiewska, E. M.; Poole, A. W. Platelet Secretion: From Haemostasis to Wound Healing and Beyond. *Blood Rev.* **2015**, 29 (3), 153–162. <https://doi.org/10.1016/j.blre.2014.10.003>.
- (23) Vayne, C.; Gruel, Y. Diagnostic biologique des thrombopathies constitutionnelles : quels outils en 2021 ? *Rev. Francoph. Hémostase Thromb.* **2021**, 3 (1), 5–18.
- (24) Vayne, C.; Gruel, Y.; Pouplard, C. Hémostase : physiologie et principaux tests d'exploration. *EM-Consulte* **2020**. [https://doi.org/10.1016/S1634-6939\(20\)86402-3](https://doi.org/10.1016/S1634-6939(20)86402-3).
- (25) MHEMO, F. des maladies hémorragiques constitutionnelles. Physiologie de l'hémostase <https://mhemmo.fr/les-pathologies/physiologie-de-lhemostase/>.
- (26) Centre de Référence des Pathologies Plaquettaires - Les pathologies plaquettaires <https://maladies-plaquettes.org/definition-des-pathologies-plaquettaires/>.
- (27) Nieuwenhuis, H.; Akkerman, J.; Sixma, J. Patients with a Prolonged Bleeding Time and Normal Aggregation Tests May Have Storage Pool Deficiency: Studies on One Hundred Six Patients. *Blood* **1987**, 70 (3), 620–623. <https://doi.org/10.1182/blood.V70.3.620.620>.
- (28) Quiroga, T.; Goycoolea, M.; Panes, O.; Aranda, E.; Martinez, C.; Belmont, S.; Munoz, B.; Zuniga, P.; Pereira, J.; Mezzano, D. High Prevalence of Bleeders of Unknown Cause among Patients with Inherited Mucocutaneous Bleeding. A Prospective Study of 280 Patients and 299 Controls. *Haematologica* **2007**, 92 (3), 357–365. <https://doi.org/10.3324/haematol.10816>.
- (29) Hayward, C. P. M.; Pai, M.; Liu, Y.; Moffat, K. A.; Seecharan, J.; Webert, K. E.; Cook, R. J.; Heddle, N. M. Diagnostic Utility of Light Transmission Platelet Aggregometry: Results from a Prospective Study of Individuals Referred for Bleeding Disorder Assessments. *J. Thromb. Haemost. JTH* **2009**, 7 (4), 676–684. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2009.03273.x>.
- (30) Gresele, P.; Harrison, P.; Bury, L.; Falcinelli, E.; Gachet, C.; Hayward, C. P.; Kenny, D.; Mezzano, D.; Mumford, A. D.; Nugent, D.; Nurden, A. T.; Orsini, S.; Cattaneo, M. Diagnosis of Suspected Inherited Platelet Function Disorders: Results of a Worldwide Survey. *J. Thromb. Haemost.* **2014**, 12 (9), 1562–1569. <https://doi.org/10.1111/jth.12650>.

- (31) Diagnostic Des Anomalies Des GRAnules Denses Plaquettaires Dans Les Syndromes Hémorragiques Inexpliqués - AGRAD. *Protoc. AGRAD* **2019**. https://maladies-plaquettes.org/wp-content/uploads/2021/01/19DBL-Agrad_protocole-RNI_v1-0_20190510_NBD_SPR.pdf.
- (32) Huizing, M.; Malicdan, M. C. V.; Wang, J. A.; Pri-Chen, H.; Hess, R. A.; Fischer, R.; O'Brien, K. J.; Merideth, M. A.; Gahl, W. A.; Gochuico, B. R. Hermansky-Pudlak Syndrome: Mutation Update. *Hum. Mutat.* **2020**, *41* (3), 543–580. <https://doi.org/10.1002/humu.23968>.
- (33) Pennamen, P.; Le, L.; Tingaud-Sequeira, A.; Fiore, M.; Bauters, A.; Van Duong Béatrice, N.; Coste, V.; Bordet, J.-C.; Plaisant, C.; Diallo, M.; Michaud, V.; Trimouille, A.; Lacombe, D.; Lasseaux, E.; Delevoye, C.; Picard, F. M.; Delobel, B.; Marks, M. S.; Arveiler, B. BLOC1S5 Pathogenic Variants Cause a New Type of Hermansky-Pudlak Syndrome. *Genet. Med. Off. J. Am. Coll. Med. Genet.* **2020**, *22* (10), 1613–1622. <https://doi.org/10.1038/s41436-020-0867-5>.
- (34) Toriello, H. V. Thrombocytopenia Absent Radius Syndrome. In *GeneReviews®*; Adam, M. P., Ardinger, H. H., Pagon, R. A., Wallace, S. E., Bean, L. J., Mirzaa, G., Amemiya, A., Eds.; University of Washington, Seattle: Seattle (WA), 2009.
- (35) Nichols, K. E.; Crispino, J. D.; Poncz, M.; White, J. G.; Orkin, S. H.; Maris, J. M.; Weiss, M. J. Familial Dyserythropoietic Anaemia and Thrombocytopenia Due to an Inherited Mutation in GATA1. *Nat. Genet.* **2000**, *24* (3), 266–270. <https://doi.org/10.1038/73480>.
- (36) Jedlitschky, G.; Cattaneo, M.; Lubenow, L. E.; Roskopf, D.; Lecchi, A.; Artoni, A.; Motta, G.; Nießen, J.; Kroemer, H. K.; Greinacher, A. Role of MRP4 (ABCC4) in Platelet Adenine Nucleotide-Storage. *Am. J. Pathol.* **2010**, *176* (3), 1097–1103. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2010.090425>.
- (37) Jedlitschky, G.; Tirschmann, K.; Lubenow, L. E.; Nieuwenhuis, H. K.; Akkerman, J. W. N.; Greinacher, A.; Kroemer, H. K. The Nucleotide Transporter MRP4 (ABCC4) Is Highly Expressed in Human Platelets and Present in Dense Granules, Indicating a Role in Mediator Storage. *Blood* **2004**, *104* (12), 3603–3610. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-12-4330>.

- (38) White, J. G.; Keel, S.; Reyes, M.; Burris, S. M. Alpha-Delta Platelet Storage Pool Deficiency in Three Generations. *Platelets* **2007**, *18* (1), 1–10. <https://doi.org/10.1080/09537100600800172>.
- (39) Ferreira, C. R.; Chen, D.; Abraham, S. M.; Adams, D. R.; Simon, K. L.; Malicdan, M. C.; Markello, T. C.; Gunay-Aygun, M.; Gahl, W. A. Combined Alpha-Delta Platelet Storage Pool Deficiency Is Associated with Mutations in GFI1B. *Mol. Genet. Metab.* **2017**, *120* (3), 288–294. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2016.12.006>.
- (40) Gresele, P.; Orsini, S.; Noris, P.; Falcinelli, E.; Alessi, M. C.; Bury, L.; Borhany, M.; Santoro, C.; Glembotsky, A. C.; Cid, A. R.; Tosi, A.; De Candia, E.; Fontana, P.; Guglielmini, G.; Pecci, A.; BAT-VAL study investigators. Validation of the ISTH/SSC Bleeding Assessment Tool for Inherited Platelet Disorders: A Communication from the Platelet Physiology SSC. *J. Thromb. Haemost.* **2020**, *18* (3), 732–739. <https://doi.org/10.1111/jth.14683>.
- (41) Gresele, P.; the Subcommittee on Platelet Physiology. Diagnosis of Inherited Platelet Function Disorders: Guidance from the SSC of the ISTH. *J. Thromb. Haemost.* **2015**, *13* (2), 314–322. <https://doi.org/10.1111/jth.12792>.
- (42) MHEMO, F. des maladies hémorragiques constitutionnelles. La maladie de Willebrand <https://mhemo.fr/les-pathologies/la-maladie-de-willebrand/>.
- (43) Perez Botero, J.; Di Paola, J. Diagnostic Approach to the Patient with a Suspected Inherited Platelet Disorder: Who and How to Test. *J. Thromb. Haemost.* **2021**, *19* (9), 2127–2136. <https://doi.org/10.1111/jth.15484>.
- (44) Harrison, P.; Mackie, I.; Mumford, A.; Briggs, C.; Liesner, R.; Winter, M.; Machin, S.; British Committee for Standards in Haematology. Guidelines for the Laboratory Investigation of Heritable Disorders of Platelet Function: Guideline. *Br. J. Haematol.* **2011**, *155* (1), 30–44. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2011.08793.x>.
- (45) Hayward, C. P. M.; Harrison, P.; Cattaneo, M.; Ortel, T. L.; Rao, A. K. Platelet Function Analyzer (PFA)-100R Closure Time in the Evaluation of Platelet Disorders and Platelet Function. *J. Thromb. Haemost.* **2006**, *4* (2), 312–319. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2006.01771.x>.
- (46) Elalamy, I. PFA-100™ (Dade Behring): un analyseur global de la qualité fonctionnelle de l'hémostase primaire. *Rev. Francoph. Lab.* **2007**, *2007* (393), 51–61. [https://doi.org/10.1016/S1773-035X\(07\)80265-6](https://doi.org/10.1016/S1773-035X(07)80265-6).

- (47) Brunet, J. G.; Iyer, J. K.; Badin, M. S.; Graf, L.; Moffat, K. A.; Timleck, M.; Spitzer, E.; Hayward, C. P. M. Electron Microscopy Examination of Platelet Whole Mount Preparations to Quantitate Platelet Dense Granule Numbers: Implications for Diagnosing Suspected Platelet Function Disorders Due to Dense Granule Deficiency. *Int. J. Lab. Hematol.* **2018**, *40* (4), 400–407. <https://doi.org/10.1111/ijlh.12801>.
- (48) Cattaneo, M.; Cerletti, C.; Harrison, P.; Hayward, C. P. M.; Kenny, D.; Nugent, D.; Nurden, P.; Rao, A. K.; Schmaier, A. H.; Watson, S. P.; Lussana, F.; Pugliano, M. T.; Michelson, A. D. Recommendations for the Standardization of Light Transmission Aggregometry: A Consensus of the Working Party from the Platelet Physiology Subcommittee of SSC/ISTH. *J. Thromb. Haemost.* **2013**, *11* (6), 1183–1189. <https://doi.org/10.1111/jth.12231>.
- (49) Feinman, R. D.; Lubowsky, J.; Charo, I.; Zabinski, M. P. The Lumi-Aggregometer: A New Instrument for Simultaneous Measurement of Secretion and Aggregation by Platelets. *J. Lab. Clin. Med.* **1977**, *90* (1), 125–129.
- (50) Badin, M. S.; Graf, L.; Iyer, J. K.; Moffat, K. A.; Seecharan, J. L.; Hayward, C. P. M. Variability in Platelet Dense Granule Adenosine Triphosphate Release Findings amongst Patients Tested Multiple Times as Part of an Assessment for a Bleeding Disorder. *Int. J. Lab. Hematol.* **2016**, *38* (6), 648–657. <https://doi.org/10.1111/ijlh.12553>.
- (51) Pai, M.; Wang, G.; Moffat, K. A.; Liu, Y.; Seecharan, J.; Webert, K.; Heddle, N.; Hayward, C. Diagnostic Usefulness of a Lumi-Aggregometer Adenosine Triphosphate Release Assay for the Assessment of Platelet Function Disorders. *Am. J. Clin. Pathol.* **2011**, *136* (3), 350–358. <https://doi.org/10.1309/AJCP9IPR1TFLUAGM>.
- (52) Ge, S.; Wittenberg, N. J.; Haynes, C. L. Quantitative and Real-Time Detection of Secretion of Chemical Messengers from Individual Platelets. *Biochemistry* **2008**, *47* (27), 7020–7024. <https://doi.org/10.1021/bi800792m>.
- (53) Ge, S.; Woo, E.; White, J. G.; Haynes, C. L. Electrochemical Measurement of Endogenous Serotonin Release from Human Blood Platelets. *Anal. Chem.* **2011**, *83* (7), 2598–2604. <https://doi.org/10.1021/ac102929y>.
- (54) Chauvin, M. Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS) principle [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Fluorescence_Activated_Cell_Sorting_\(FACS\)_principle.tif](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Fluorescence_Activated_Cell_Sorting_(FACS)_principle.tif).

- (55) Dovlatova, N.; Lordkipanidzé, M.; Lowe, G. C.; Dawood, B.; May, J.; Heptinstall, S.; Watson, S. P.; Fox, S. C.; UK GAPP Study Group. Evaluation of a Whole Blood Remote Platelet Function Test for the Diagnosis of Mild Bleeding Disorders. *J. Thromb. Haemost. JTH* **2014**, *12* (5), 660–665. <https://doi.org/10.1111/jth.12555>.
- (56) Skaer, R. J.; Flemans, R. J.; McQuilkan, S. Mepacrine Stains the Dense Bodies of Human Platelets and Not Platelet Lysosomes. *Br. J. Haematol.* **1981**, *49* (3), 435–438. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.1981.tb07246.x>.
- (57) van Asten, I.; Blaauwgeers, M.; Granneman, L.; Heijnen, H. F. G.; Kruip, M. J. H. A.; Beckers, E. A. M.; Coppens, M.; Eikenboom, J.; Tamminga, R. Y. J.; Pasterkamp, G.; Huisman, A.; van Galen, K. P. M.; Korpelaar, S. J. A.; Schutgens, R. E. G.; Urbanus, R. T. Flow Cytometric Mepacrine Fluorescence Can Be Used for the Exclusion of Platelet Dense Granule Deficiency. *J. Thromb. Haemost. JTH* **2020**, *18* (3), 706–713. <https://doi.org/10.1111/jth.14698>.
- (58) Smith, S. A.; Morrissey, J. H. Sensitive Fluorescence Detection of Polyphosphate in Polyacrylamide Gels Using 4',6-Diamidino-2-Phenylindol. *Electrophoresis* **2007**, *28* (19), 3461–3465. <https://doi.org/10.1002/elps.200700041>.
- (59) Hernández-Ruiz, L.; Sáez-Benito, A.; Pujol-Moix, N.; Rodríguez-Martorell, J.; Ruiz, F. A. Platelet Inorganic Polyphosphate Decreases in Patients with Delta Storage Pool Disease. *J. Thromb. Haemost. JTH* **2009**, *7* (2), 361–363. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2008.03238.x>.
- (60) Fouassier, M.; Bourgerette, E.; Libert, F.; Pouplard, C.; Marques-Verdier, A. Determination of Serotonin Release from Platelets by HPLC and ELISA in the Diagnosis of Heparin-Induced Thrombocytopenia: Comparison with Reference Method by [C]-Serotonin Release Assay. *J. Thromb. Haemost. JTH* **2006**, *4* (5), 1136–1139. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2006.01932.x>.
- (61) Westmoreland, D.; Shaw, M.; Grimes, W.; Metcalf, D. J.; Burden, J. J.; Gomez, K.; Knight, A. E.; Cutler, D. F. Super-Resolution Microscopy as a Potential Approach to Diagnosis of Platelet Granule Disorders. *J. Thromb. Haemost.* **2016**, *14* (4), 839–849. <https://doi.org/10.1111/jth.13269>.
- (62) Winey, M.; Meehl, J. B.; O'Toole, E. T.; Giddings, T. H. Conventional Transmission Electron Microscopy. *Mol. Biol. Cell* **2014**, *25*, 5.

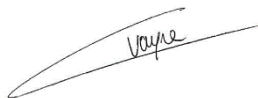
- (63) Scimeca, M.; Bischetti, S.; Lamsira, H. K.; Bonfiglio, R.; Bonanno, E. Energy Dispersive X-Ray (EDX) Microanalysis: A Powerful Tool in Biomedical Research and Diagnosis. *Eur. J. Histochem. EJH* **2018**, 62 (1), 2841. <https://doi.org/10.4081/ejh.2018.2841>.
- (64) MET (Microscope Electronique à Transmission) <https://sites.crdp-aquitaine.fr/stl/lexique/met-microscope-electronique-a-transmission/>.
- (65) Clauser, S.; Cramer-Bordé, E. Role of Platelet Electron Microscopy in the Diagnosis of Platelet Disorders. *Semin. Thromb. Hemost.* **2009**, 35 (2), 213–223. <https://doi.org/10.1055/s-0029-1220329>.
- (66) Bull, B. S. The Ultrastructure of Negatively Stained Platelets. *Blood* **1966**, 28 (6), 901–912. <https://doi.org/10.1182/blood.V28.6.901.901>.
- (67) White, J. G. The Dense Bodies of Human Platelets: Inherent Electron Opacity of the Serotonin Storage Particles. *Blood* **1969**, 33 (4), 598–606. <https://doi.org/10.1182/blood.V33.4.598.598>.
- (68) Martin, J. H.; Carson, F. L.; Race, G. J. Calcium-Containing Platelet Granules. *J. Cell Biol.* **1974**, 60 (3), 775–777. <https://doi.org/10.1083/jcb.60.3.775>.
- (69) Skaer, R. J.; Peters, P. D.; Emmines, J. P. The Localization of Calcium and Phosphorus in Human Platelets. *J. Cell Sci.* **1974**, 15 (3), 679–682.
- (70) Born, G. V.; Ingram, G. I.; Stacey, R. S. The Relationship between 5-Hydroxytryptamine and Adenosine Triphosphate in Blood Platelets. *Br. J. Pharmacol. Chemother.* **1958**, 13 (1), 62–64. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1958.tb00191.x>.
- (71) Fukami, M. H.; Dangelmaier, C. A.; Bauer, J. S.; Holmsen, H. Secretion, Subcellular Localization and Metabolic Status of Inorganic Pyrophosphate in Human Platelets. A Major Constituent of the Amine-Storing Granules. *Biochem. J.* **1980**, 192 (1), 99–105. <https://doi.org/10.1042/bj1920099>.
- (72) White, J. G. Electron Microscopy Methods for Studying Platelet Structure and Function. In *Platelets and Megakaryocytes*; Humana Press: New Jersey, 2004; Vol. 272, pp 047–064. <https://doi.org/10.1385/1-59259-782-3:047>.
- (73) Richards, J. G.; Da Prada, M. Uranaffin Reaction: A New Cytochemical Technique for the Localization of Adenine Nucleotides in Organelles Storing Biogenic Amines. *J. Histochem. Cytochem.* **1977**, 25 (12), 1322–1326. <https://doi.org/10.1177/25.12.144762>.

- (74) Gunning, W. T.; Raghavan, M.; Calomeni, E. P.; Turner, J. N.; Roysam, B.; Roysam, S.; Smith, M. R.; Kouides, P. A.; Lachant, N. A. A Morphometric Analysis of Platelet Dense Granules of Patients with Unexplained Bleeding: A New Entity of Delta-Microgranular Storage Pool Deficiency. *J. Clin. Med.* **2020**, *9* (6), 1734. <https://doi.org/10.3390/jcm9061734>.
- (75) Chen, D.; Uhl, C. B.; Bryant, S. C.; Krumwiede, M.; Barness, R. L.; Olson, M. C.; Gossman, S. C.; Erdogan Damgard, S.; Gamb, S. I.; Cummins, L. A.; Charlesworth, J. E.; Wood-Wentz, C. M.; Salisbury, J. L.; Plumhoff, E. A.; Van Cott, E. M.; He, R.; Warad, D. M.; Pruthi, R. K.; Heit, J. A.; Nichols, W. L.; White, J. G. Diagnostic Laboratory Standardization and Validation of Platelet Transmission Electron Microscopy. *Platelets* **2018**, *29* (6), 574–582. <https://doi.org/10.1080/09537104.2018.1476682>.
- (76) Asher, L.; Hata, J. Platelet Electron Microscopy: Utilizing LEAN Methodology to Optimize Laboratory Workflow. *Pediatr. Dev. Pathol. Off. J. Soc. Pediatr. Pathol. Paediatr. Pathol. Soc.* **2020**, *23* (5), 356–361. <https://doi.org/10.1177/1093526620915361>.
- (77) Gunning, W. T.; Calomeni, E. P. A Brief Review of Transmission Electron Microscopy and Applications in Pathology. *J. Histotechnol.* **2000**, *23* (3), 237–246. <https://doi.org/10.1179/his.2000.23.3.237>.
- (78) Sorokin, V.; Alkhoury, R.; Al-Rawabdeh, S.; Houston, R. H.; Thornton, D.; Kerlin, B.; O'Brien, S.; Baker, P.; Boesel, C.; Uddin, M.; Yin, H.; Kahwash, S. Reference Range of Platelet Delta Granules in the Pediatric Age Group: An Ultrastructural Study of Platelet Whole Mount Preparations from Healthy Volunteers. *Pediatr. Dev. Pathol. Off. J. Soc. Pediatr. Pathol. Paediatr. Pathol. Soc.* **2016**, *19* (6), 498–501. <https://doi.org/10.2350/15-11-1733-OA.1>.
- (79) Eckly, A.; Rinckel, J.-Y.; Proamer, F.; Ulas, N.; Joshi, S.; Whiteheart, S. W.; Gachet, C. Respective Contributions of Single and Compound Granule Fusion to Secretion by Activated Platelets. *Blood* **2016**, *128* (21), 2538–2549. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-03-705681>.
- (80) Saultier, P.; Vidal, L.; Canault, M.; Bernot, D.; Falaise, C.; Pouymayou, C.; Bordet, J.-C.; Saut, N.; Rostan, A.; Baccini, V.; Peiretti, F.; Favier, M.; Lucca, P.; Deleuze, J.-F.; Olasso, R.; Boland, A.; Morange, P. E.; Gachet, C.; Malergue, F.; Fauré, S.; Eckly, A.; Trégouët, D.-A.; Poggi, M.; Alessi, M.-C. Macrothrombocytopenia and Dense Granule Deficiency

Associated with FLI1 Variants: Ultrastructural and Pathogenic Features. *Haematologica* **2017**, *102* (6), 1006–1016. <https://doi.org/10.3324/haematol.2016.153577>.

- (81) Greinacher, A.; Pecci, A.; Kunishima, S.; Althaus, K.; Nurden, P.; Balduini, C. L.; Bakchoul, T. Diagnosis of Inherited Platelet Disorders on a Blood Smear: A Tool to Facilitate Worldwide Diagnosis of Platelet Disorders. *J. Thromb. Haemost. JTH* **2017**, *15* (7), 1511–1521. <https://doi.org/10.1111/jth.13729>.

Vu, les Directeurs de Thèse

A stylized handwritten signature in black ink, consisting of several loops and a long horizontal stroke.A handwritten signature in black ink, featuring a long horizontal stroke with the word "Vayre" written above it.

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

BONNEMAY Justine

114 pages - 6 tableaux - 33 figures

Résumé :

Les granules denses plaquettaires jouent un rôle clé au cours de l'hémostase primaire, en contribuant notamment à l'amplification de l'activation plaquettaire et à la stabilisation du thrombus. Les déficits constitutionnels en granules denses constituent un ensemble hétérogène de thrombopathies, regroupées sous le terme de « maladie du pool vide delta-plaquettaire », caractérisées par des anomalies quantitatives (nombre de granules) ou qualitatives (contenu) des granules denses. L'existence de formes isolées (hématologiques pures) et syndromiques de cette thrombopathie implique une certaine hétérogénéité en termes d'expression clinique. La maladie du pool vide plaquettaire représente actuellement 25 % des diagnostics de thrombopathie en France, mais la prévalence de sa forme isolée est probablement sous-estimée du fait d'un manque de connaissances des bases moléculaires de cette pathologie, des performances très variables des outils de dépistage actuellement disponibles, et d'un phénotype hémorragique variable, mais le plus souvent modéré, associé à cette pathologie. Les patients atteints de déficits en granules denses sont néanmoins exposés à un risque hémorragique potentiellement sévère en cas de traumatisme ou d'acte invasif, ce qui souligne la nécessité de mieux documenter ces anomalies pour garantir une prise en charge adaptée des patients. A l'heure actuelle, le diagnostic biologique des déficits en granules denses est basé sur des tests d'orientation, permettant de dépister l'existence d'un trouble fonctionnel plaquettaire, complétés par le dénombrement des granules denses en microscopie électronique et l'analyse de leur contenu biochimique. Les objectifs de ce travail sont de mieux comprendre la physiopathologie des déficits en granules denses plaquettaires, et de réaliser un état des lieux de la stratégie diagnostique actuelle, en discutant plus particulièrement la place de la microscopie électronique au sein de cette stratégie.

MOTS CLÉS :

Plaquettes, Granules denses, Maladie du pool vide delta-plaquettaire, Diagnostic biologique, Microscopie électronique.

Jury :

Président du jury :	Professeur Yves GRUEL
Directeurs de thèse :	Docteur Sébastien EYMIEUX Docteur Caroline VAYNE
Membres du jury :	Pr Philippe LANOTTE Pr Philippe ROINGEARD Dr Jean-Baptiste VALENTIN

Date de soutenance : 20/10/2021