



**HAL**  
open science

# Utilisation des paramètres plaquettaires de l'ADVIA® 2120 (Siemens) pour caractériser les thrombopénies constitutionnelles

Amélie Poinsard

► **To cite this version:**

Amélie Poinsard. Utilisation des paramètres plaquettaires de l'ADVIA® 2120 (Siemens) pour caractériser les thrombopénies constitutionnelles. Sciences pharmaceutiques. 2012. hal-01732510

**HAL Id: hal-01732510**

**<https://hal.univ-lorraine.fr/hal-01732510>**

Submitted on 14 Mar 2018

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : [ddoc-thesesexercice-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-thesesexercice-contact@univ-lorraine.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

**UNIVERSITE DE LORRAINE**

**2012**

---

**FACULTE DE PHARMACIE**

**MEMOIRE**  
**du DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES**  
**de BIOLOGIE MEDICALE**

Soutenu devant le Jury Interrégional

le 16 novembre 2012

Par **Amélie POINSARD**  
née le 04 janvier 1985

Conformément aux dispositions de l'arrêté du 4 octobre 1988 tient lieu de

**THESE**  
**pour le DIPLOME D'ETAT**  
**de DOCTEUR en PHARMACIE**

---

**Utilisation des paramètres plaquettaires de**  
**l'ADVIA<sup>®</sup> 2120 (Siemens) pour caractériser les**  
**thrombopénies constitutionnelles**

---

**Membres du Jury**

**Président :** Mme le Professeur B. FAIVRE PU, Faculté de Pharmacie de Nancy

**Juges :** Mme le Docteur V. LATGER-CANNARD (Directeur de thèse) PH, CHU de Nancy  
M. le Professeur P. FEUGIER PU-PH, Faculté de Médecine de Nancy  
M. le Professeur T. LECOMPTE PU-PH, Faculté de Médecine de Genève  
Mme le Docteur V. BACCINI MCU-PH, Assistance Publique-Hôpitaux de Marseille

**UNIVERSITÉ DE LORRAINE**  
**FACULTÉ DE PHARMACIE**  
**Année universitaire 2011-2012**

**DOYEN**

Francine PAULUS

**Vice-Doyen**

Francine KEDZIEREWICZ

**Directeur des Etudes**

Virginie PICHON

**Président du Conseil de la Pédagogie**

Bertrand RIHN

**Président de la Commission de la Recherche**

Christophe GANTZER

**Président de la Commission Prospective Facultaire**

Jean-Yves JOUZEAU

**Responsable de la Cellule de Formations Continue et Individuelle**

Béatrice FAIVRE

**Responsable ERASMUS :**

Francine KEDZIEREWICZ

**Responsable de la filière Officine :**

Francine PAULUS

**Responsables de la filière Industrie :**

Isabelle LARTAUD,  
Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

**Responsable du Collège d'Enseignement  
Pharmaceutique Hospitalier :**

Jean-Michel SIMON

**Responsable Pharma Plus E.N.S.I.C. :**

Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

**Responsable Pharma Plus E.N.S.A.I.A. :**

Bertrand RIHN

**DOYENS HONORAIRES**

Chantal FINANCE  
Claude VIGNERON

**PROFESSEURS EMERITES**

Jeffrey ATKINSON  
Gérard SIEST  
Claude VIGNERON

**PROFESSEURS HONORAIRES**

Roger BONALY  
Pierre DIXNEUF  
Marie-Madeleine GALTEAU  
Thérèse GIRARD  
Maurice HOFFMANN  
Michel JACQUE  
Lucien LALLOZ  
Pierre LECTARD  
Vincent LOPPINET  
Marcel MIRJOLET  
François MORTIER  
Maurice PIERFITTE  
Louis SCHWARTZBROD

**MAITRES DE CONFERENCES HONORAIRES**

Monique ALBERT  
Gérald CATAU  
Jean-Claude CHEVIN  
Jocelyne COLLOMB  
Bernard DANGIEN  
Marie-Claude FUZELLIER  
Françoise HINZE LIN  
Marie-Hélène LIVERTOUX  
Bernard MIGNOT  
Jean-Louis MONAL  
Dominique NOTTER  
Marie-France POCHON  
Anne ROVEL  
Maria WELLMAN-ROUSSEAU

**ASSISTANT HONORAIRE**

Marie-Catherine BERTHE  
Annie PAVIS

**PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS**

Danièle BENSOUSSAN-LEJZEROWICZ	82	<i>Thérapie cellulaire</i>
Chantal FINANCE	82	<i>Virologie, Immunologie</i>
Jean-Yves JOUZEAU	80	<i>Bioanalyse du médicament</i>
Jean-Louis MERLIN	82	<i>Biologie cellulaire</i>
Alain NICOLAS	80	<i>Chimie analytique et Bromatologie</i>
Jean-Michel SIMON	81	<i>Economie de la santé, Législation pharmaceutique</i>

**PROFESSEURS DES UNIVERSITES**

Jean-Claude BLOCK	87	<i>Santé publique</i>
Christine CAPDEVILLE-ATKINSON	86	<i>Pharmacologie</i>
Raphaël DUVAL	87	<i>Microbiologie clinique</i>
Béatrice FAIVRE	87	<i>Biologie cellulaire, Hématologie</i>
Pascale FRIANT-MICHEL	85	<i>Mathématiques, Physique</i>
Christophe GANTZER	87	<i>Microbiologie</i>
Max HENRY	87	<i>Botanique, Mycologie</i>
Pierre LABRUDE	86	<i>Physiologie, Orthopédie, Maintien à domicile</i>
Isabelle LARTAUD	86	<i>Pharmacologie</i>
Dominique LAURAIN-MATTAR	86	<i>Pharmacognosie</i>
Brigitte LEININGER-MULLER	87	<i>Biochimie</i>
Pierre LEROY	85	<i>Chimie physique</i>
Philippe MAINCENT	85	<i>Pharmacie galénique</i>
Alain MARSURA	32	<i>Chimie organique</i>
Patrick MENU	86	<i>Physiologie</i>
Jean-Bernard REGNOUF de VAINS	86	<i>Chimie thérapeutique</i>
Bertrand RIHN	87	<i>Biochimie, Biologie moléculaire</i>

**MAITRES DE CONFÉRENCES - PRATICIENS HOSPITALIERS**

Béatrice DEMORE	81	<i>Pharmacie clinique</i>
Julien PERRIN	82	<i>Hématologie biologique</i>
Marie SOCHA	81	<i>Pharmacie clinique, thérapeutique et biotechnique</i>
Nathalie THILLY	81	<i>Santé publique</i>

**MAITRES DE CONFÉRENCES**

Sandrine BANAS	87	<i>Parasitologie</i>
Mariette BEAUD	87	<i>Biologie cellulaire</i>
Emmanuelle BENOIT	86	<i>Communication et Santé</i>
Isabelle BERTRAND	87	<i>Microbiologie</i>
Michel BOISBRUN	86	<i>Chimie thérapeutique</i>
François BONNEAUX	86	<i>Chimie thérapeutique</i>
Ariane BOUDIER	85	<i>Chimie Physique</i>
Cédric BOURA	86	<i>Physiologie</i>
Igor CLAROT	85	<i>Chimie analytique</i>
Joël COULON	87	<i>Biochimie</i>
Sébastien DADE	85	<i>Bio-informatique</i>
Dominique DECOLIN	85	<i>Chimie analytique</i>
Roudayna DIAB	85	<i>Pharmacie galénique</i>
Natacha DREUMONT	87	<i>Biologie générale, Biochimie clinique</i>
Joël DUCOURNEAU	85	<i>Biophysique, Acoustique</i>

ENSEIGNANTS (suite)	Section CNU*	Discipline d'enseignement
Florence DUMARCAY	86	Chimie thérapeutique
François DUPUIS	86	Pharmacologie
Adil FAIZ	85	Biophysique, Acoustique
Luc FERRARI	86	Toxicologie
Caroline GAUCHER-DI STASIO	85/86	Chimie physique, Pharmacologie
Stéphane GIBAUD	86	Pharmacie clinique
Thierry HUMBERT	86	Chimie organique
Frédéric JORAND	87	Environnement et Santé
Olivier JOUBERT	86	Toxicologie
Francine KEDZIEREWICZ	85	Pharmacie galénique
Alexandrine LAMBERT	85	Informatique, Biostatistiques
Faten MERHI-SOUSSI	87	Hématologie
Christophe MERLIN	87	Microbiologie
Blandine MOREAU	86	Pharmacognosie
Maxime MOURER	86	Chimie organique
Coumba NDIAYE	86	Epidémiologie et Santé publique
Francine PAULUS	85	Informatique
Christine PERDICAKIS	86	Chimie organique
Caroline PERRIN-SARRADO	86	Pharmacologie
Virginie PICHON	85	Biophysique
Anne SAPIN-MINET	85	Pharmacie galénique
Marie-Paule SAUDER	87	Mycologie, Botanique
Gabriel TROCKLE	86	Pharmacologie
Mihayl VARBANOV	87	Immuno-Virologie
Marie-Noëlle VAULTIER	87	Mycologie, Botanique
Emilie VELOT	86	Physiologie-Physiopathologie humaines
Mohamed ZAIYOU	87	Biochimie et Biologie moléculaire
Colette ZINUTTI	85	Pharmacie galénique
PROFESSEUR ASSOCIE		
Anne MAHEUT-BOSSER	86	Sémiologie
PROFESSEUR AGREGÉ		
Christophe COCHAUD	11	Anglais

\*Disciplines du Conseil National des Universités

:

80 : Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences physico-chimiques et ingénierie appliquée à la santé

81 : Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences du médicament et des autres produits de santé

82 : Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences biologiques, fondamentales et cliniques

85 ; Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences physico-chimiques et ingénierie appliquée à la santé

86 : Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences du médicament et des autres produits de santé

87 : Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences biologiques, fondamentales et cliniques

32 : Personnel enseignant-chercheur de sciences en chimie organique, minérale, industrielle

11 : Professeur agrégé de lettres et sciences humaines en langues et littératures anglaises et anglo-saxonnes

## SERMENT DES APOTHICAIRES



**Je** jure, en présence des maîtres de la Faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

**D'** honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

**D'**exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

**De** ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

**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.



« LA FACULTE N'ENTEND DONNER AUCUNE APPROBATION, NI  
IMPROBATION AUX OPINIONS EMISES DANS LES THESES, CES  
OPINIONS DOIVENT ETRE CONSIDEREES COMME PROPRES A  
LEUR AUTEUR ».



# REMERCIEMENTS



A Madame le Professeur Béatrice FAIVRE,  
PH, faculté de Pharmacie de Nancy.

*Vous me faites l'honneur d'accepter la présidence de ce jury.*

*Veillez trouver ici l'expression de ma gratitude et de mon profond respect.*

A Madame le Docteur Véronique LATGER-CANNARD,  
PH, service d'hématologie biologique, CHU de Nancy.

*Je te remercie sincèrement pour la confiance que tu m'as accordée en me proposant ce travail, pour ton soutien et tout le temps que tu m'as consacré.  
Sois assurée de ma sincère reconnaissance.*

A Monsieur le Professeur Thomas LECOMPTE,  
PU-PH, service d'hématologie, Hôpitaux Universitaires de Genève.

*Vous m'avez accueillie dans votre service pendant mon internat de biologie médicale et  
m'avez fait partager vos connaissances et votre expérience.*

*Je vous remercie sincèrement pour la confiance que vous m'avez accordée.*

*Veillez trouver ici le témoignage de mon très grand respect.*

A Monsieur le Professeur Pierre FEUGIER,  
PU-PH, service d'hématologie, CHU de Nancy.

*Vous m'avez fait l'honneur d'accepter de juger ce travail.*

*Veillez trouver ici le témoignage de ma profonde reconnaissance.*

A Madame le Docteur Véronique BACCINI,  
MCU-PH, service d'hématologie biologique, Assistance Publique des Hôpitaux de Marseille.

*Je vous suis très reconnaissante du soutien et de l'intérêt  
que vous m'avez portés pour ce travail.*

*Veillez trouver ici l'expression de toute ma gratitude.*

*Je tiens également à remercier,*

*Sylvain Henry et Mme Simone Kirschberger qui ont largement contribué à la réalisation de cette étude. Merci pour votre soutien et vos précieux conseils.  
Vous avez fait preuve d'une efficacité remarquable !*

*Madame le Docteur Céline Desconclois et Madame le Docteur Marie Dreyfus ainsi que leurs équipes techniques pour nous avoir fait part de leurs bases de données dans les meilleurs délais.*

*Monsieur le Docteur Puyhardy pour ses conseils et ses encouragements et Monsieur le Docteur Matton pour les analyses statistiques.*

*Enfin, j'adresse mes remerciements les plus sincères à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réussite de mon parcours, à mon épanouissement personnel et qui me sont si chers.*

*A mes collègues internes et amis qui ont rendu plus agréables ces années d'internat.*

*A ma belle-famille pour les précieux coups de mains.*

*A Mimi et Pau que je vois trop peu,  
à Céline, Edgar, Alex et Arthur, les fidèles amis du quartier,  
aux expatriés de Dardilly que j'aime tant retrouver,  
aux copains de Meaux, de Parey-saint-Cézaire, de Metz, de Marseille...*

*A l'ensemble de ma famille, pour tous les bons moments partagés, si ressourçants et si précieux.*

*A mes taties si présentes et si généreuses, à mes cousins-cousines,  
à mes belles-sœurs modèles et aux trois grenouilles...*

*A mes mamies, pour leurs attentions et leur regard admiratif qui comptent beaucoup pour moi.*

*A mes grand-frères, l'une de mes plus grandes fiertés...*

*A Michaël, mon bon copain !!!  
Je garde pour nous les démonstrations d'amour !  
Mais MERCI d'être là, si attentionné et si patient.*

*A mes parents,  
Merci pour votre présence, votre écoute, votre soutien, votre fierté, votre confiance et vos encouragements à toute épreuve.  
Il m'est difficile d'exprimer toute la reconnaissance et l'admiration que j'ai pour vous.  
Je vous dédie cette thèse.*

# SOMMAIRE



<b>REMERCIEMENTS</b> .....	7
<b>SOMMAIRE</b> .....	12
<b>LISTE DES ABREVIATIONS</b> .....	16
<b>INDEX DES FIGURES ET DES TABLEAUX</b> .....	20
<b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....	23
I. Les plaquettes sanguines : structure, fonction et analyses biologiques .....	24
A. Mégacaryocytopoïèse et synthèse des plaquettes .....	24
1. Structure des mégacaryocytes et étapes de leur maturation .....	24
2. Régulation de la mégacaryopoïèse .....	25
B. Morphologie des plaquettes sanguines .....	28
1. Le glycocalix .....	29
2. La membrane plasmique.....	30
3. Le cytoplasme plaquettaire .....	33
C. Fonctions des plaquettes .....	34
1. Plaquettes et hémostase primaire.....	34
2. Plaquettes et inflammation .....	38
3. Plaquettes et cancer .....	39
D. Exploration biologique des plaquettes.....	40
1. Numération plaquettaire .....	40
2. Analyse fonctionnelle .....	51
II. Thrombopénies constitutionnelles.....	57
A. Classification des thrombopénies constitutionnelles .....	60
1. Thrombopénies constitutionnelles avec plaquettes de petite taille.....	60
2. Thrombopénies constitutionnelles avec plaquettes de taille normale .....	63
3. Thrombopénies constitutionnelles avec macroplaquettes .....	67
4. Thrombopénies constitutionnelles avec plaquettes géantes .....	73
5. Autres thrombopathies constitutionnelles .....	77
B. Prise en charge thérapeutique .....	80
1. Mesures préventives .....	80
2. Prise en charge d'une hémorragie .....	81
3. Greffe de moelle osseuse .....	81
4. Diagnostic anténatal et conseil génétique.....	82
C. Diagnostics différentiels : thrombopénies acquises .....	82

1.	Thrombopénies non auto-immunes .....	82
2.	Thrombopénies auto-immunes .....	85
III.	Analyse des plaquettes par l'ADVIA® 2120.....	86
A.	Principe de l'hématimètre ADVIA® 2120.....	87
1.	Principe d'analyse des plaquettes et des érythrocytes .....	87
2.	Intérêt de l'analyse combinée des globules rouges et des plaquettes .....	89
3.	Calcul des autres paramètres .....	90
B.	Valeurs de référence des paramètres plaquettaires et facteurs de variation .....	92
C.	Utilisation des paramètres plaquettaires .....	95
1.	Volume plaquettaire moyen .....	95
2.	Coefficient de variation du volume plaquettaire, PDW .....	98
3.	Plaquettocite, PCT.....	98
4.	Concentration plaquettaire moyenne, MPC .....	98
5.	Ecart-type de la concentration plaquettaire, PCDW .....	99
6.	Pourcentage de grandes plaquettes, %GP .....	100
7.	Masse plaquettaire moyenne, MPM.....	100
8.	Ecart-type de la masse plaquettaire, PMDW.....	100
	<b>OBJECTIFS DU TRAVAIL .....</b>	<b>101</b>
	<b>MATERIELS ET METHODES .....</b>	<b>104</b>
I.	Critères d'inclusion des sujets .....	105
A.	Témoins .....	105
B.	Patients présentant une thrombopénie constitutionnelle .....	105
C.	Patients suivis pour un PTI.....	106
II.	Matériels.....	106
III.	Méthodologie .....	107
A.	Traitement des raw datas .....	107
B.	Analyse des données recueillies .....	108
	<b>RESULTATS .....</b>	<b>110</b>
I.	Sélection des données par analyse des cyto grammes et histogrammes plaquettaires ....	111
II.	Populations témoins et détermination des valeurs de référence.....	115
A.	Valeurs de références .....	115
B.	Comparaison statistique des trois populations de témoins .....	115
III.	Paramètres plaquettaires en fonction du type de thrombopénie.....	115



A.	Thrombopénie avec plaquettes de petites tailles .....	116
B.	Thrombopénies constitutionnelles avec plaquettes de taille normale .....	116
C.	Thrombopénies constitutionnelles avec macroplaquettes .....	117
D.	Thrombopénies constitutionnelles à plaquettes géantes .....	119
E.	Thrombopathie .....	120
F.	Anomalies des granules .....	121
G.	Autres pathologies plaquettaires.....	121
IV.	Profil biologique des cas de purpura thrombopénique immunologique .....	122
<b>DISCUSSION ET PERSPECTIVES .....</b>		<b>124</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>		<b>139</b>
<b>ANNEXES.....</b>		<b>154</b>

**LISTE  
DES  
ABREVIATIONS**



ABP	actin-binding protein
ADP	adénosine diphosphate
$\alpha$ -SPD	$\alpha$ -storage pool deficiency
ADN	acide désoxyribonucléique
Arp	actin-related protein
ATP	adénosine triphosphate
BEACH	beige and CHS domain
BFU-MK	burst-forming unit megakaryocyte
CATCH 22	cardiac abnormality, T-cell deficit, cleft palate, hypocalcemia due to a chromosome 22 deletion
CCPP	centre de compétence des pathologies plaquettaires
CD	cluster de différenciation
CFU-MK	colony-forming unit megakaryocyte
CHS	Chediak-Higashi syndrome
CHU	centre hospitalier universitaire
CIVD	coagulation intra-vasculaire disséminée
CMF	cytométrie en flux
CMV	cytomégalo virus
COX	cyclooxygenase
CRPP	centre de référence des pathologies plaquettaires
CTAD	citrate théophylline adénosine dipyridamole
$\delta$ -SPD	$\delta$ -storage pool deficiency
EBV	Ebstein-Barr virus
EDTA	acide éthylène diamine tétra acétique
EFS	établissement français du sang
FLI-1	friend leukemia virus integration 1
FPD/AML	familial platelet disorder with predisposition to acute myelogenous leukemia
GBEA	guide de bonne exécution des analyses
GP	grandes plaquettes
GPX	glycoprotéine X
GR	globule rouge
HAS	haute autorité de santé

Hb	hémoglobine
HLA	human leukocyte antigen
HPA	human platelet antigen
IFN	interféron
Ig	immunoglobuline
IL	interleukine
ITAM	immunotyrosine based activation
IVIC	instituto venezolano de investigaciones científicas
LDL	low density lipoprotein
MAIPA	monoclonal antibody specific immunization platelet antigen
MGG	May-Grünwald Giemsa
MK	mégacaryocyte
MPC	mean platelet component concentration
MPLV	myeloproliferative leukaemia virus
MPM	mean platelet mass dry
NMMHC	non-muscular myosin heavy chain
NP	numération plaquettaire
PAF	facteur d'activation plaquettaire
PAR	protease-activated receptor
PCDW	platelet component distribution width
PCT	plaquettocrite
PDGF	platelet-derived growth factor
PDW	platelet volume distribution width
PF4	facteur 4 plaquettaire
PMDW	platelet mass dry distribution width
PPP	plasma pauvre en plaquettes
PRP	plasma riche en plaquettes
PTI	purpura thrombopénique immunologique
RANTES	regulated upon activation normal T-cell expressed and secreted
SBS	syndrome de Bernard-Soulier
SDF-1	stromal-derived factor-1
SE	syndrome d'Epstein
SF	syndrome de Fechtner

SMH	syndrome de May-Hegglin
SS	syndrome de Sebastien
TAR	thrombopénie et aplasie radiale
TCA	temps de céphaline activée
TCMH	teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine
TGF- $\beta$	transforming growth factor- $\beta$
THC2	thrombocytopenia 2
TIH	thrombopénie induite par l'héparine
TNF	tumor necrosis factor
TP	taux de prothrombine
TPO	thrombopoïétine
TRAP	thrombin receptor agonist peptide
TS	temps de saignement
TSP	thrombospondine
TxA2	thromboxane A2
VEGF	vascular endothelial growth factor
VGM	volume globulaire moyen
VHC	virus de l'hépatite C
VIH	virus de l'immunodéficience humaine
VPM	volume plaquettaire moyen
vWF	facteur von Willebrand
WAS	syndrome de Wiskott-Aldrich
WASP	Wiskott-Aldrich syndrome protein
XLT	thrombopénie liée à l'X

**INDEX**  
**DES FIGURES**  
**ET TABLEAUX**



- Figure 1** : Différenciation mégacaryocytaire
- Figure 2** : Aspects cytologiques des différents stades de maturation des MK
- Figure 3** : Régulation de la thrombopoïèse par la TPO
- Figure 4** : Morphologie des plaquettes
- Figure 5** : Structure et organisation membranaire des complexes GPIb-IX-V et GPIIb-IIIa
- Figure 6** : Etapes successives de l'hémostase primaire
- Figure 7** : Participation plaquettaire à l'hémostase primaire
- Figure 8** : Activation plaquettaire
- Figure 9** : Les différents antiagrégants plaquettaires et leurs cibles
- Figure 10** : Principe de l'analyse plaquettaire par la technologie Coulter
- Figure 11** : Analyse plaquettaire par l'automate Sysmex®
- Figure 12** : Illustrations de la présence d'amas plaquettaires
- Figure 13** : Amas plaquettaires à l'examen d'un frottis sanguin
- Figure 14** : Satellitisme péri-polynucléaire neutrophile et péri-lymphocytaire
- Figure 15** : Interférence des microcytes sur les grandes plaquettes
- Figure 16** : Interférence des cryoglobulines sur la numération plaquettaire
- Figure 17** : Numération plaquettaire en microscopie par inversion de phase
- Figure 18** : Numération des plaquettes par cytométrie en flux
- Figure 19** : Tests fonctionnels plaquettaires par agrégamétrie
- Figure 20** : Etude de l'expression d'une glycoprotéine plaquettaire (CD 41) par cytométrie en flux
- Figure 21** : Analyse de la fonctionnalité des grains denses par étude de l'expression de CD 63 avant et après stimulation par de la thrombine (0,4 UI/mL)
- Figure 22** : Maillage territorial des centres de référence et de compétence des pathologies plaquettaires
- Figure 23** : Morphologie des plaquettes et aspects cytométriques dans le syndrome de Wiskott-Aldrich
- Figure 24** : Thrombopénie familiale avec prédisposition à développer des leucémies aiguës
- Figure 25** : Granule  $\alpha$  géant au sein d'une macroplaquette
- Figure 26** : Plaquettes vides de son contenu  $\alpha$  granulaire
- Figure 27** : Agglutination des plaquettes à des faibles doses de ristocétine
- Figure 28** : Mutations de GPIb $\alpha$ , GPIb $\beta$  et GPIX associées au syndrome de Bernard-Soulier
- Figure 29** : Frottis sanguin montrant une plaquette géante

**Figure 30** : Inclusions basophiles (pseudo-corps de Döhle)

**Figure 31** : Profil d'agrégamétrie correspondant à une thrombasthénie de Glanzmann

**Figure 32** : ADVIA<sup>®</sup>120 et ADVIA<sup>®</sup>2120

**Figure 33** : Histogrammes *Plaq X* et *Plaq Y*, Cytogramme *Plaq*, Cytogramme *GR*

**Figure 34** : Histogramme *Vol Plaq*

**Figure 35** : Histogramme *CP Plaq*

**Figure 36** : Cytogramme *Volume / CP Plaq*

**Figure 37** : Histogramme *TP Plaq*

**Figures 38-42** : Illustrations des problèmes analytiques de l'ADVIA<sup>®</sup>2120 dans l'identification de la population plaquettaire

---

**Tableau I** : Classification des plaquettes en fonction de la courbe de distribution volumétrique et de la morphologie

**Tableau II** : Principaux éléments de la démarche diagnostique d'une thrombopénie

**Tableau III** : Classification de la thrombasthénie de Glanzmann

**Tableau IV** : Valeurs de référence des paramètres plaquettaires pour les trois centres inclus

**Tableau V** : Comparaison des trois populations de témoins par un test statistique d'analyse de la variance (ANOVA)

**Tableau VI** : Profils plaquettaires des cas de thrombopénies à petites plaquettes (WAS)

**Tableau VII** : Profils plaquettaires des cas de thrombopénies à plaquettes normales

**Tableau VIII** : Profils plaquettaires des cas de thrombopénies à macroplaquettes

**Tableau IX** : Profils plaquettaires des cas de thrombopénies à plaquettes géantes

**Tableau X** : Profils plaquettaires des cas de maladie de Glanzmann

**Tableau XI** : Profils plaquettaires des cas de pathologies des granules

**Tableau XII** : Profils plaquettaires d'un cas de syndrome de Scott et d'un cas d'anomalie de la voie de l'ADP

**Tableau XIII** : Valeurs moyennes des paramètres plaquettaires dans une population de patients suivis pour un PTI

**Tableau XIV** : Valeurs de références établies pour les trois laboratoires inclus comparativement aux données de la littérature



# **BIBLIOGRAPHIE**



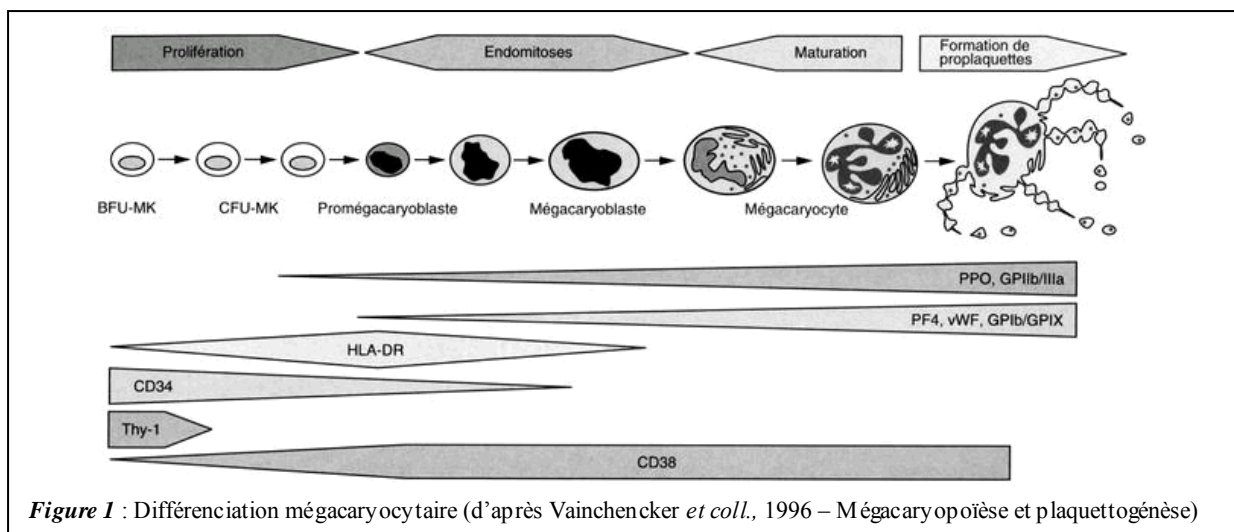
# I. Les plaquettes sanguines : structure, fonction et analyses biologiques

En 1882, Bozzozero et Hayem identifient les plaquettes comme de petits éléments circulants sanguins issus de la fragmentation d'érythrocytes et de leucocytes (1). Les recherches ont permis, depuis, de mieux préciser leur origine, leur structure et leurs fonctions.

## A. Mégacaryocytopoïèse et synthèse des plaquettes

### 1. Structure des mégacaryocytes et étapes de leur maturation

Les plaquettes (ou thrombocytes) sont de petites cellules anucléées de forme discoïde qui proviennent de la fragmentation du cytoplasme de leurs précurseurs médullaires, les mégacaryocytes (MK). Les MK sont de volumineuses cellules (30 à 100 µm pour les plus matures) présentes en faible quantité dans la moelle osseuse (< 1 %) (2). Ils sont issus de la différenciation de progéniteurs mégacaryocytaires par mitoses successives (BFU-MK, Burst Forming Unit-MegaKaryocyte, progéniteurs précoces puis CFU-MK, Colony Forming Unit-MegaKaryocyte, progéniteurs tardifs) donnant naissance aux précurseurs mégacaryocytaires (3). Les progéniteurs se caractérisent par des marqueurs de surface de différenciation comme CD 34, HLA-DR et présentent déjà des marqueurs spécifiques de la lignée plaquettaire, CD 41 et CD 61 (*figure 1*). L'acquisition des autres glycoprotéines de surface (GPIX, GPV, GPIV...) a lieu progressivement au cours de la maturation mégacaryocytaire (4).



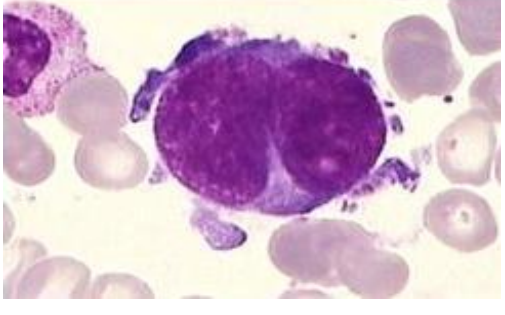
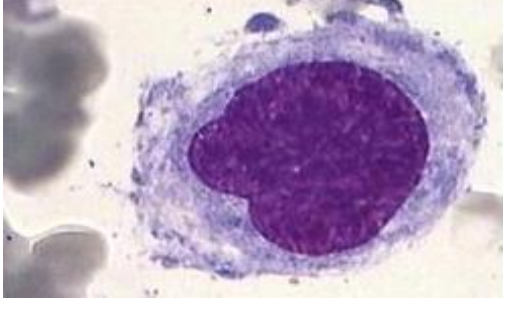
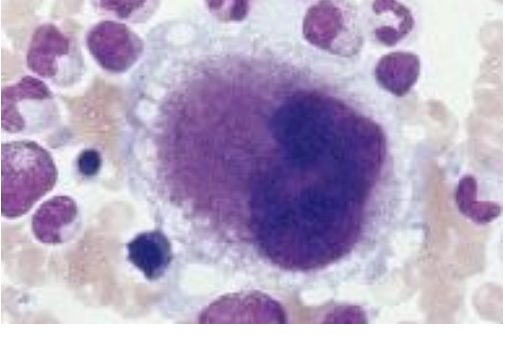

Les précurseurs mégacaryocytaires perdent ensuite progressivement leur capacité de prolifération et d'auto-renouvellement et vont subir deux étapes fondamentales de la mégacaryopoïèse : la polyploïdisation nucléaire et la maturation cytoplasmique. La

polyploïdisation du noyau correspond à une succession d'endomitoses (duplication de l'ADN sans division cytoplasmique) donnant naissance à des MK polyploïdes (de 2N à 128N) (3). Cette étape s'accompagne d'un processus de maturation et de développement du cytoplasme permettant l'acquisition de caractéristiques fonctionnelles nécessaires aux futures plaquettes : cela se traduit par l'apparition de ribosomes impliqués dans la synthèse de protéines plaquettaires, de mitochondries et de l'appareil de Golgi, réseau tubulaire et canaliculaire permettant le relargage des granules plaquettaires (2). Dès le stade mégacaryocytaire, des protéines spécifiquement plaquettaires comme le récepteur du fibrinogène (GPIIb/IIIa ou CD 41a), le facteur von Willebrand (vWF) et le facteur 4-plaquettaire (PF4) sont synthétisées et présentées à la surface des MK. D'autres protéines d'origine plasmatique sont intégrées aux granules par un mécanisme d'endocytose (fibrinogène, thrombospondine, TSP) ou de pinocytose (albumine, immunoglobulines Ig G) (5).

Quatre stades de maturation mégacaryocytaire se succèdent (*figure 2*). Au terme de huit jours de maturation, la libération de 2000 à 5000 plaquettes par MK a lieu au stade de MK plaquetto-gènes (ou MK de stade IV) (6). Plusieurs mécanismes sont évoqués : les MK émettent des pseudopodes (ou proplaquettes) au contact des sinusoides et se fragmentent dans la lumière de ces derniers (2). D'autres auteurs évoquent un système membranaire de démarcation capable de diviser le cytoplasme mégacaryocytaire en futures plaquettes (7). Les plaquettes gagnent alors la circulation sanguine où leur durée de vie atteint 8 à 10 jours. Environ 30 % de la population plaquettaire est séquestrée transitoirement à l'état physiologique par la rate. Cette rétention des plaquettes, sans pour autant en diminuer leur durée de vie, explique la thrombopénie accompagnant fréquemment la splénomégalie (hypersplénisme) (5). Les plaquettes vieillies sont éliminées par les macrophages du système réticulo-histiocytaire de la rate, du foie et de la moelle osseuse (8).

## **2. Régulation de la mégacaryopoïèse**

La mégacaryopoïèse survient dans un microenvironnement médullaire complexe soumis à de nombreuses régulations survenant à chaque étape. Ces mécanismes régulateurs permettent une adaptabilité de la synthèse plaquettaire en cas de thrombopénie en augmentant plus de dix fois la masse totale des MK (9).

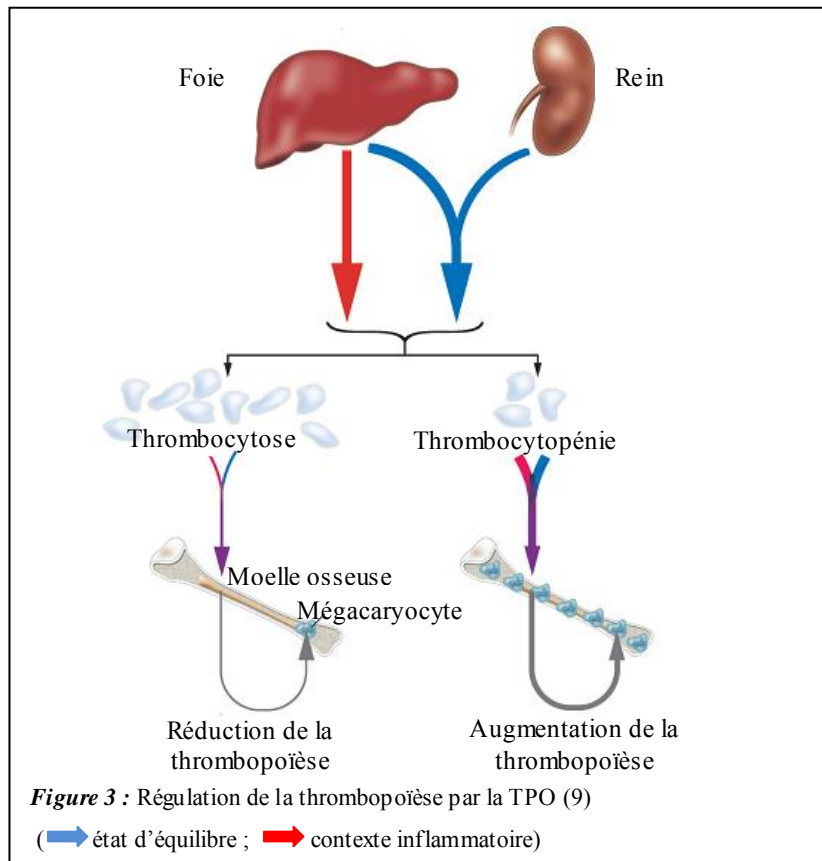
	<p align="center"><b>Mégacaryoblaste</b></p> <p>Cellule rare (10 % du total des MK)  <i>Taille</i> : 20-40 <math>\mu\text{m}</math>  Rappel nucléocytoplasmique élevé  Le noyau est unique ou double avec une chromatine fine et rarement un nucléole présent.  Le cytoplasme est basophile sans granulations</p>
	<p align="center"><b>MK basophile</b></p> <p>10 à 20 % des MK  <i>Taille</i> : jusqu'à 80 <math>\mu\text{m}</math>  Le noyau présente un contour irrégulier et une chromatine encore fine.  Le cytoplasme est basophile sans granulations.</p>
	<p align="center"><b>MK granuleux</b></p> <p>50 % des MK  <i>Taille</i> : jusqu'à 120 <math>\mu\text{m}</math>  La morphologie nucléaire est très variable d'un MK granuleux à l'autre. Le contour nucléaire est très irrégulier.  Le cytoplasme est granuleux, peu basophile et présente parfois des vacuoles.</p>
	<p align="center"><b>MK plaquetto-gène</b></p> <p>20 à 30 % des MK  <i>Taille</i> : 60-120 <math>\mu\text{m}</math>  La cellule a un aspect variable.  Le cytoplasme est proche de l'aspect des plaquettes. Son contour est mal délimité.</p>

**Figure 2** : Aspects cytologiques des différents stades de maturation des MK (10)

La thrombopoïétine (TPO) constitue la principale cytokine régulatrice de la mégacaryopoïèse. Basé sur des travaux déjà effectués avec l'érythropoïétine, ce nom lui a été attribué pour la première fois en 1958 pour décrire la « molécule capable d'augmenter la production plaquettaire » (11). Cette glycoprotéine, synthétisée au niveau du foie, du rein et de la moelle osseuse, est le ligand du récepteur c-Mpl. Ce récepteur, qui appartient à la sous-famille des récepteurs cytokiniques de classe I aux hormones de croissance, a été décrit au départ comme un proto-oncogène exprimé par le virus murin MPLV (myeloproliferative leukaemia virus) (12). La TPO est la principale cytokine responsable de la prolifération et de la maturation des

progéniteurs de la lignée mégacaryocytaire. Après s'être liée à son récepteur présent à la surface de tous les stades de MK, il y a dimérisation de ce récepteur et transduction du signal via une cascade de phosphorylation médiée par des tyrosines kinases. Elle stimule alors la ploïdisation, l'augmentation de la taille cellulaire mais aussi le processus de formation des proplaquettes permettant la fragmentation des futures plaquettes sanguines (9). Elle possède également des récepteurs à la surface des plaquettes et agit sur la sécrétion de granules  $\alpha$  et favorise l'adhésion et l'agrégation plaquettaire induite par la thrombine (3). La compréhension du rôle essentiel de la TPO dans la mégacaryopoïèse a conduit les industries pharmaceutiques à élaborer dans un premier temps des formes recombinantes de la TPO endogène. Rapidement limitées par la formation d'anticorps neutralisants ayant une activité croisée avec la TPO endogène, des agonistes du récepteur de la TPO ont été synthétisés et ont reçu l'autorisation de mise sur le marché dans le traitement du purpura thrombopénique immunologique (PTI) réfractaire après splénectomie ou en cas d'impossibilité de l'effectuer (romiplostim, N Plate<sup>®</sup> et eltrombopag Revolade<sup>®</sup>) (13). Aucun effet significatif de ces molécules sur le taux de plaquettes, permettant de réduire le nombre de transfusions, n'a été démontré dans le cadre des thrombopénies centrales après chimiothérapies (14).

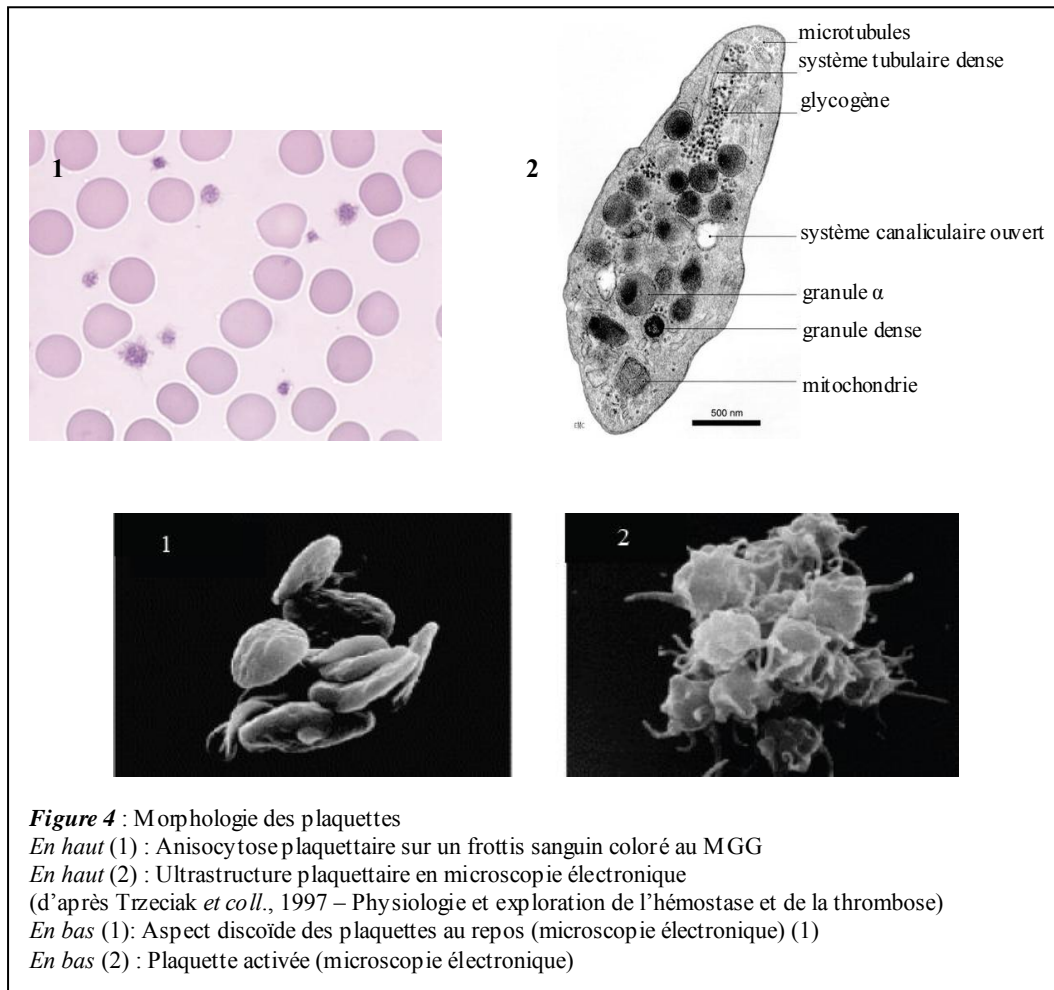
La présence de ces récepteurs de haute affinité pour la TPO à la surface des plaquettes permet de réaliser une boucle d'autorégulation. En effet, lorsque la numération plaquettaire sanguine augmente, les plaquettes captent la TPO et diminuent sa concentration plasmatique. Dans un contexte de thrombopénie, le nombre diminué de plaquettes pouvant internaliser l'hormone régulatrice entraîne une augmentation de sa concentration plasmatique et accroît la thrombopoïèse (9) (*figure 3*). Le niveau de TPO sanguin et médullaire est ainsi inversement corrélé à la numération plaquettaire, comme en témoigne les patients sous chimiothérapie thrombopénisante qui présentent des taux importants de TPO (15). En revanche, cette concentration inversement proportionnelle entre la TPO et la numération plaquettaire n'est pas retrouvée dans les contextes de thrombocytoses réactionnelles. Dans un contexte inflammatoire, l'interleukine-6 (IL-6) régule la synthèse hépatique de la TPO en potentialisant sa transcription. Des études réalisées *in vitro* mais également *in vivo* chez des patients atteints de cancer ont effectivement montré que l'administration d'IL-6 augmentait le taux d'ARNm hépatique et la concentration circulante de TPO, et que l'effet de l'IL-6 sur les plaquettes était neutralisé par l'administration de TPO (16). Le mécanisme de la thrombocytose réactionnelle observée dans les carences en fer et la régulation de la TPO dans ce contexte ne sont pas encore totalement compris.



La mégacaryopoïèse nécessite également d'autres cytokines et des interactions avec les cellules souches hématopoïétiques et les cellules stromales médullaires. L'IL-3, l'IL-6 et l'IL-11 stimulent la prolifération des progéniteurs des MK. SDF-1 (Stromal-Derived Factor-1), produits par les cellules stromales, et PF4 favorisent la migration et les interactions des MK avec les cellules endothéliales médullaires (3).

## B. Morphologie des plaquettes sanguines

Les plaquettes sont des cellules anucléées de forme discoïde, en l'absence d'activation, de 2 à 4  $\mu\text{m}$  de diamètre (17). L'examen morphologique des plaquettes constitue une étape nécessaire dans la validation biologique d'une thrombopénie (18). En pratique quotidienne, l'analyse morphologique des plaquettes repose sur un examen attentif du frottis sanguin coloré au May-Grünwald Giemsa (MGG) au microscope optique. Les plaquettes apparaissent comme de petits éléments hétérogènes en taille et en forme, souvent arrondis ou ovalaires (*figure 4*). Cette anisopoikilocytose est physiologique. Le cytoplasme clair contient des granulations azurophiles (seuls les granules  $\alpha$  sont colorés au MGG) disposées régulièrement ou regroupées en position centrale correspondant au granulomère, et un liseré clair périphérique agranulaire encore appelé hyalomère (19).



L'examen du frottis sanguin coloré au MGG constitue toujours la technique de référence pour l'évaluation de la taille plaquettaire. Les microscopes peuvent être équipés d'un micromètre oculaire gradué qui se superpose à l'image du frottis. Le terme de « grandes plaquettes » est utilisé pour définir des plaquettes de taille supérieure à celle correspondant à l'anisocytose physiologique. Les intitulés « macroplaquettes » et « plaquettes géantes » sont également utilisés dans la littérature pour définir des grandes plaquettes. Leur taille est inférieure au globule rouge pour les macroplaquettes et supérieure pour les plaquettes géantes (20).

La microscopie électronique permet de distinguer les différents composants de la plaquette (figure 4).

### 1. Le glycocalix

Cette structure périplaquettaire est constituée de glycosaminoglycanes. Face aux glycosaminoglycanes endothéliaux, les plaquettes sont repoussées à distance de l'endothélium par opposition de charges négatives (1).

## 2. La membrane plasmique

La membrane plasmique se présente sous forme d'une bicouche phospholipidique avec deux feuillets lipidiques externe et interne maintenant une couche riche en glycoprotéines. Les sphingomyélines constituent essentiellement le feuillet externe. Le feuillet interne se compose de phosphatidylsérine, phosphatidyléthanolamine et de phosphatidylinositol. D'autres phospholipides, les phosphatidylcholines, sont insérés entre les deux feuillets. Il existe une assymétrie de distribution des lipides membranaires, les charges négatives étant disposées dans le feuillet interne. Une protéine particulière, la scramblase, assure le maintien de cette assymétrie (1). Des récepteurs glycoprotéiques sont intégrés dans la partie externe de la membrane plasmique et jouent un rôle essentiel dans l'hémostase primaire en se liant spécifiquement à des ligands. Plus de 40 molécules protéiques ont été identifiées à la surface plaquettaire dont les complexes Ib-IX-V et IIb-IIIa sont les représentants majeurs. La plus grosse glycoprotéine est désignée par le chiffre romain I, la plus petite par le chiffre IX. Les lettres a et b ont été rajoutées lorsque des techniques d'électrophorèse plus résolutive ont permis de mieux séparer chacune des glycoprotéines (5).

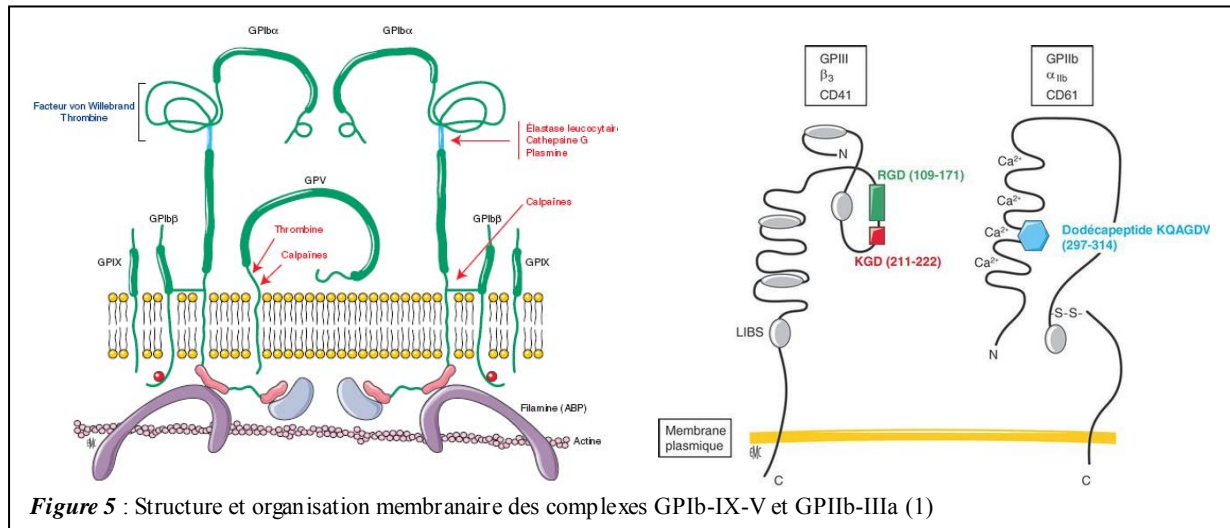
### - Le complexe glycoprotéique GPIb-IX-V

Ce complexe glycoprotéique est constitué de quatre sous-unités codées par des chromosomes différents (GPIb $\alpha$  : 17p12, GPIb $\beta$  : 22q12-2, GPV : 3q29 et GPIX : 3q21) et assemblées au stade de MK mature (21). Il existe environ 25000 structures GPIb-IX-V par plaquette.

Le complexe GPIb-IX-V comprend deux molécules Iba et deux molécules Ib $\beta$  reliées entre elles par des ponts disulfure, deux molécules IX et une molécule V, chacune caractérisée par des séquences répétées riche en leucine (22) (*figure 5*). La GPIb (CD 42b), glycoprotéine majeure de ce complexe, possède les sites de fixation du vWF et de la thrombine. La principale fonction de ce complexe se situe dans la phase d'adhésion plaquettaire à l'endothélium lésé. Le vWF, présent dans le sang sous forme de complexes multimériques, se fixe au sous-endothélium et dévoile un site cryptique de fixation à la sous-unité GPIb $\alpha$  au niveau de son domaine A1. Les forces de cisaillement intenses présentes au niveau de l'endothélium sont également responsables d'un changement conformationnel du complexe glycoprotéique plaquettaire et du vWF facilitant leur liaison (22). GPIX (CD 42a) associée à la sous-unité GPIb $\beta$  intervient surtout dans l'ancrage du complexe à la membrane plaquettaire. GPV forme des liaisons covalentes avec les GPIb et GPIX et est secondairement clivé par la thrombine après activation plaquettaire. Son rôle serait mineur au sein du complexe.



La structure GPIb-IX-V possède des sites de liaison au cytosquelette, en particulier à l'actin binding-protein (ABP) via ses domaines cytoplasmiques, permettant la transmission du signal d'activation plaquettaire (22). Le complexe est le support de l'antigène plaquettaire HPA-2 (human platelet antigen-2).



- Le complexe glycoprotéique GPIIb-IIIa (23)

Présents à hauteur de 60000 à la surface plaquettaire et dans les granules  $\alpha$ , GPIIb (CD 41) et GPIIIa (CD 61) forment le complexe glycoprotéique majeur de la membrane plaquettaire (figure 5). Ce complexe ( $\alpha$ I**IIb** $\beta$ 3) appartient à la famille des intégrines, hétérodimères calcium-dépendant comportant une sous-unité  $\alpha$  et une sous-unité  $\beta$ . GPIIb est constituée de deux chaînes, la chaîne lourde extra-cellulaire et la chaîne légère transmembranaire, reliées par un pont disulfure. La GPIIIa constitue une chaîne polypeptidique unique. Les gènes codant pour ces protéines sont situés sur le chromosome 17q21-23 (*ITGA2B* et *ITGB3*). GPIIbIIIa, dont le ligand principal est le fibrinogène, détient un rôle capital durant la phase d'agrégation plaquettaire car il permet l'établissement de ponts inter-plaquettaires. La liaison du complexe au fibrinogène s'effectue par reconnaissance d'un tripeptide, Arg-Gly-Asp (séquence RGD). D'autres protéines adhésives comme le vWF, la fibronectine et la vitronectine contiennent des séquences RGD et peuvent également s'y lier. L'expression du complexe GPIIbIIIa et la liaison à ces ligands nécessitent un changement conformationnel de la plaquette et la distribution du pool interne situé dans les granules  $\alpha$  consécutivement à la phase d'activation plaquettaire. GPIIbIIIa est également le support des antigènes plaquettaires HPA-1, HPA-4 et HPA-3.

- La glycoprotéine GPVI

La GPVI appartient à la superfamille des immuno-récepteurs. Environ 4000 complexes formés par cette glycoprotéine et la chaîne gamma des récepteurs des immunoglobulines sont exprimés par plaquettes. Elle est le récepteur principal du collagène de type I et III présent dans le sous-endothélium (8).

- Autres glycoprotéines et récepteurs membranaires

Il existe de nombreuses autres protéines qui constituent des récepteurs d'adhésion, d'activation, d'agrégation et d'inhibition plaquettaire. Les glycoprotéines GPIa et GPIIa sont formées d'une chaîne polypeptidique unique. La GPIa (CD 49b), qui porte l'alloantigène HPA-5, intervient à la phase initiale de l'adhésion plaquettaire au sous-endothélium en jouant le rôle de récepteur pour le collagène. La GPIIa (CD 29) forme avec la GPIc (CD 49e) le récepteur de la fibronectine et avec la GPId (CD 49f) le récepteur de la laminine (1,17). La GPIV (CD 36), récepteur de la TSP et du collagène, intervient pour renforcer l'agrégation plaquettaire. Tout comme le complexe GPIIbIIIa, cette glycoprotéine est présente à la surface des plaquettes mais aussi de la membrane des granules  $\alpha$ . CD 9, dont la fonction est mal connue, s'associe au complexe GPIIbIIIa après activation cellulaire. De manière générale, la fixation des molécules adhésives aux diverses glycoprotéines de surface ou aux intégrines entraînent une cascade de phosphorylation par des tyrosines kinases de motifs particuliers dont les immuno-tyrosine based activation motifs (ITAM) (24).

La membrane plasmique plaquettaire présente également le récepteur de haute affinité à la TPO, c-MPL, des récepteurs des Ig, des récepteurs aux agonistes plaquettaires solubles (thromboxane A2 TxA2, ADP, ATP, thrombine) dont la plupart sont couplés à la protéine G (TP $\alpha$ , P2Y1, P2X1, PAR) ainsi que d'autres allo-antigènes que ceux cités précédemment (HLA-1...) appartenant au complexe majeur d'histocompatibilité.

La membrane plaquettaire constitue la surface d'échange avec l'environnement. Le système canaliculaire, correspondant à des invaginations profondes de la membrane externe, établit ce lien entre l'intérieur de la plaquette et l'extérieur. Il permet d'augmenter la surface de contact des plaquettes en rendant accessible un plus grand nombre de récepteurs glycoprotéiques. En fusionnant avec la membrane des granules, il permet également la sécrétion du contenu granulaire. Ce réseau complexe correspondrait aux vestiges du système membranaire de démarcation permettant de définir les futures plaquettes dans le cytoplasme des MK (5).

### 3. Le cytoplasme plaquettaire

Le cytoplasme se constitue d'un cytosquelette de protéines contractiles comprenant des microfilaments d'actine auquel se lient de nombreuses autres protéines telles que la myosine, la vinculine, la gelsoline et l'ABP. La configuration de ce cytosquelette est essentielle à la plaquette pour assurer sa fonction dans l'hémostase primaire. L'entrecroisement des filaments d'actine permet le changement conformationnel de la plaquette activée et la rétraction du thrombus une fois constitué. Le cytosquelette intervient également dans l'activité contractile nécessaire à la sécrétion des granules. Le maintien de la forme discoïde au repos est assuré par un anneau de tubuline présent en périphérie de la plaquette. Un système de membranes non connecté à la surface, le système tubulaire dense, correspond à du réticulum endoplasmique lisse résiduel du MK. Il contient les enzymes du métabolisme lipidique, des ions calciques et les enzymes régulant le transport cellulaire (8). Il constitue le siège de la formation de  $TxA_2$ . Trois types de granules constituent le granulomère plaquettaire : les granules  $\alpha$ , les granules denses et les lysosomes (25,26).

#### - Granules $\alpha$

Les granules  $\alpha$  constituent les organites de stockage majoritaires. Prédominants par leur nombre (8 à 10 par plaquette) et leur taille (0,3 à 0,5  $\mu\text{m}$ ), ils sont aisément repérables en microscopie électronique par leur aspect ovalaire, grisé, avec quelques structures tubulaires et une région plus dense aux électrons car plus riche en protéoglycanes, le nucléoïde (26). Ils contiennent un grand nombre de protéines spécifiques des plaquettes synthétisées au niveau du MK ( $\beta$ -thromboglobuline, PF4 et vWF) ou d'origine plasmatique (fibrinogène, TSP, IgG) et des facteurs de croissance (PDGF, Platelet-derived growth factor et TGF- $\beta$ , Transforming growth factor). La membrane des granules  $\alpha$  contient diverses molécules parmi lesquelles le complexe GPIIb-IIIa et la P-sélectine (CD 62P).

#### - Granules denses

La plaquette contient 4 à 5 granules denses de 0,2 à 0,3  $\mu\text{m}$  de diamètre. De morphologie ovale ou arrondie, ils sont denses aux électrons en microscopie électronique (26). Ces granules sont le lieu de stockage de la sérotonine, puissant vasoconstricteur, du calcium responsable de la densité en microscopie électronique, d'ATP et d'ADP responsable de l'agrégation plaquettaire ADP-dépendante.

#### - Lysosomes

Ces organites intracellulaires ubiquitaires de 0,2  $\mu\text{m}$  contiennent des hydrolases acides comme la phosphatase-acide et la  $\beta$ -glucuronidase ainsi que la collagénase et la proélastase.

## **C. Fonctions des plaquettes**

Longtemps considérées comme de simples transporteurs des facteurs de la coagulation (27), le rôle des plaquettes est désormais bien établi dans la physiologie de l'hémostase. De nombreuses fonctions leurs sont également attribuées dans la thrombose, l'inflammation ou la dissémination métastatique de certains cancers (1). Celles-ci sont développées ici à titre indicatif.

### **1. Plaquettes et hémostase primaire**

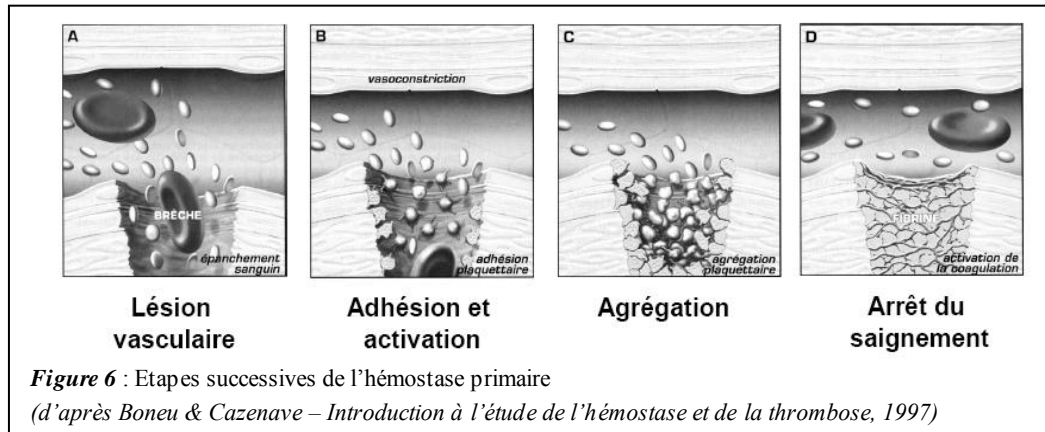
En situation de rupture de l'intégrité de l'endothélium vasculaire, l'hémostase correspond à une série de processus cellulaires et biochimiques assurant l'obturation de la brèche et le contrôle de l'hémorragie. Trois étapes se succèdent.

L'hémostase primaire correspond au colmatage de la brèche vasculaire par un agrégat plaquettaire. L'hémostase secondaire permet de consolider le thrombus plaquettaire par un réseau de fibrine issu de la cascade de coagulation plasmatique. Enfin, la fibrinolyse assure la dégradation de la masse de fibrine et permet de retrouver une perméabilité vasculaire (28). Seule l'hémostase primaire sera développée ici en raison de l'intervention majeure des plaquettes dans cette étape.

#### ***a) Rôle de l'endothélium vasculaire***

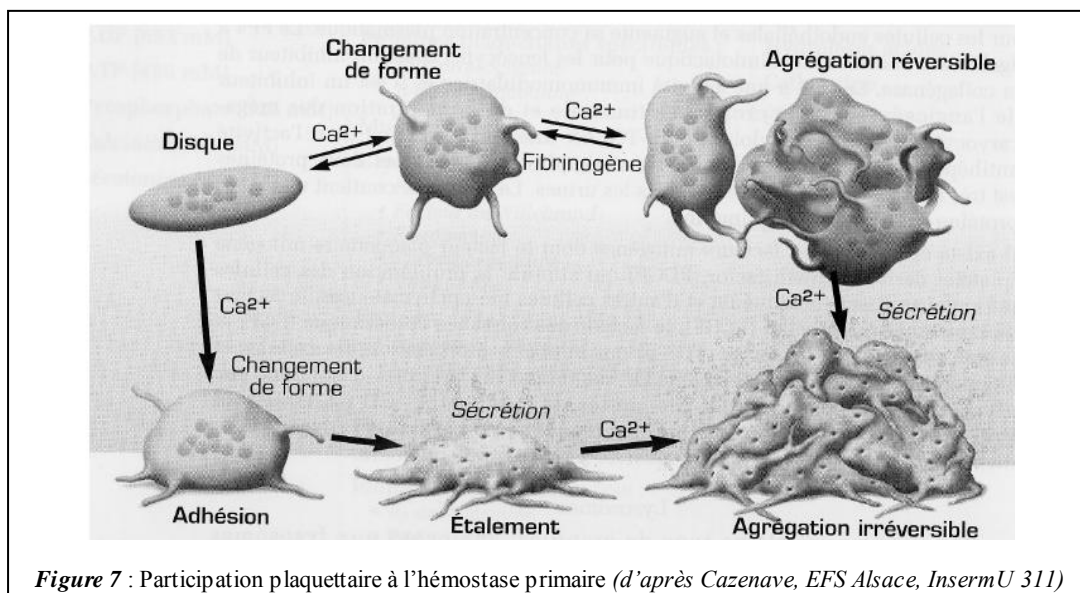
L'hémostase primaire fait intervenir deux acteurs principaux : l'endothélium vasculaire et les plaquettes sanguines. L'endothélium correspond à la monocouche de cellules endothéliales cohésives au contact de la circulation sanguine. Sans cesse soumis à divers stimuli physiques (forces de cisaillement) et humoraux (cytokines diverses), il joue un rôle essentiel dans le maintien de l'homéostasie sanguine. Cet état d'équilibre repose sur ses capacités de synthèse de multiples médiateurs (1). Le vWF, synthétisé à la fois par les MK et les cellules endothéliales, intervient dans l'adhésion des plaquettes au sous-endothélium et constitue le transporteur du facteur anti-hémophilique A (facteur VIII de la coagulation). Le facteur tissulaire, protéine transmembranaire, est exprimé de façon inductible par la cellule endothéliale activée et constitutivement par le sous-endothélium. Exposé aux protéines procoagulantes (facteur VII activé), il initie la cascade de coagulation. La thrombomoduline active la protéine C, facteur inhibiteur de la coagulation, en présence de thrombine. L'endothélium produit également des protéines vasoactives telle que le monoxyde d'azote et la prostacycline (PGI<sub>2</sub>), vasodilatatrices, ou l'endothéline et TxA<sub>2</sub>, vasoconstrictrices, qui modulent également l'activité plaquettaire (28).

L'endothélium est l'acteur essentiel de la première étape de l'hémostase primaire. Décrite sous le nom de « temps vasculaire », elle correspond à une vasoconstriction réflexe et transitoire du vaisseau lésé. En ralentissant le débit sanguin, elle permet une stase circulatoire favorisant la mise en œuvre des étapes suivantes de l'hémostase.



**b) Etapes de l'hémostase primaire (figures 6 et 7)**

La lésion endothéliale entraîne la mise à nu de surfaces très thrombogènes comme les fibres de collagène qui représentent le déclencheur physiologique essentiel de l'hémostase primaire. Les plaquettes adhèrent au collagène grâce aux ponts formés par le vWF contenu dans le plasma et au sein des corps de Weibel-Palade endothéliaux et le complexe d'adhésion plaquettaire GPIb-IX-V. Des liaisons directes entre les plaquettes et le collagène sont également formées via des récepteurs spécifiques, GPVI et GPIa (1).



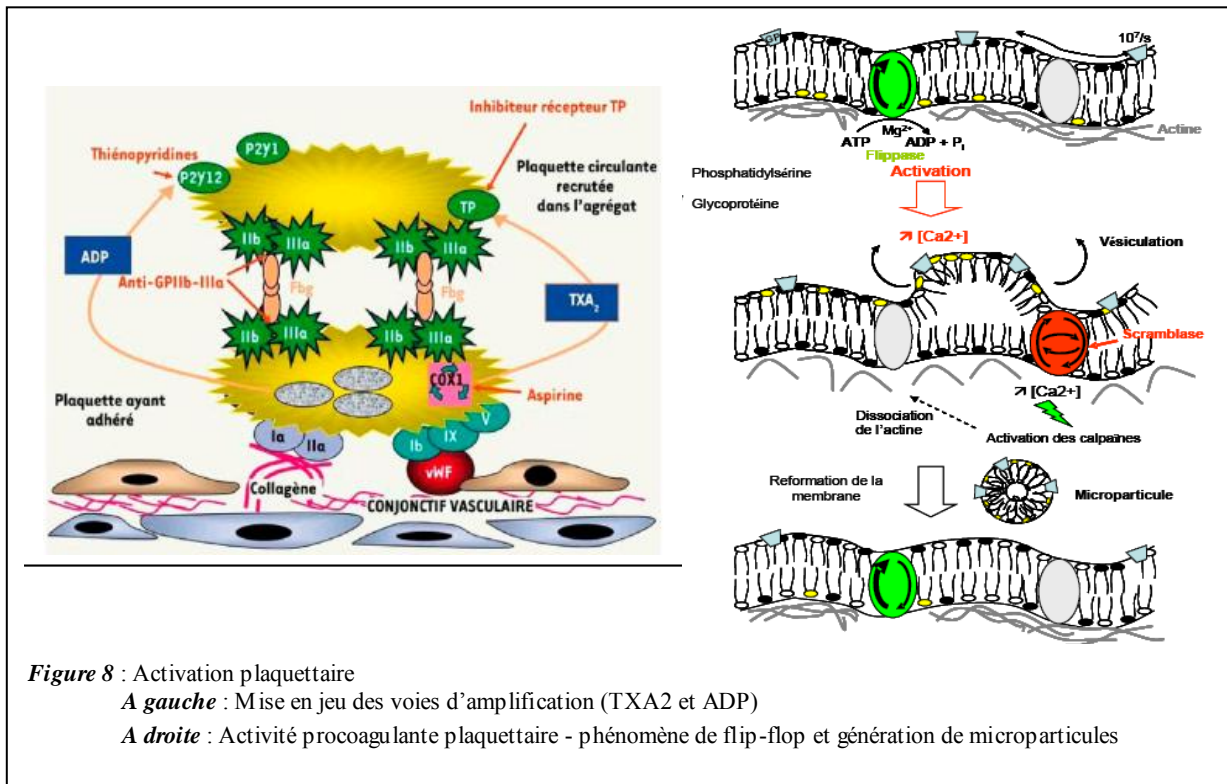
La phase d'activation plaquettaire consécutive à leur adhésion se caractérise par deux phénomènes principaux, leur changement de forme et leur activation métabolique. Ces processus actifs nécessitent de l'énergie sous forme d'ATP. Les plaquettes deviennent

sphériques, émettent des pseudopodes. Ce changement de forme est assuré par le cytosquelette (système contractile actine-myosine) lié aux récepteurs membranaires via la protéine ABP. La polymérisation des filaments d'actine qui nécessite des ions calciques présents dans le cytoplasme permet un plus grand contact intercellulaire et une rétraction du caillot. Cette modification conformationnelle s'accompagne d'un relargage du contenu des granules par fusion de leur membrane avec le système canaliculaire ouvert.

Différents médiateurs solubles se fixent à leur récepteur spécifique et amplifient les phases d'adhésion et d'activation plaquettaire initiales en recrutant des plaquettes supplémentaires. La thrombine, produit de la cascade de coagulation, est un puissant agoniste plaquettaire qui se fixe sur ses récepteurs spécifiques PAR (Protease-Activated Receptor) -1 et -4 et le complexe GPIIb-IX-V (28). L'ADP, via ses récepteurs P2Y<sub>12</sub> et P2Y<sub>1</sub>, l'épinéphrine, le facteur d'activation plaquettaire (PAF), la sérotonine, la vasopressine et les immunoglobulines G libérés des granules constituent tous des facteurs potentialisant la phase d'activation plaquettaire (29). Le TxA<sub>2</sub> plaquettaire est généré par les actions séquentielles de la phospholipase A<sub>2</sub>, qui libère l'acide arachidonique de la membrane plaquettaire, et de la COX-1 (cyclooxygénase-1) qui convertit l'acide arachidonique en prostaglandine H. La thromboxane synthétase catalyse l'étape finale de la synthèse du TxA<sub>2</sub> (30). Ce puissant agent pro-agrégant plaquettaire favorise le recrutement de plaquettes en circulation et potentialise également la vasoconstriction réflexe initiale.

Deux autres phénomènes caractérisent cette étape d'activation plaquettaire. Le complexe GPIIb/IIIa, initialement lié aux protéines du cytosquelette, est exposé à la surface plaquettaire (phénomène in-out) après modification conformationnelle. Il permet ensuite l'établissement de ponts inter-plaquettaires via le fibrinogène et la formation d'agrégats plaquettaires amplifiée par l'ADP et les premières traces de thrombine synthétisée par la cascade de la coagulation (23) (*figure 8*). La TSP, libérée des granules  $\alpha$  plaquettaires et du sous-endothélium, vient consolider l'agrégat interplaquettaire via la glycoprotéine GPIV. L'autre phénomène essentiel correspond au « flip-flop » des phospholipides membranaires (*figure 8*). Ce phénomène fait intervenir une aminophospholipide translocase ou flippase qui permet le transport des aminophospholipides vers le feuillet interne, une floppase qui permet leur externalisation et enfin la scramblase responsable d'un transport aspécifique bidirectionnel. Les structures internes de la membrane plaquettaire (phosphatidylsérine chargée négativement) s'extériorisent alors en regard du plasma et deviennent des supports pour la fixation des facteurs de la coagulation.

L'activité procoagulante des plaquettes s'exprime également par la formation de microparticules riches en phospholipides anioniques et capable de fixer les facteurs V (accélélerine) et X (facteur de Stuart) de la coagulation activés par la thrombine (31).

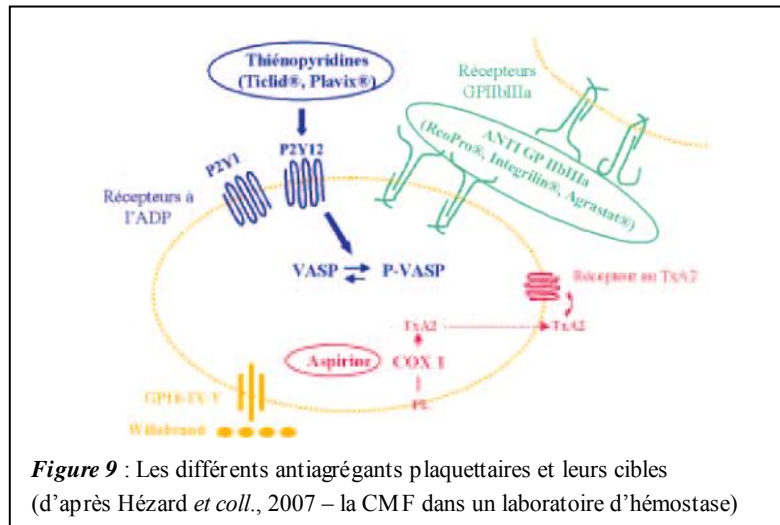


La cascade de la coagulation aboutit à la transformation du fibrinogène circulant en fibrine insoluble par la thrombine générée. Cette enzyme clé de la coagulation assure également une rétroactivation et l'amplification des différentes étapes de la coagulation et de l'hémostase primaire en se fixant sur ses récepteurs PAR<sub>1</sub> et PAR<sub>2</sub> et une sous-unité du complexe GPIIb-IX-V. La formation de ce réseau protéique est focalisée sur l'agrégat plaquettaire riches en phospholipides (facteur 3 plaquettaire ou phosphatidylsérine) (28). Le clou plaquettaire, fragile et temporaire, est alors consolidé.

### c) Plaquettes et thrombose – implications thérapeutiques

L'hémostase est un processus hautement régulé assurant un contrôle local de la constitution du caillot et évitant l'activation de la coagulation à distance de la brèche vasculaire. Lorsque cet équilibre est rompu et notamment que les plaquettes sont activées de manière inappropriée, elles fournissent une surface propice aux réactions de coagulation et constitue un risque de thrombose bien connu dans les pathologies artérielles. Les molécules thérapeutiques développées dans la prévention de ces manifestations thrombotiques ciblent différentes molécules clés de l'activation plaquettaire (figure 9).

Les inhibiteurs de la COX-1 (Aspirine<sup>®</sup>) et les antagonistes des récepteurs de l'ADP (ticlopidine-Ticlid<sup>®</sup>, clopidogrel-Plavix<sup>®</sup>) empêchent le recrutement de plaquettes.



Les antagonistes de l'intégrine GPIIbIIIa (Réopro<sup>®</sup>) agissent sur la phase d'agrégation plaquettaire (32).

## 2. Plaquettes et inflammation

Les premières études qui ont suggéré l'importance fonctionnelle des plaquettes dans l'inflammation concernaient l'athérosclérose. Brièvement, la formation de la plaque d'athérosclérose résulte de la diffusion de lipoprotéines LDL (low density lipoprotein) via les jonctions inter-cellules endothéliales, de leur accumulation et de leur oxydation dans le sous-endothélium et de l'activation secondaire de l'endothélium à l'origine d'un processus inflammatoire et du recrutement de leucocytes (30). Longtemps considérées comme de simples figurants incorporés au thrombus associé à la plaque d'athérosclérose mature, les plaquettes ont, en réalité, un rôle bien défini dans la constitution de cette plaque. Il s'explique par leur capacité à stocker et libérer plus de 300 protéines différentes ainsi que des radicaux libres. Certaines, comme l'interleukine-1 $\beta$ , PF4 et RANTES (Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed, and Secreted), ont des propriétés pro-inflammatoires avérées et peuvent recruter d'autres cellules de l'inflammation (leucocytes, monocytes) (33). PF4 est impliqué, en présence de RANTES, dans le recrutement de monocytes et l'exocytose des polynucléaires neutrophiles adhérents mais aussi dans l'inhibition de la dégradation du récepteur des LDL favorisant aussi leur intégration au sous-endothélium. La P-sélectine, exprimée par les plaquettes mais aussi par l'endothélium activé, joue un rôle déterminant dans les interactions leucocytes-plaquettes et les phénomènes d'adhésion et de rolling de ces cellules sur l'endothélium (34). Les plaquettes expriment également le ligand du CD 40,



membre de la famille du TNF $\alpha$  (tumor necrosis factor), impliqué dans la liaison des plaquettes activées aux monocytes (30). Les microparticules générées par les plaquettes véhiculent également des messagers pro-inflammatoires à l'endothélium comme RANTES qui favorisent le recrutement des monocytes. Des facteurs de croissance comme PDGF et TGF- $\beta$  libérés des granules  $\alpha$  par les plaquettes activées jouent un rôle dans l'évolution chronique de l'athérosclérose en favorisant la prolifération de cellules musculaires lisses.

La contribution des plaquettes dans le processus inflammatoire associé à d'autres pathologies est moins bien étudiée. Mais leur implication a été décrite dans l'étiologie des maladies inflammatoires de l'intestin, la polyarthrite rhumatoïde, le psoriasis ou encore les migraines (30,34).

### **3. Plaquettes et cancer**

Les plaquettes interviennent dans plusieurs étapes de la tumorigénèse. Grâce à leur capacité à stocker des agents mitogènes comme l'acide lysophosphatidique, les plaquettes jouent un rôle stimulateur de la prolifération des cellules tumorales (35). Les plaquettes sont également une source importante de molécules proangiogènes comme le VEGF (Vascular endothelial growth factor) et le PDGF mais aussi, de façon paradoxale, de molécules antiangiogènes comme la TSP ou le PF4. Certaines études suggèrent que ces médiateurs pro- et antiangiogéniques seraient stockés dans des granules différents et que seules les molécules proangiogéniques seraient libérées dans un contexte tumoral (30). Ces interactions plaquettes-cellules tumorales sont bidirectionnelles puisque ces cellules expriment également des protéines (cathepsin B, matrix-metalloproteinase-2) qui activent les plaquettes et favorisent la libération de ces molécules proangiogéniques. L'état d'hypercoagulabilité inhérent au cancer (syndrome de Trousseau (36)) et la thrombine générée sont également responsables de l'activation des plaquettes et de l'émission de microparticules vectrices d'une activité procoagulante et de facteurs de croissance angiogènes (35).

Le rôle des plaquettes dans le développement des métastases a été suggéré par Gasic et son équipe (1968) qui ont démontré que des souris thrombopéniques ne développaient pas de métastases après injection de cellules tumorales (37). Les plaquettes forment des complexes avec les cellules tumorales et les leucocytes via les sélectines membranaires (P- et L-sélectines) et les intégrines ( $\alpha$ IIb $\beta$ 3) qui leur permettent d'échapper au système immunitaire. Ces complexes favorisent également leur immobilisation sur l'endothélium et la pénétration des cellules tumorales dans les tissus. Il a d'ailleurs été montré une augmentation de

l'expression de molécules d'adhésion à la surface des plaquettes chez les patients atteints d'un cancer à un stade avancé (38).

## **D. Exploration biologique des plaquettes**

Les technologies de réalisation d'un hémogramme ont connu des progrès considérables depuis le milieu du 20<sup>ème</sup> siècle dans le but d'améliorer la précision, la reproductibilité et la vitesse d'exécution d'une des analyses biologiques les plus prescrites en pratique courante. Bien que la diffusion d'automates de plus en plus performants ait permis d'atteindre ces objectifs, la numération plaquettaire est sujette à des interférences et ces techniques présentent encore des limites, notamment en terme de précision, qu'il est important de connaître.

Dans un contexte de thrombopénie où le risque majeur reste la survenue d'hémorragies mettant en jeu le pronostic vital, il se pose la question d'une transfusion plaquettaire prophylactique dont la décision tient compte, en partie, de la numération plaquettaire. L'enjeu de cette décision est double à travers la prévention d'une hémorragie et la régulation nécessaire des indications de transfusion dans le souci d'épargner un produit rare et précieux. Le seuil d'indication de transfusion plaquettaire a été abaissé à 20 G/L voire 10 G/L et certains discutent d'un seuil à 5 G/L (39,40). Cependant, la révision de ce seuil est limitée par l'imprécision reconnue des automates et leur manque de reproductibilité pour des numérations plaquettaires inférieures à 20 G/L (41). Nous verrons que la numération plaquettaire immunologique (par immuno-marquage spécifique et analyse par cytométrie en flux) a alors toute son indication en complément d'une numération automatisée.

Nous verrons, enfin, les tests fonctionnels disponibles permettant d'identifier les fonctions plaquettaires altérées définissant la thrombopathie.

### **1. Numération plaquettaire**

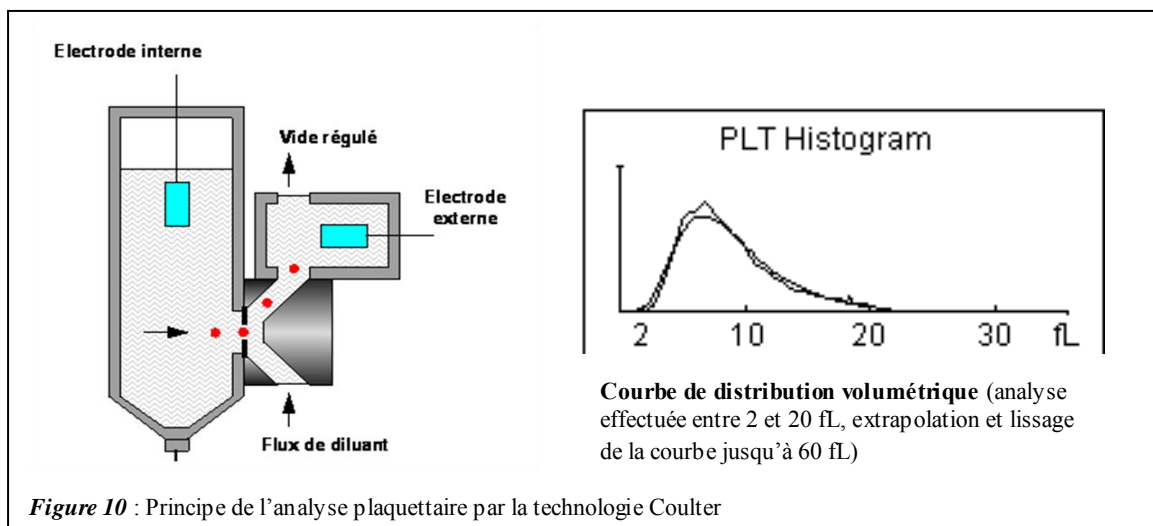
L'hémogramme est réalisé à partir de sang veineux ou capillaire prélevé dans un tube contenant un anticoagulant recommandé, l'EDTA (acide éthylène diamine tétra acétique) (42). Un autre anticoagulant, le citrate, peut également être utilisé. Il est notamment indiqué dans le cadre d'une thrombopénie liée à une thrombo-agglutination à l'EDTA. Le prélèvement doit être analysé dans les 6 heures (43). En routine, l'analyse des plaquettes associe la numération plaquettaire et la détermination du Volume Plaquettaire Moyen (VPM). Chez l'Homme, la numération plaquettaire, stable tout au long de la vie, est de 150 à 400 G/L. La thrombopénie est définie par une numération inférieure à 150 G/L et la thrombocytose par une numération supérieure à 400 G/L (44). Concernant le VPM, bien que plusieurs auteurs

proposent des valeurs de référence (45–47), nous verrons dans le chapitre III que ce paramètre est soumis à de nombreux facteurs de variations et que chaque laboratoire devrait définir ses propres valeurs de référence (20).

### a) Hématimètre

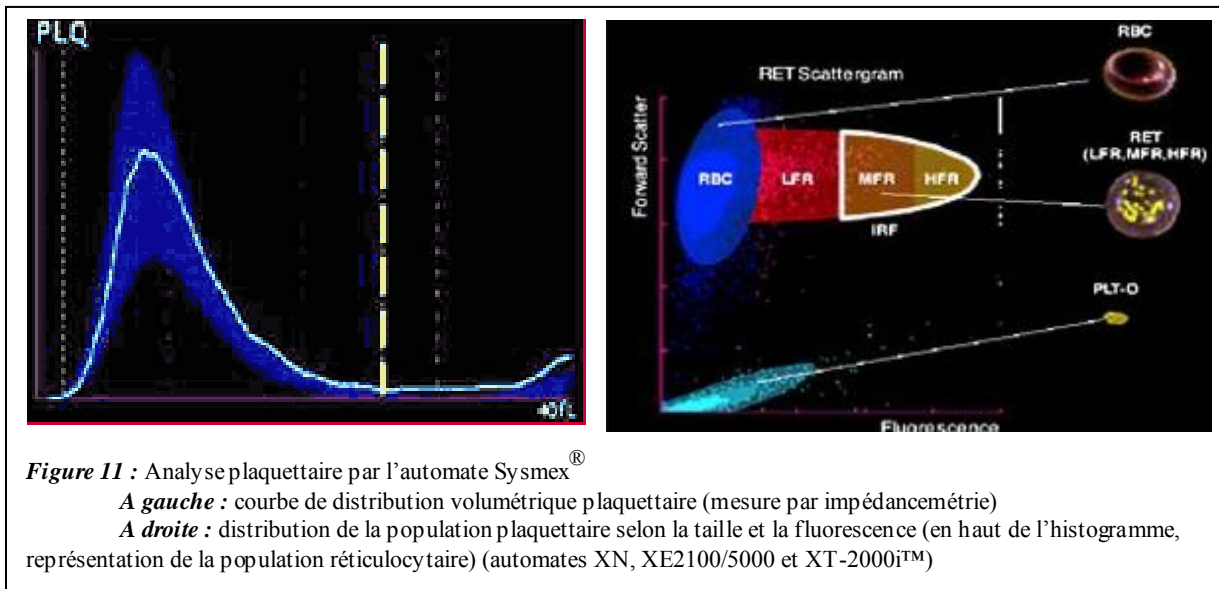
#### (1) Méthodes d'analyse plaquettaire

Deux technologies sont utilisées par les hématimètres présents sur le marché pour compter les plaquettes. La plus ancienne, le principe Coulter, a été développée en 1953 et a révolutionné la numération sanguine (48). Il s'agit d'une technique de mesure volumétrique. Les cellules mises en suspension dans un liquide conducteur et guidées à travers un orifice vont déclencher lors de leur passage entre deux électrodes une augmentation de la résistance électrique qui génère une impulsion électrique. Le nombre d'impulsions correspond au nombre de cellules ayant franchi l'orifice et le volume cellulaire est déduit directement de l'amplitude de l'impulsion (49) (figure 10).



Cette technologie est disponible sur les hématimètres Unice1<sup>®</sup> DxH<sup>™</sup>, LH500/750/780<sup>®</sup> de Beckman Coulter et Sysmex<sup>®</sup>. Le domaine d'analyse des plaquettes diffère en fonction des constructeurs et de l'évolution technologique des hématimètres. Pour exemple, le LH750<sup>®</sup> compte comme des plaquettes les éléments de volume compris entre 2 et 20 fL. Le XE-2100D<sup>®</sup> prend en compte les événements de taille comprise entre 2 et 40 fL. La mesure des impulsions permet d'obtenir une courbe de distribution plaquettaire volumétrique d'allure log-normale (figures 10 et 11). Celle-ci est lissée et extrapolée jusqu'à 60 fL avec le LH750<sup>®</sup>. Le VPM est déterminé à partir de cette courbe.

Les limites de la méthode par impédancemétrie sont bien connues et notamment sa difficulté à distinguer les plaquettes d'autres particules de taille similaire (47,50). Sysmex® a développé une technologie de numération optique des plaquettes par fluorescence couplée à la méthode par impédancemétrie (automates XN, XE2100/5000 et XT-2000i®) (figure 11).



Elle utilise un colorant fluorescent breveté qui marque le contenu en ADN/ARN. Cette technologie a permis de s'affranchir en partie des limites de l'impédancemétrie en différenciant par leurs propriétés optiques les plaquettes des particules cellulaires interférentes (50).

L'autre méthode d'analyse plaquettaire utilisée par certains automates est une mesure optique de diffraction laser bidimensionnelle. Cette technologie, utilisée par les automates ADVIA®120, ADVIA®2120 et ADVIA®2120i (Siemens Healthcare Diagnostics) mais aussi par ABBOTT (Cell-Dyn®), est développée en partie III.

## (2) Facteurs interférents avec la numération plaquettaire

Plusieurs facteurs étant susceptibles d'interférer avec les plaquettes, la validation biologique d'une numération plaquettaire, et notamment d'une thrombopénie, nécessite une attention particulière à toutes les étapes du processus analytique.

Avant de considérer une erreur technique liée à l'automate, une anomalie liée à la phase pré-analytique doit être envisagée. Les conditions pré-analytiques (liées au patient et au prélèvement) constituent une étape importante dans le traitement d'une analyse et peuvent influencer de façon majeure le résultat obtenu. Une erreur d'identité du patient, un prélèvement à proximité d'une perfusion ou effectué dans des conditions difficiles avec la

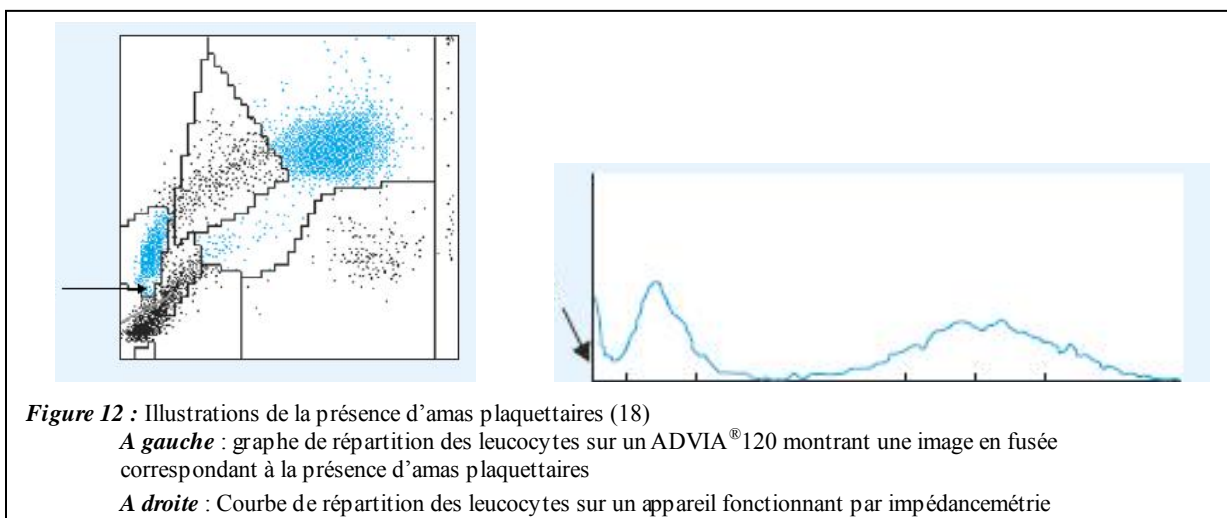
formation de micro-caillots sont autant de risques de résultats erronés. Le délai entre le prélèvement et l'analyse est également un facteur de variation qui concerne surtout le VPM (cf paragraphe III)B). L'ensemble de ces paramètres doit donc être contrôlé avant de poursuivre les investigations.

L'étape suivante consiste à écarter les causes analytiques de diminution de la numération plaquettaire.

- Amas plaquettaires

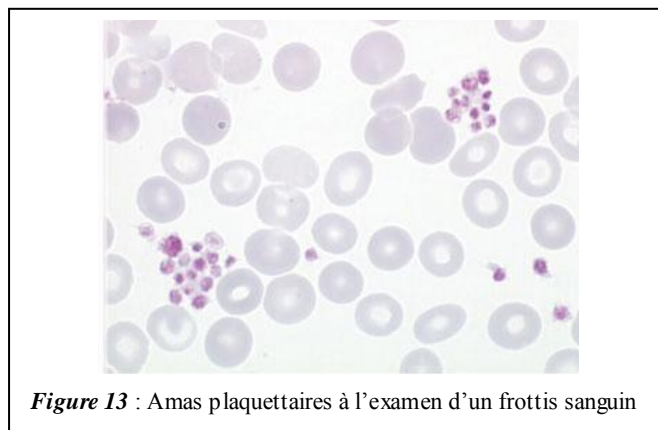
La présence d'amas plaquettaires doit être envisagée en présence d'une thrombopénie. Il s'agit d'un phénomène induit *in vitro* en présence d'EDTA. Il est transitoire ou permanent, oscillant en intensité et associé à aucune pathologie particulière. L'EDTA démasque un site cryptique du complexe moléculaire GPIIb/IIIa de la surface plaquettaire et le rend accessible à un anticorps naturel ou immun et non agglutinant (Ig G, Ig M ou Ig A) présent dans le sang d'individus sains (51). L'implication de ce complexe a été suggérée à partir de l'observation qu'un plasma contenant cet anticorps pouvait agglutiner les plaquettes d'un individu quelconque sauf une personne atteinte de la maladie de Glanzmann (52). Le titre de cet anticorps, habituellement très faible, peut provoquer chez 0,07 à 0,2 % d'individus l'agglutination des plaquettes (51). Les appareils ne comptant que les plaquettes isolées, la présence de ces amas plaquettaires peut induire une fausse thrombopénie importante.

Leur présence peut être suspectée sur l'analyse des cytogrammes rendus par les automates. Sur les automates à impédancemétrie, on recherchera un épaulement à gauche de la courbe des leucocytes et l'absence de retour à la ligne de base de la courbe volumétrique des plaquettes (figure 12).



Pour les ADVIA<sup>®</sup>, la présence d'amas plaquettaires se traduit par une image en fusée sur le cytogramme PEROX des globules blancs (18) (figure 12).

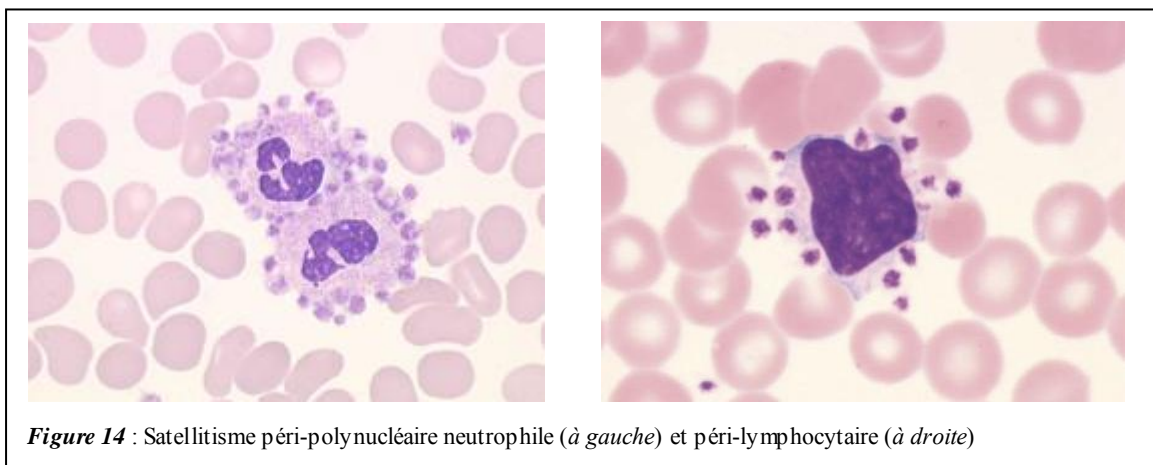
La réalisation d'un frottis sanguin coloré au MGG permet de rechercher ces amas situés plus particulièrement en queue de frottis (figure 13). Enfin, il est souhaitable de contrôler la numération plaquettaire en présence d'un autre anticoagulant comme le citrate, voire le CTAD (citrate théophylline adénosine dipyridamole) dans les cas de thromboagglutination croisée EDTA-citrate (51).



**Figure 13** : Amas plaquettaires à l'examen d'un frottis sanguin

- Phénomène de satellitisme plaquettaire

Ce phénomène rare, mis en évidence sur moins de 1 hémogramme pour 10000, est également lié à la présence d'EDTA (53). Les plaquettes se collent à la membrane externe des neutrophiles ou plus rarement d'autres cellules et ne sont pas comptées par l'automate (51). C'est la présence d'une thrombopénie, ne correspondant pas au contexte clinique, qui doit poser l'indication du frottis sanguin dont l'examen est très démonstratif (figure 14).

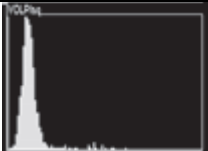
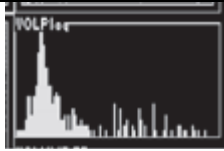
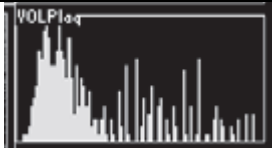
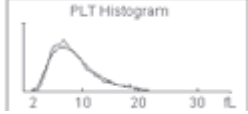
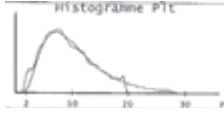
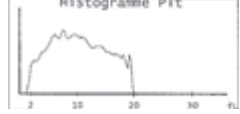
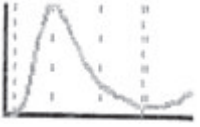
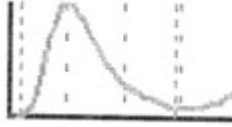
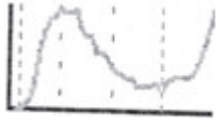
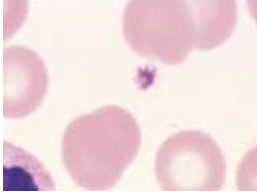

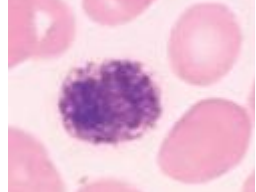


**Figure 14** : Satellitisme péri-poly nucléaire neutrophile (à gauche) et péri-lymphocytaire (à droite)

- Présence de grandes plaquettes

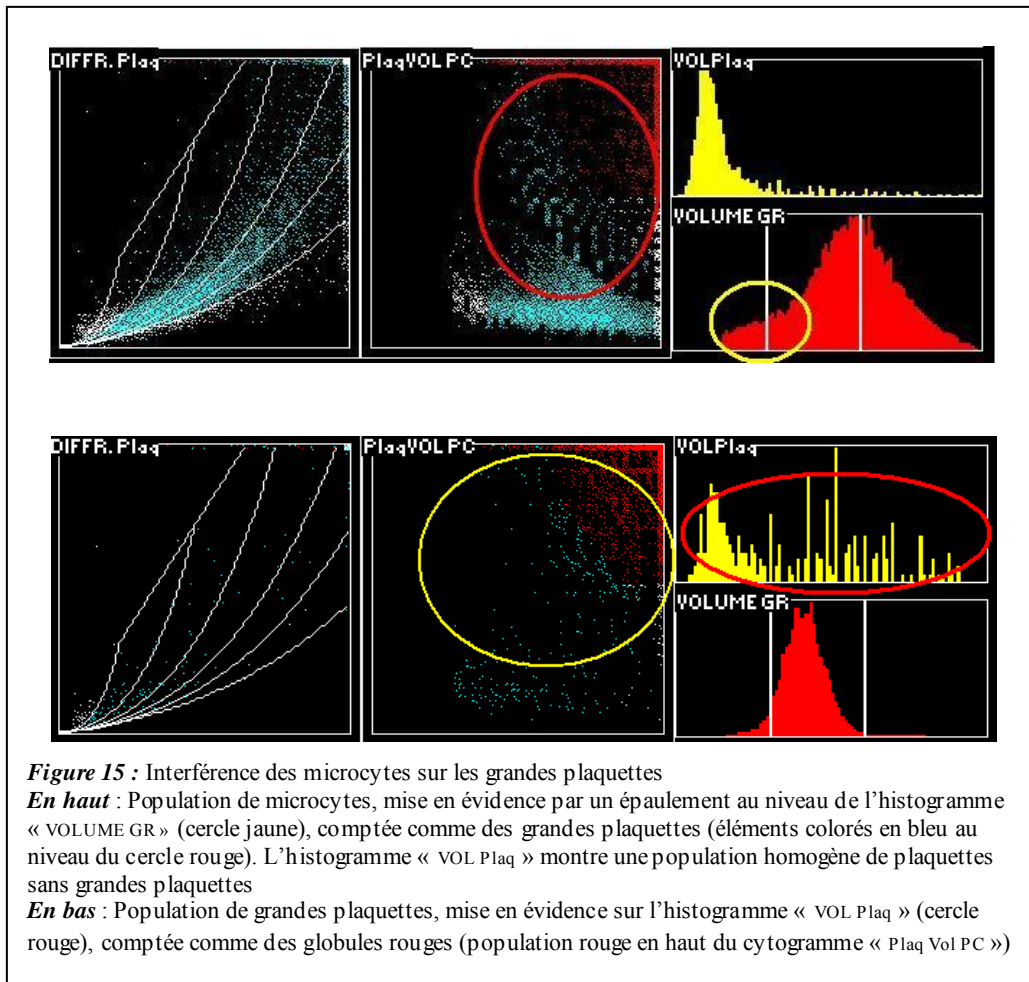
Physiologiquement et dans diverses situations pathologiques (purpura thrombopénique immunologique, syndrome myélodysplasique, thrombopénies constitutionnelles), un contingent de plaquettes présente une taille augmentée. Les automates fonctionnant par impédancemétrie peuvent compter ces grandes plaquettes comme des globules rouges et ainsi sous-estimer la numération plaquettaire. Latger-Cannard *et coll.* (2012) a montré que les hématimètres LH750<sup>®</sup> (Beckman Coulter) et Sysmex XE-2100D<sup>®</sup> ne prenaient pas en compte les grandes plaquettes de VPM respectivement supérieur à 12,0 fL et 12,4 fL (20). L'ADVIA<sup>®</sup>2120 mesurerait le VPM au-delà de 28 fL. La présence de ces grandes plaquettes est évoquée devant l'absence de retour à la ligne de base de la courbe volumétrique des plaquettes (*tableau 1*). Il est alors recommandé d'analyser la taille et la morphologie des plaquettes par un examen du frottis sanguin et de constater la présence de ces grandes plaquettes (macroplaquettes et plaquettes géantes). Latger-Cannard *et coll.* (2012) a d'ailleurs défini ces populations plaquettaires en fonction du comportement des différents automates (*tableau 1*) :

- les macroplaquettes correspondent à des grandes plaquettes qui sont reconnues par les appareils à impédance (LH750<sup>®</sup> et XE-2100D<sup>®</sup>)
- les plaquettes géantes ne sont mesurées que par l'ADVIA<sup>®</sup>2120 (20).

	Population plaquettaire normale	Population plaquettaire avec macroplaquettes	Population plaquettaire avec plaquettes géantes
ADVIA <sup>®</sup> 2120			
LH750 <sup>®</sup>			
XE-2100D <sup>®</sup>			
Morphologie plaquettaire			

**Tableau 1** : Classification des plaquettes en fonction de la courbe de distribution volumétrique et de la morphologie (20)

Si les appareils à mesure optique sont plus précis pour discriminer les grandes plaquettes des globules rouges du fait d'une mesure combinée des globules rouges et des plaquettes (cf paragraphe III)A), ils peuvent également être pris en défaut (figure 15). Dans de telles circonstances, un comptage immunologique des plaquettes par cytométrie en flux (CMF) est recommandé (54).



D'autres phénomènes peuvent interférer avec la numération plaquettaire, mais cette fois-ci en la surestimant :

- Fragments de globules rouges

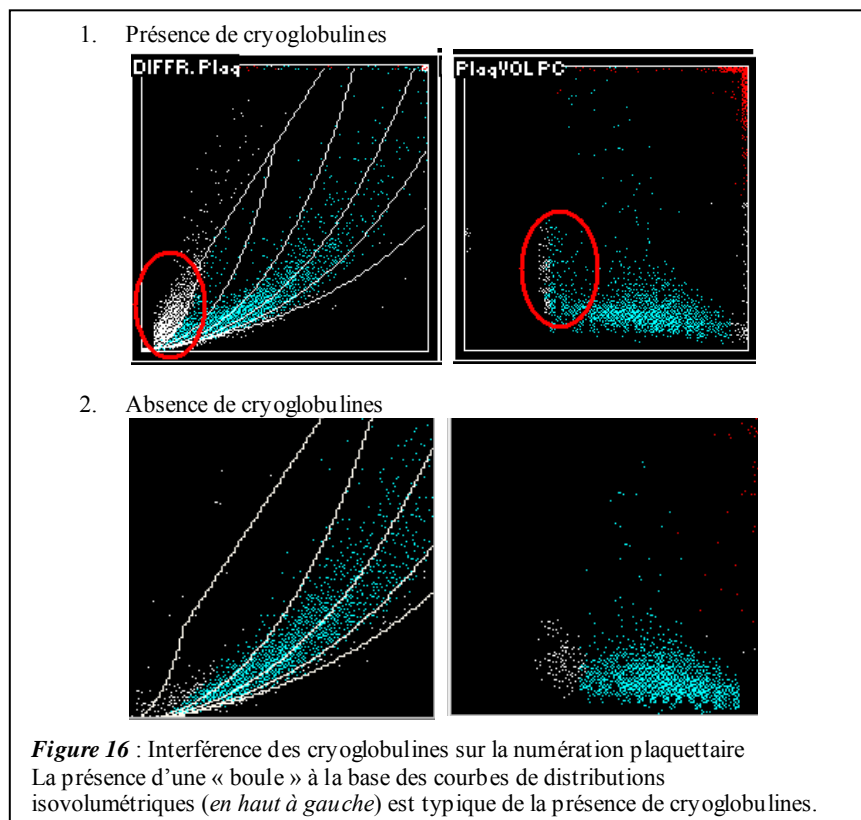
Les hématimètres fonctionnant par impédancemétrie effectuent un comptage des globules rouges et des plaquettes sur le même canal, rendu possible par une différence de taille significative. De plus, l'ajustement automatique de la courbe volumétrique plaquettaire et son extrapolation jusqu'à 60 fL permettent d'améliorer la discrimination entre les plaquettes et les globules rouges. Cependant, en présence de microcytes dont le volume se rapproche sensiblement de celui d'une plaquette ou de fragments de globules rouges (schizocytes dans



un contexte de microangiopathie thrombotique, poikilocytose majeure chez les grands brûlés), l'appareil peut compter ces éléments cellulaires comme des plaquettes. Une analyse attentive des graphiques des plaquettes et des globules rouges rendus par l'automate permet d'évoquer ces interférences. On peut observer une courbe de distribution volumétrique des plaquettes non lissée ou ne retournant pas à la ligne de base, semblable à celle observée dans un contexte de grandes plaquettes (*tableau 1*), ou une courbe de distribution des globules rouges déviée vers la gauche. De façon similaire à la problématique des grandes plaquettes, plusieurs études prouvent que les appareils à mesure optique sont plus justes que ceux fonctionnant par impédancemétrie pour différencier les microcytes des plaquettes (54,55). Mais cette technologie peut être prise à défaut, comme le montre la *figure 15*.

- Cryoglobulines

Les cryoglobulines constituent des complexes protéiques multimoléculaires solubles à 37°C mais qui précipitent à basse température. Ces cryoprécipités interfèrent avec les plaquettes ou les globules blancs, en fonction de leur taille, en les surestimant. Les automates dont le canal de mesure est chauffé (canal de comptage optique des plaquettes par fluorescence - Sysmex®) ne sont pas concernés, contrairement à ceux fonctionnant à température ambiante. La présence de ces cryoglobulines est visible au niveau de l'histogramme des plaquettes (*figure 16*) et parfois sur celui des globules blancs (cytogramme PEROX) sur les automates ADVIA®.



Elles sont également visibles à l'examen du frottis sanguin. Un repassage de l'échantillon préalablement chauffé à 37 °C permet de s'affranchir de cette interférence.

- Fragments cytoplasmiques de cellules nucléées

Au cours des leucémies aiguës (essentiellement monoblastiques) ou des lymphomes à grandes cellules très hypercytaires avec dissémination sanguine, des fragments de ces cellules anormales peuvent circuler dans le sang. De taille similaire à celle des plaquettes, ils peuvent être comptés comme telles par les automates. Bien que leur nombre soit généralement faible, ils peuvent surestimer la numération plaquettaire. La présence d'une alarme déclenchée par l'automate concernant une anomalie de distribution du volume plaquettaire ou la réalisation systématique d'un frottis sanguin dans ce contexte permet de les repérer. L'analyse attentive du frottis permet de les différencier des plaquettes par un cytoplasme plus basophile (53).

- Lipides

La présence de chylomicrons dans le sang d'individus en postprandial peut perturber la numération plaquettaire, mais aussi la numération des globules rouges, des globules blancs et le dosage de l'hémoglobine (Hb) (51). Les gouttelettes lipidiques formées *in vitro* peuvent effectivement être comptées comme des plaquettes. Plusieurs auteurs s'accordent à dire que cette interférence serait plus marquée sur les automates à mesure optique du fait d'un indice de réfraction élevé pouvant générer des signaux anormaux dans la zone des plaquettes ou des débris cellulaires. La présence d'intralipides est visible sur les histogrammes des plaquettes et des GB (cytogramme PEROX, ADVIA®) et déclenche une alarme alertant le technicien.

- Microorganismes

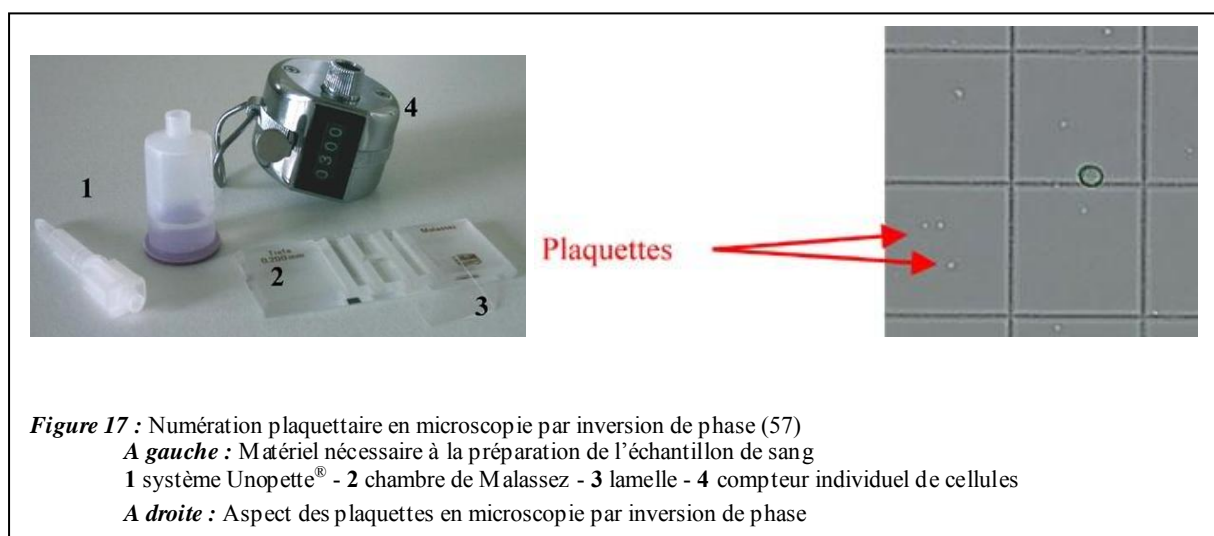
La présence de microorganismes dans le sang périphérique de patients septiques peut être à l'origine d'un faux décompte des plaquettes. Bien que ces situations soient très rares, des bactéries peuvent être comptées comme des plaquettes occasionnant une surestimation de la numération. L'histogramme volumétrique des plaquettes est anormal et montre un épaulement dans la zone des particules de petite taille (51). Cette situation peut également s'observer en l'absence de sepsis majeur mais du fait d'un développement bactérien dans le tube du fait d'un délai d'analyse trop important. Il s'agit le plus souvent d'amas de bactéries dans des contextes de septicémie gravissime. Des cas, qui restent exceptionnels, mettant en cause des levures ont également été rapportés (51) ainsi qu'un cas de paludisme dont les microcytes infestés par les trophozoïtes de *Plasmodium falciparum* ont été faussement comptés comme des plaquettes (51).

Pour conclure sur les interférences de la numération plaquettaire et la démarche à adopter face à une thrombopénie, la réalisation d'un frottis sanguin est un complément indispensable à la validation de la phase préanalytique et à une analyse attentive des divers graphes rendus par l'automate. Il permet de rechercher des amas plaquettaires situés plus particulièrement en queue de frottis, un phénomène de satellitisme plaquettaire ou des cryoglobulines. Il permet également d'apprécier la morphologie et la taille des plaquettes et d'analyser les éléments leucocytaires (présence d'inclusions) et érythrocytaires (schizocytes, microcytes).

### **b) Microscopie en inversion de phase**

En 1953, une technique manuelle de comptage des plaquettes par microscopie à contraste de phase a été mise au point utilisant un hématimètre avec quadrillage de Neubauer (56). Selon le même principe a été développée la numération plaquettaire en chambre de Malassez après dilution à l'aide du système Unopette® (Becton Dickinson). Il s'agit d'un dispositif à usage unique permettant une dilution fiable des plaquettes dans un volume de sang connu et une lyse des globules rouges (57).

En contraste de phase, les plaquettes sont des éléments réfringents qui apparaissent discoïdes (*figure 17*). Elles peuvent émettre des prolongements et s'étaler après contact avec le verre (26). Cette méthode, effectuée à partir de sang capillaire ou veineux prélevé sur EDTA, a longtemps été considérée comme la méthode de référence pour le comptage des plaquettes, même après le développement des automates (58). Elle tenait tout son intérêt lorsque le décompte automatisé des plaquettes était incorrect et présentait l'avantage d'être simple et peu coûteuse.

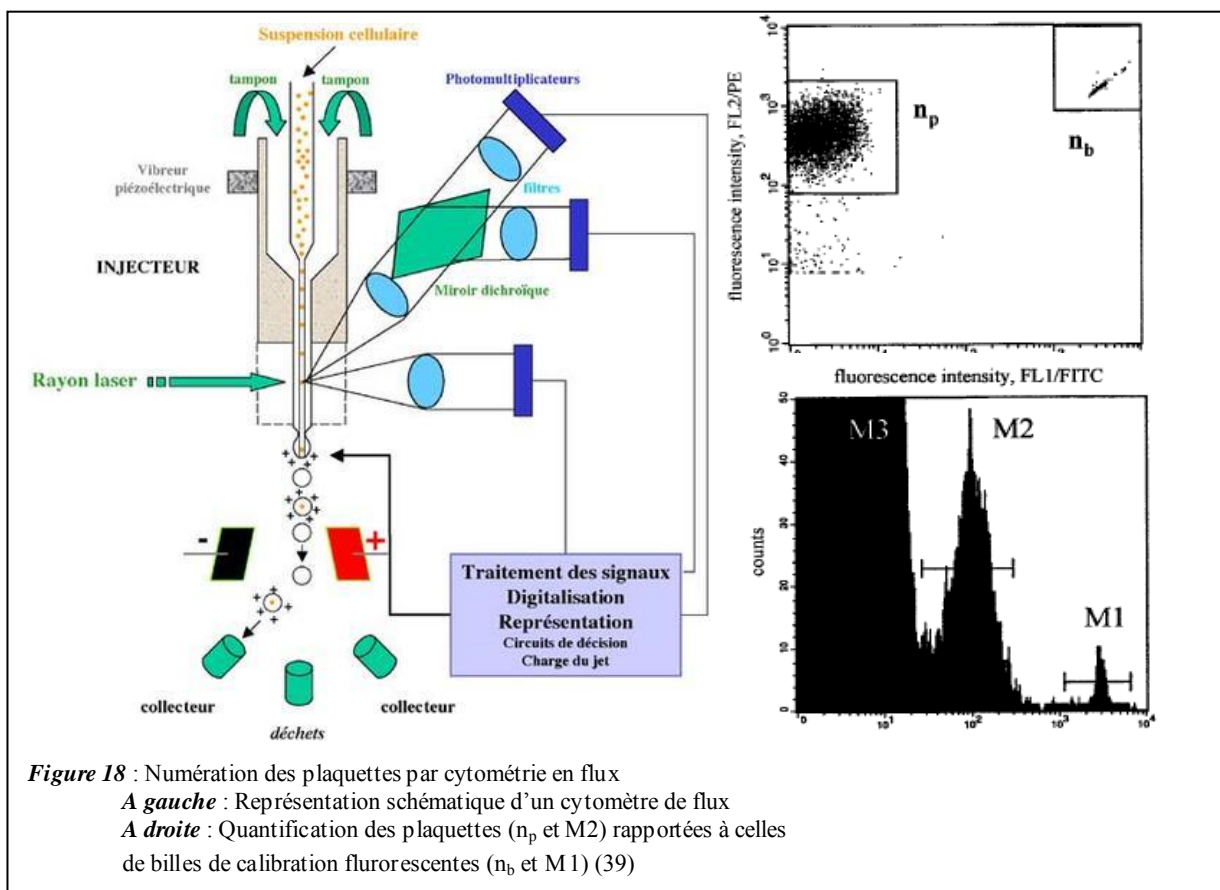


Cependant, la numération manuelle des plaquettes présente de nombreuses limites : sa mise en œuvre est longue, elle nécessite un certain apprentissage (les plaquettes peuvent être

confondues avec des débris cellulaires) et reste peu reproductible avec un coefficient de variation interindividuelle compris entre 10 et 25 % (55). Elle tend désormais à être remplacée par des méthodes immunologiques lorsque les hématimètres sont pris en défaut.

### c) Cytométrie en flux

La CMF est une technique couramment utilisée pour l'étude de populations cellulaires hétérogènes. Elle permet de détecter et quantifier des cellules particulières identifiées par des marqueurs antigéniques spécifiques. Selon un principe d'hydrofocalisation dynamique, les cellules se présentent une à une devant un faisceau laser (figure 18). La lumière déviée selon un grand angle et selon un petit angle, respectivement proportionnelle au contenu et à la taille des cellules, est mesurée. Cette analyse bi-dimensionnelle est couplée à la mesure d'intensité de fluorescence émise par des anticorps couplés à un fluorochrome qui reconnaissent les marqueurs antigéniques spécifiques. L'ensemble de ces mesures permet de reconnaître un type cellulaire ou une fonctionnalité cellulaire particulière.



Classiquement, les mesures d'intensité de fluorescence déterminées par cytométrie de flux sont établies de façon relative (unités arbitraires de fluorescence). L'utilisation de billes de calibration fluorescentes, apportées au milieu réactionnel à un volume équivalent de celui de

l'échantillon à tester et de concentration connue, permet de quantifier les populations cellulaires identifiées.

Au début des années 1990, des anticorps reconnaissant spécifiquement les antigènes de surface plaquettaire CD 41 et CD 61 marqués à un fluorochrome ont été développés (59). Ces mêmes anticorps monoclonaux ont ensuite été utilisés par l'équipe de Dickerdorf qui proposa une méthode de quantification basée sur un ratio de fluorescence entre les plaquettes et des billes fluorescentes (60). Ces deux travaux ont initiés la création d'une étude internationale multicentrique sous l'égide de l'ISLH (International Society of Laboratory Haematology) explorant la possibilité de développer une procédure de référence de numération plaquettaire utilisant ces marqueurs (61). Cette étude a abouti à la publication d'une méthode de référence qui quantifie les plaquettes en faisant un rapport entre les événements marqués et les hématies (62).

Kunz *et coll.* (2000) a proposé une quantification des plaquettes en les rapportant à une quantité connue de billes mises dans le tube (*figure 18*) (39). En utilisant des anticorps monoclonaux anti CD 41a, CD 42a et CD 61 marqués par un fluorochrome, il a démontré qu'un marquage du CD 41a permettait de mieux cibler la population plaquettaire. Il a par ailleurs démontré l'excellente linéarité de sa méthode avec une limite de détection à 0,24 G/L et une limite basse de quantification à 1,1 G/L.

Les méthodes immunologiques ne sont pas développées dans tous les laboratoires. Seules les structures spécialisées ont la capacité de les utiliser. Néanmoins, la nécessité d'une numération plaquettaire précise pour décider d'une transfusion et les limites reconnues des automates pour des taux de plaquettes bas rendent compte de l'intérêt de la CMF et de l'importance de l'avoir à disposition.

## **2. Analyse fonctionnelle**

Les plaquettes jouent un rôle pivot dans l'hémostase primaire nécessitant l'intégralité de leurs diverses fonctions. L'existence d'anomalies quantitatives ou fonctionnelles des plaquettes, qu'elles soient constitutionnelles ou acquises, expose donc à un risque de manifestations hémorragiques qu'il est important d'identifier. A l'inverse, une augmentation marquée de la réactivité plaquettaire peut être responsable de manifestations thrombotiques contre lesquelles les antiagrégants plaquettaires sont bénéfiques en prévention primaire et secondaire (63).

L'exploration des fonctions plaquettaires peut avoir plusieurs objectifs en pratique clinique (64) :

- Identifier une thrombopathie constitutionnelle ou acquise à l'origine de saignements anormaux
- Assurer le suivi biologique d'un traitement anticoagulant en cas d'échec thérapeutique ou avant un acte chirurgical
- Rechercher une hypersensibilité plaquettaire chez des malades à risque de thrombose

Les anomalies fonctionnelles plaquettaires sont relativement difficiles à diagnostiquer du fait d'une variété importante d'anomalies possibles. Plusieurs tests sont disponibles dont les tests photométriques d'agrégation plaquettaire et la CMF. Ils nécessitent d'être effectués par des centres expérimentés ayant une activité suffisante pour entretenir leur compétence. Le temps de saignement tend à être abandonné.

De façon similaire à l'hémogramme, le respect des conditions pré-analytiques (prélèvement non traumatique, tube citraté bien rempli) est fondamental d'autant plus que la moindre amorce d'activation plaquettaire induit un biais dans les résultats (63).

### **a) Tests globaux**

#### (1) Temps de saignement

Développé par Duke en 1910, le temps de saignement (TS) fût le premier test fonctionnel plaquettaire développé permettant une exploration globale *in vivo* de l'hémostase primaire. Il correspond au temps d'arrêt du saignement après une incision de la peau. Deux méthodes ont coexisté : le TS au lobe de l'oreille (test de Duke) et le TS à l'avant-bras (test d'IVY par incision horizontale). Un TS normal est compris entre 2 et 10 minutes. Le TS est influencé par de nombreux facteurs dont l'opérateur, l'âge et la température de la peau. Bien que le test d'IVY semble mieux maîtriser certains facteurs de variation du fait de conditions plus standardisées (test réalisé à pression constante avec un sphygmomanomètre), aucune méthode n'est reproductible et n'a des performances diagnostiques et pronostiques démontrées (64). Le TS est resté pendant longtemps le test de première ligne recommandé en cas de suspicion de thrombopathie. Bien qu'il soit toujours inscrit à la nomenclature des actes de biologie médicale, les dernières recommandations de la Haute Autorité de Santé (HAS) le décrivent comme « un acte obsolète à ne plus réaliser en pratique courante » (65). L'attention doit surtout être portée par le clinicien sur une éventuelle anamnèse de manifestations hémorragiques ou familiales (64).

## (2) Temps d'occlusion plaquettaire (PFA-100® Dade-Behring)

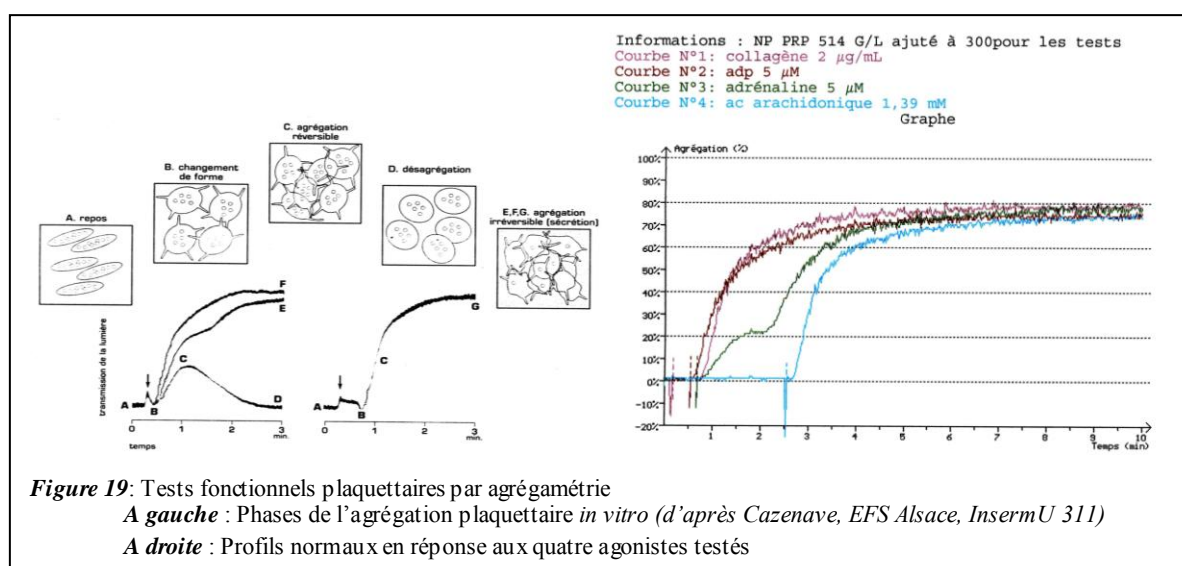
Le PFA-100® est un automate permettant de reconstituer *in vitro* le processus plaquettaire de l'hémostase primaire. L'appareil est composé de deux parties, une partie mécanique et une partie biologique où a lieu la réaction. La partie mécanique contient une pompe à vide permettant d'aspirer l'échantillon de sang sous une pression constante négative vers la cartouche-test unitaire. Cette partie comporte le réservoir de l'échantillon où 800 µL de sang total citraté sont déposés, un microcapillaire de 200 µm de diamètre et une membrane de nitrocellulose percée d'un micro-orifice central de 150 µm. La membrane est recouverte d'agents pro-agrégants plaquettaires, soit collagène/adrénaline ou collagène/ADP. La présence de ces activateurs et le taux de cisaillement élevé par le passage des plaquettes dans le capillaire déclenchent l'adhésion puis l'activation et l'agrégation des plaquettes au niveau de l'orifice. La fonctionnalité de ces plaquettes est appréciée en fonction du temps d'occlusion complète du micro-orifice (66). Les valeurs de référence définies par le fabricant sont de 96-170 s pour collagène/adrénaline et 71-111 s pour collagène/ADP. Il est cependant recommandé que chaque laboratoire définisse ses propres valeurs de référence (63).

L'ensemble de ce dispositif permet donc de reconstituer *in vitro* et de façon standardisée les conditions rhéologiques rencontrées dans la circulation après une brèche vasculaire. Le test est sensible à plusieurs facteurs affectant la fonctionnalité plaquettaire comme des anomalies des glycoprotéines de surface, du vWF ou encore des granules plaquettaires. Son intérêt majeur réside surtout pour détecter un déficit en vWF (allongement du temps d'occlusion collagène/ADP) ou une prise d'aspirine (allongement du temps d'occlusion collagène/adrénaline) qui sont les causes les plus fréquentes d'altération de l'hémostase primaire (66). Harrison (2005) le propose comme test de screening dans le dépistage d'une thrombopathie, et plus particulièrement dans la maladie de Willebrand, du fait de sa haute valeur prédictive négative (63). De plus, le PFA-100® se caractérise par une simplicité d'utilisation, une rapidité d'exécution, la possibilité de travailler sur un faible volume sanguin et l'absence de préparation de l'échantillon.

Il présente, cependant, quelques limites. Des anomalies minimales de la fonction sécrétoire plaquettaire observées, par exemple, dans un contexte de syndrome myélodysplasique peuvent échapper au dépistage ainsi que les anomalies des grains denses, la maladie de Willebrand de type I ou encore la thrombopathie Québec (63). Et le test ne peut être interprété lorsque l'hématocrite, l'hémoglobine ou la numération plaquettaire sont respectivement inférieures à 25 %, 6 g/dL et 70 G/L.

### **b) Test fonctionnel plaquettaire par agrégamétrie** (figure 19)

Développée dans les années 1960, l'agrégamétrie est rapidement devenue le gold standard en matière de test fonctionnel plaquettaire (63). Il s'agit d'un test photométrique qui estime par turbidimétrie l'agrégation plaquettaire en enregistrant de manière continue la transmission d'un faisceau de lumière à travers un plasma riche en plaquettes (PRP) soumis à une agitation et à une température de 37 °C. Le regroupement des petits agrégats en agrégats de plus grande taille s'accompagne d'un éclaircissement progressif de la suspension plaquettaire. Ce terme d'agrégation désigne un processus actif au terme duquel la liaison du fibrinogène au complexe GPIIb/IIIa, en présence de calcium, permet le contact prolongé de plusieurs plaquettes entrant en collision sous l'effet de l'agitation (64). Cette agrégation survient secondairement à l'ajout dans le milieu d'un activateur. La technique s'effectue sur un appareil dédié, le thromboagrégamètre.



Le test s'effectue sur un plasma riche en plaquettes (PRP) recueilli dans un tube contenant du citrate de sodium comme anticoagulant (0,109 M) après simple centrifugation. Après étalonnage de l'appareil avec un PPP (plasma pauvre en plaquettes) et un PRP définissant respectivement le 100 % d'agrégation (maximum de transmission lumineuse) et le 0 % d'agrégation (minimum de transmission lumineuse), un activateur de l'agrégation plaquettaire est ajouté à chacun des tubes contenant déjà le PRP. Les molécules habituellement testées sont les suivantes : collagène (2 et 10 µg/mL), ADP (5 et 10 µM), adrénaline, acide arachidonique, ristocétine. L'ajout de cet activateur déclenche la réaction qui va être enregistrée pendant dix minutes. Au terme de l'enregistrement, on obtient une courbe d'agrégation (figure 19) dont les paramètres étudiés sont l'allure générale, le temps de latence



avant l'apparition de la sigmoïde et la variation maximale de transmission lumineuse. Un PRP normal montre avec chaque inducteur une courbe d'agrégation d'amplitude supérieure à 60 % sans phénomène de désagrégation.

Chaque agoniste testé permet d'explorer une phase de l'activation plaquettaire. La stimulation par l'ADP permet d'explorer la fonctionnalité de ses récepteurs ainsi que la sécrétion des granules denses. Le collagène permet également d'explorer la fonctionnalité de ses récepteurs. De plus, en mobilisant le TXA<sub>2</sub> et en induisant la sécrétion des grains denses, il explore également ces voies d'amplification. L'agrégation déclenchée par l'acide arachidonique permet d'évaluer la réponse à un traitement inhibiteur de la COX-1 comme l'aspirine et explore la voie d'amplification du TXA<sub>2</sub>. (64). Les tests d'agrégation plaquettaire sont également indiqués dans le diagnostic de la maladie de Willebrand en utilisant comme activateur la ristocétine qui permet la fixation de vWF à la GPIb plaquettaire.

L'agrégamétrie présente certaines limites comme l'absence de standardisation, le temps d'analyse (environ deux heures), la difficulté à mettre en œuvre ces tests en cas de thrombopénie inférieure à 100 G/L ou de plaquettes très dystrophiques. De plus, divers facteurs influencent la qualité de ces tests comme la préparation des plaquettes, la précision des pipetages, la propreté des cuvettes de lecture, l'agitation et le réglage de l'appareil qui compliquent parfois l'interprétation des résultats (64).

### ***c) Cytométrie en flux***

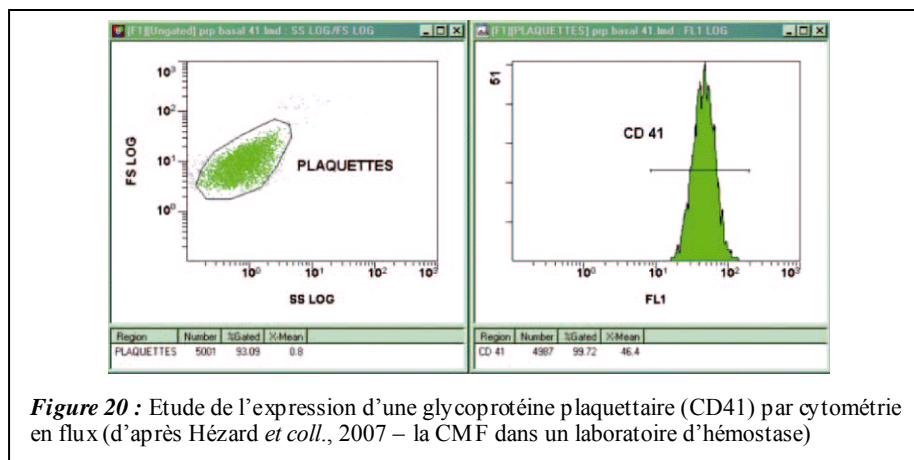
Outre la numération des plaquettes, la CMF permet également d'explorer leur fonctionnalité.

#### **(1) Quantification des GP plaquettaires membranaires et analyse fonctionnelle des granules $\alpha$**

L'utilisation d'anticorps anti-glycoprotéines plaquettaires est un outil d'évaluation de l'expression et de quantification de ces glycoprotéines (63). Elle permet, entre autre, de diagnostiquer une maladie de Glanzmann (anticorps anti-CD 41a/GPIIbIIIa) ou une maladie de Bernard-Soulier (anticorps anti-CD 42b/GPIb $\alpha$  ou anti-CD 42a/GPIX) (*figure 20*). Cette expression basale peut être comparée à celle après stimulation par le TRAP (Thrombin Receptor Agonist Peptide). Ce peptide synthétique explore l'activation plaquettaire sans provoquer la coagulation, via son récepteur à sept passages transmembranaires de la thrombine, en déclenchant la sécrétion des granules  $\alpha$ . Le CD 62P (P-sélectine ou GMP140) est une glycoprotéine de la membrane des granules  $\alpha$ . Durant l'activation plaquettaire et la dégranulation, il est redistribué à la surface membranaire. L'étude de son expression en CMF

permet d'explorer une anomalie des granules  $\alpha$  et également d'objectiver une activation des plaquettes, notamment dans des produits de transfusion plaquettaire (67).

Les résultats de CMF doivent être interprétés avec précaution. L'appareil mesure la fluorescence émise par une cellule qui est rapportée sous forme de moyenne. Une grande plaquette présente en toute logique plus de glycoprotéines de surface qu'une plaquette de taille normale. La valeur absolue de fluorescence peut être tout à fait normale dans une macrothrombopénie bien que la densité antigénique correspondante soit diminuée. L'expression de l'antigène d'intérêt doit donc être rapportée à celle d'une autre glycoprotéine d'expression non altérée (68).

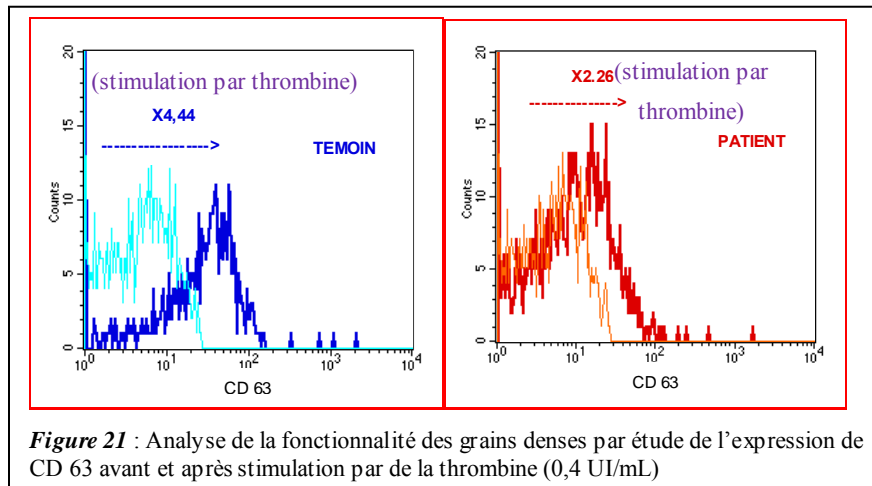


## (2) Analyse fonctionnelle des grains denses

La CMF permet également d'explorer une anomalie des grains denses par le test à la mépacrine. La mépacrine est un composé fluorescent (longueur d'onde d'émission = 488 nm) dérivé de la quinacrine ayant une forte affinité pour l'ADP et l'ATP. Elle lui permet de s'accumuler de façon rapide et sélective dans les granules denses. Après ajout de la mépacrine au milieu réactionnel contenant un PRP prélevé sur tube citraté, deux phases se succèdent. La phase de capture de la mépacrine a lieu pendant l'incubation du composé avec les plaquettes au repos qui vont l'internaliser dans les granules denses et devenir fluorescentes. La phase de sécrétion correspond au relargage de la mépacrine dans le milieu extracellulaire par les plaquettes activées par du TRAP. Cette phase se traduit par une diminution de leur fluorescence.

L'analyse de l'expression de CD 63, glycoprotéine présente dans la membrane des granules denses et des lysosomes, est également un test d'exploration des granules denses (*figure 21*). Les plaquettes activées par du TRAP sécrètent leurs granules denses dont la membrane vient s'accoler à la membrane plasmique. Il en résulte une augmentation de l'expression de CD 63 révélée par une augmentation de la fluorescence (69).

L'exploration de l'émission de microparticules s'effectue également en CMF par immunomarquage de l'annexine V. Elle utilise la capacité de cette protéine à se fixer à la phosphatidylsérine exprimée à la surface des microparticules.

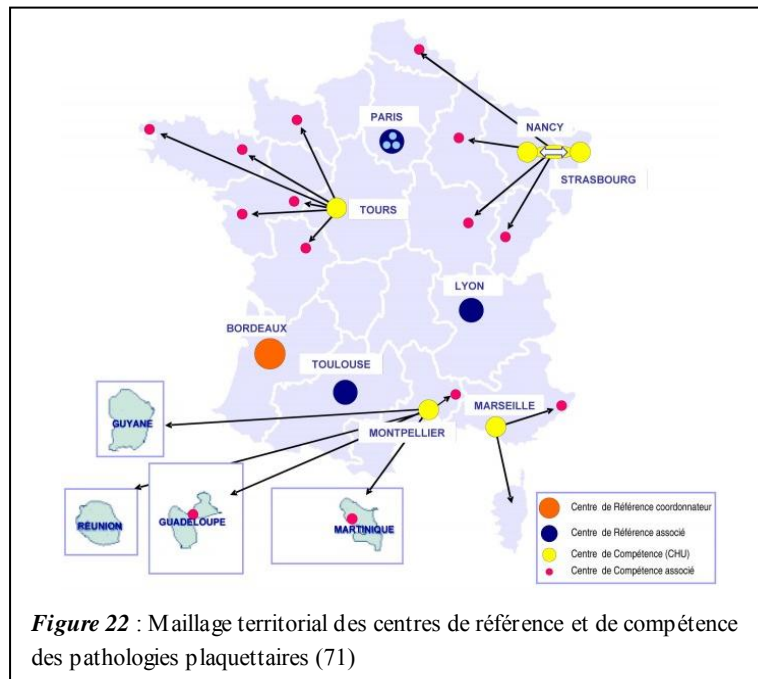


De nombreuses autres techniques peuvent être mises en œuvre pour explorer la fonctionnalité des plaquettes. L'immunoblot, par exemple, est plus adapté pour explorer les molécules intracellulaires que la CMF. En plus d'anomalies quantitatives, cette technique peut révéler d'autres anomalies protéiques comme la production d'une protéine tronquée ou des altérations post-traductionnelles (68). Le diagnostic moléculaire par recherche d'une mutation est intéressant pour les maladies où un gène a été identifié. Ces analyses génétiques, actuellement en plein essor, permettent d'établir un diagnostic, d'identifier des porteurs asymptomatiques et sont indiquées dans le diagnostic prénatal (68). Enfin, on peut mentionner dans le cadre du diagnostic étiologique d'une thrombopénie la mesure de la durée de vie plaquettaire et également la recherche d'anticorps anti-plaquettes par immunocapture (technique MAIPA-mono-clonal antibody specific immunization platelet antigen) dont les inconvénients majeurs sont l'utilisation de marqueur radioactif pour la durée de vie plaquettaire et la lourdeur technique pour la technique MAIPA.

## II. Thrombopénies constitutionnelles

Les anomalies constitutionnelles plaquettaires constituent un ensemble de maladies rares dont la prévalence reste mal connue. Selon le Centre de Référence des Pathologies Plaquettaires (CRPP), 4000 personnes seraient atteintes de pathologies plaquettaires constitutionnelles en France. Ce centre, labellisé en 2005 par le ministère de la santé et des solidarités dans le cadre du plan national des pathologies rares, a pour but la mise en place d'une filière de soins visant

à améliorer la prise en charge des patients atteints, la standardisation de tests d'études des fonctions plaquettaires, le développement de nouveaux outils diagnostiques performants et de travaux de recherche dans le domaine de ces maladies (70).



**Figure 22** : Maillage territorial des centres de référence et de compétence des pathologies plaquettaires (71)

Il a été constitué de 2005 à 2012 par l'association de six Centres Hospitaliers Universitaires (CHU de Lyon, CHU de Toulouse, CHU APHP Paris : hôpitaux Bicêtre, Armand- Trousseau et Robert- Debré) et le CHU de Bordeaux qui assure la coordination nationale. En 2007, dans le but d'étendre le maillage des centres nationaux de référence des maladies rares, le ministère de la santé a retenu quatre autres CHU comme centre de compétence : CHU Nancy (région Grand Nord-Est), CHU Tours (région Grand-Ouest), CHU Montpellier (Région Languedoc-Roussillon / Outre-Mer) et CHU Marseille (région PACA / Corse) (site officiel : *maladies-plaquettes.org*) (71) (figure 22).

Les anomalies constitutionnelles plaquettaires correspondent à des déficits quantitatifs et/ou fonctionnels des plaquettes résultant de mutations génétiques. Du fait de leur faible prévalence et de leurs étiologies multiples, le diagnostic reste difficile à établir. Malgré cela, il doit être systématiquement évoqué en cas de thrombopénie chronique ou d'un syndrome hémorragique afin d'éviter l'instauration de traitements inefficaces et iatrogènes. Le syndrome hémorragique se manifeste généralement par un purpura pétéchial, des saignements cutanéomuqueux (gingivorragies, épistaxis, ménorragies) lorsque la numération plaquettaire est inférieure à 50 G/L. Des hémorragies plus graves (bulles hémorragiques intra-buccales, hémorragies rétinienne, digestives, intracrâniennes, intra-alvéolaires) surviennent pour une

numération plaquettaire inférieure à 20 G/L ou en cas de thrombopathie associée. L'hémarthrose, caractéristique d'une anomalie de la coagulation, est très rarement décrite dans les troubles de l'hémostase primaire. En l'absence de thrombopathie associée, un chiffre de plaquettes modérément abaissé (entre 80 et 150 G/L) n'entraîne aucun risque hémorragique même après traumatisme ou acte chirurgical (72).

Plusieurs éléments sont évocateurs d'une thrombopénie constitutionnelle. Des antécédents familiaux de thrombopénie ou de manifestations hémorragiques ou une consanguinité doivent alerter sur l'origine constitutionnelle, même si l'absence de contexte familial ne doit pas l'exclure du fait de certaines transmissions récessives ou de cas sporadiques. Des anomalies extra-hématologiques, morphologiques ou fonctionnelles (syndrome dysmorphique, anomalies osseuses) orientent également vers une thrombopénie associée à une forme syndromique, en sachant que certaines malformations peuvent apparaître plus tardivement (infections à répétition, troubles auditifs, ophtalmologiques, rénaux). Un syndrome hémorragique plus sévère que ne le laisserait prévoir le nombre de plaquettes doit faire rechercher une thrombopathie associée (73). La notion de chronicité ou l'absence de réponse après traitement par corticoïdes ou immunoglobulines alors que la transfusion plaquettaire s'est révélée efficace doivent conduire à une réévaluation du diagnostic. Enfin, la mise en évidence d'inclusions intraleucocytaires basophiles, d'un granule  $\alpha$  géant ou de plaquettes dégranulées à l'occasion d'un examen attentif du frottis sanguin doit également faire évoquer un contexte de thrombopénie constitutionnelle (18).

Drachman (2004) a élaboré un questionnaire permettant d'orienter la démarche diagnostique face à une thrombopénie (74) (tableau II) :

Histoire de la maladie hémorragique et/ou de la thrombopénie	Thrombopénie acquise	Thrombopénie constitutionnelle
Date de survenue de la symptomatologie hémorragique (pétéchies, ecchymoses) ?	Récente	Depuis la naissance
Survenue de symptômes associés ? Prise de nouveaux médicaments ?	Oui	Non
Survenue de saignements excessifs à la naissance, après un traumatisme mineur ? Ménorragies ?	Non	Oui
Présence d'autres membres de la famille atteints de thrombopénie et/ou de syndrome hémorragique ?	Non	Oui
Numération plaquettaire normale auparavant ?	Oui	Non
Type de réponse aux traitements habituels de thrombopénie présumée auto-immune (corticoïdes, immunoglobulines, splénectomie) ?	Augmentation des plaquettes (d'environ 80 %)	Pas ou peu de réponse
Rendement après transfusions plaquettares ?	Faible	Bon

Tableau II : Principaux éléments de la démarche diagnostique d'une thrombopénie (74)

La difficulté du diagnostic est illustrée par deux études rétrospectives réalisées sur 117 patients diagnostiqués d'un Purpura Thrombopénique Immunologique (PTI). Treize d'entre eux, traités par corticoïdes, immunoglobulines intraveineuses ou splénectomisés, étaient en réalité atteints d'une thrombopénie constitutionnelle (75,76). La présence de plaquettes géantes, d'inclusions intraleucocytaires, d'échecs thérapeutiques ou un contexte familial évocateur ont permis de réévaluer le diagnostic initial et de conclure à une thrombopénie constitutionnelle. Noris *et coll.* (2009) a effectué une revue de la littérature sur ces cas de diagnostics erronés (77). Entre 1999 et 2009, 50 patients présentant, pour la plupart, une maladie de Bernard-Soulier ou un syndrome MYH9 ont été traités au départ pour un PTI. Trente-quatre d'entre eux ont été splénectomisés.

### **A. Classification des thrombopénies constitutionnelles**

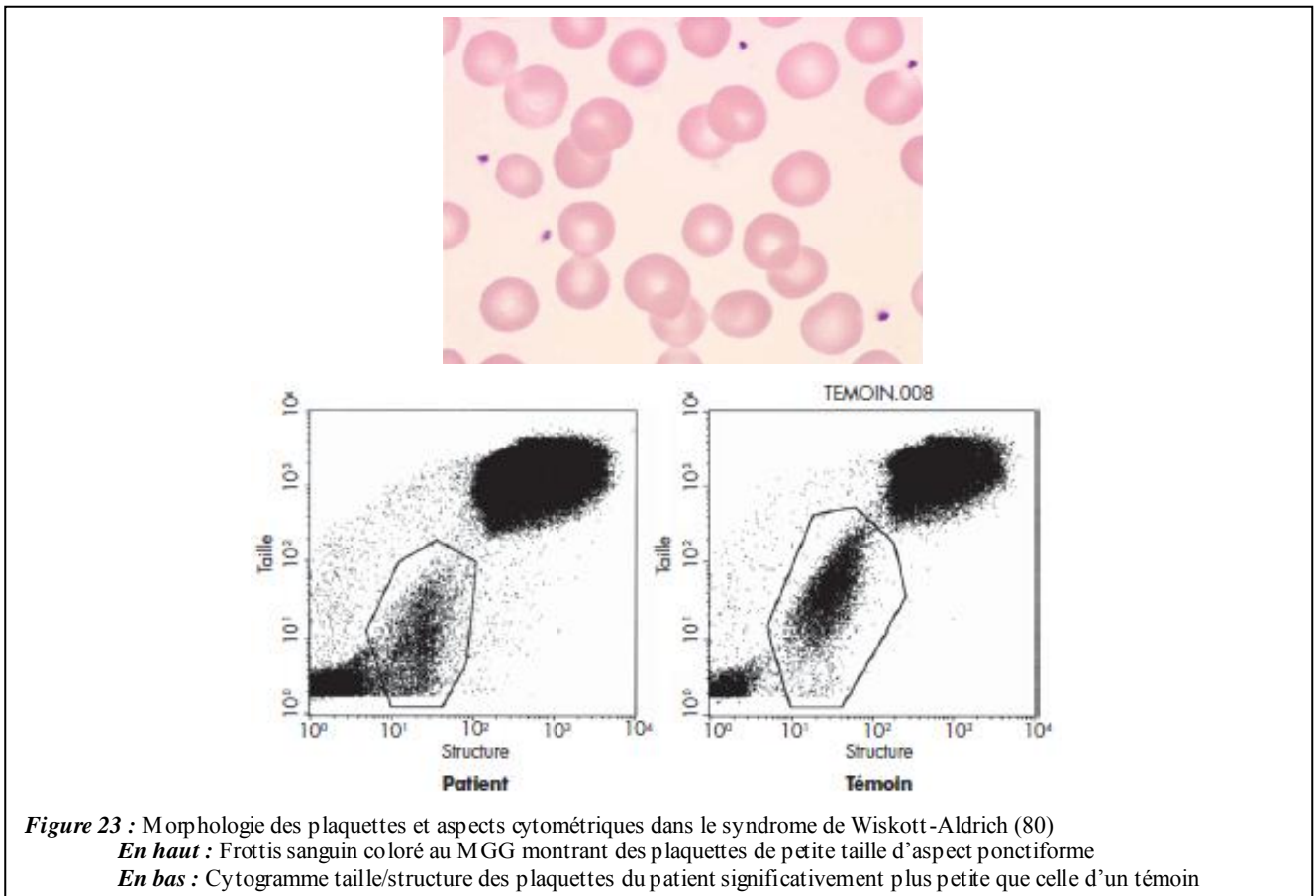
Les anomalies constitutionnelles plaquettaires représentent un ensemble très hétérogène de pathologies pour lesquelles différents critères de classification sont proposés : l'existence d'anomalies extra-hématologiques (73), le mode de transmission, la fonction plaquettaire défaillante, l'anomalie moléculaire identifiée (78) ou encore la taille plaquettaire définie par le volume plaquettaire moyen (68). Nous présenterons l'essentiel de ces pathologies selon la taille des plaquettes. Certaines thrombopathies sans thrombopénie associée seront présentées à part. Au-delà de toutes ces entités décrites, il reste à savoir que 40 % des patients présentant une thrombopénie héréditaire n'ont pas de diagnostic bien établi car leur pathologie n'a encore jamais été décrite (79).

#### **1. Thrombopénies constitutionnelles avec plaquettes de petite taille**

##### ***a) Syndrome de Wiskott-Aldrich***

Le syndrome de Wiskott-Aldrich (WAS) est une maladie rare de transmission récessive liée à l'X (1 /250000) (80). Il se caractérise par la présence d'une thrombopénie sévère quasi constante au diagnostic (90 % des cas) associée à des plaquettes de petite taille, un eczéma et un déficit immunitaire. Cette thrombopénie est souvent responsable de manifestations hémorragiques dès les premières semaines de vie lesquelles étaient responsables de 20-30 % de mortalité avant le recours à la greffe de moelle (81). Les conductrices sont généralement asymptomatiques, sans anomalies hématologique et immunologique. La difficulté diagnostique est liée à la découverte précoce de la thrombopénie dont les étiologies acquises sont nombreuses à cette période de la vie (syndrome infectieux, allo-immunisation fœto-maternelle, passage passif d'auto anticorps maternels). De plus, les manifestations cutanées et

celles liées au déficit immunitaire peuvent être absentes lors du bilan étiologique de la thrombopénie (82). Enfin, la numération plaquettaire basse (oscillant généralement entre 5-50 G/L) et la morphologie microcytaire (VPM inférieur à 7 fL) rendent difficile le comptage par les hématimètres (80). Cette difficulté est illustrée par les divergences dans les résultats obtenus par différents appareils d'hématimétrie (80). Ochs *et coll.* (1980) rapporte un VPM inférieur à 5 fL mesuré par impédancemétrie (83). Dans cette situation, il convient d'être attentif à la courbe de distribution volumétrique des plaquettes qui est déplacée vers la gauche traduisant la microcytose plaquettaire et à l'examen morphologique des plaquettes colorées au MGG. Celui-ci montre de rares plaquettes de morphologie arrondie et d'aspect punctiforme, sans anomalies des grains ni différenciation granulomère-hyalomère (80). L'examen du frottis sanguin alerte donc sur la présence d'une population homogène de microplaquettes dont la numération doit être effectuée par CMF (*figure 23*).



**Figure 23 :** Morphologie des plaquettes et aspects cytométriques dans le syndrome de Wiskott-Aldrich (80)  
**En haut :** Frottis sanguin coloré au MGG montrant des plaquettes de petite taille d'aspect punctiforme  
**En bas :** Cytogramme taille/structure des plaquettes du patient significativement plus petite que celle d'un témoin

Une thrombopathie associée de type anomalie des grains denses est mise en évidence par une diminution de la capture de la mépacrine et une diminution de l'expression de CD 63 par CMF (80).

Les multiples anomalies moléculaires responsables de ce syndrome (mutations ponctuelles, délétion, insertion) concernent le gène *WAS*, situé en Xp11.22, codant pour la protéine WASP (Wiskott-Aldrich syndrome protein), protéine intracellulaire de 502 acides aminés présente dans les plaquettes, les polynucléaires et les cellules mononucléées. Elle appartient à une famille de protéines responsable de la transduction de signaux depuis la surface cellulaire jusqu'au cytosquelette. En régulant la polymérisation de nouveaux filaments d'actine par activation de Arp 2/3 (actin related protein), WASP participe indirectement aux changements de forme de la cellule nécessaires à sa fonctionnalité, à sa mobilité et notamment à l'interaction avec des protéines de surface comme GPIb $\alpha$ . Ainsi les anomalies d'expression des GP associées à ce syndrome (diminution de la GPIb plaquettaire, du CD 43 lymphocytaire) sont le reflet d'un dysfonctionnement du cytosquelette et témoignent donc indirectement des anomalies de WASP (81).

Le bilan étiologique comporte également l'étude des sous-populations lymphocytaires. Des anomalies fonctionnelles des lymphocytes T et B sont constantes avec une absence ou une diminution d'expression de la protéine WASP dans les lymphocytes (82). Outre la biologie moléculaire, ce déficit quantitatif peut être détecté par CMF en utilisant des anticorps spécifiques sur cellules perméabilisées ou par immunoblot couplé à de l'électrophorèse qui permet également d'identifier des anomalies qualitatives (formes tronquées) (68).

Le mécanisme de la thrombopénie est discuté. D'origine central par anomalie de la mégacaryopoïèse selon Sabri *et coll.* (84), nombreux autres auteurs s'accordent à dire que des anomalies du cytosquelette plaquettaire et une déformabilité membranaire inappropriée dans les sinusoides spléniques sont responsables de la thrombopénie (85). La correction partielle de la thrombopénie après splénectomie et la durée de vie des plaquettes raccourcies sont d'ailleurs en faveur d'un mécanisme de destruction périphérique (82). La coexistence de manifestations auto-immunes aggrave très souvent cette destruction périphérique.

### ***b) Thrombopénie liée à l'X***

La thrombopénie liée à l'X ou XLT correspond à la forme exclusivement hématologique du WAS sans déficit immunitaire ni eczéma. La thrombopénie a les mêmes caractéristiques mais elle peut régresser spontanément à l'âge adulte rendant le pronostic meilleur que celui du WAS (81).

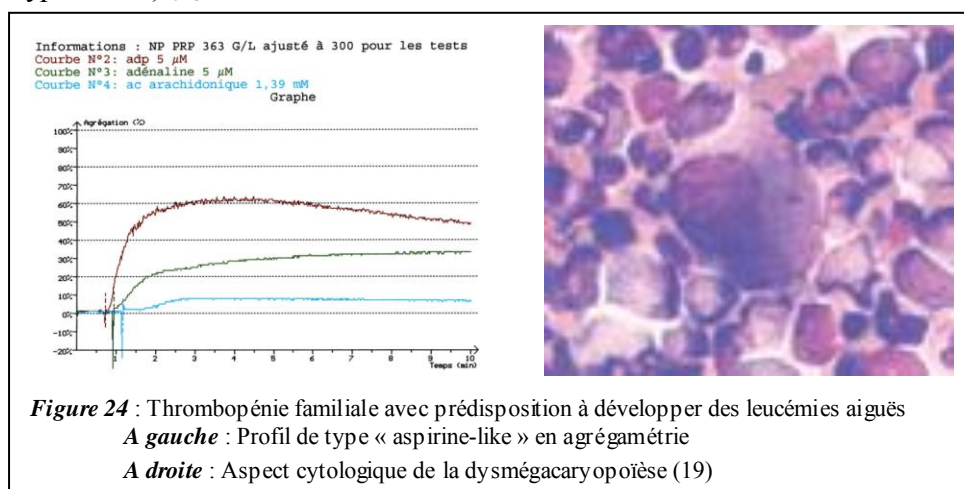


## 2. Thrombopénies constitutionnelles avec plaquettes de taille normale

### a) Thrombopénie familiale et prédisposition à développer des leucémies (FPD/AML)

L'association thrombopénie et prédisposition aux leucémies (nommée dans la littérature anglo-saxonne FPD/AML pour familial platelet disorder with predisposition to acute myelogenous leukemia) a été décrite en 1985 (86). Une vingtaine de cas familiaux ont été rapportés à travers le monde. De transmission autosomique dominante, ce syndrome se traduit par une thrombopénie et la survenue d'une leucémie aiguë dans environ 35 % des cas. La thrombopénie est isolée, modérée avec des plaquettes de VPM normal et sans anomalie morphologique et est associée à une thrombopathie de type aspirine-like (réponse anormale à l'acide arachidonique, *figure 24*) et/ou évocatrice d'une anomalie des grains denses (*cf paragraphe II)A-5-b*) (87). Les manifestations hémorragiques sont variables d'un patient à l'autre.

Sur le plan génétique, l'anomalie est liée à des mutations du gène *AML1*, encore appelé *RUNX1* ou *CBFA2*, situé sur le chromosome 21q22.12 qui code pour le facteur de transcription  $CBF\alpha$  (88). Un déficit de type haploinsuffisance ou des mutations non-sens limitent la fixation du facteur de transcription sur l'ADN et modifient l'expression des gènes codant pour la myosine II (*MYL9* et *MYH10*) (89). Il en résulte un arrêt de la maturation des MK avec expansion de la population de progéniteurs et un défaut de formation des proplaquettes dans les MK matures (21). Le myélogramme montre d'ailleurs une dysmégacaryopoïèse avec une diminution de la population mégacaryocytaire et une morphologie de MK immature (rapport nucléocytoplasmique élevé, cytoplasme très basophile et noyau hypolobulé) (*figure 24*).



Latger-Cannard *et coll.* (2011) souligne l'intérêt de réaliser un myélogramme dans les cas de thrombopénies constitutionnelles à plaquettes normales non étiquetées et d'une recherche d'une mutation de *RUNX1* si le frottis médullaire montre une dysmégacaryopoïèse (90).

### **b) Thrombopénie autosomique dominante**

Caractérisée par une numération plaquettaire variant entre 20 et 110 G/L et un VPM normal, cette thrombopénie a été décrite au départ chez deux familles, l'une italienne et l'autre américaine (91). Les manifestations cliniques sont souvent absentes. Les MK présentent de discrets signes de dysmégacaryopoïèse (MK dystrophiques, hypolobulés associés à des micromégacaryocytes) ainsi que des noyaux hypoploïdes en culture témoignant d'une maturation incomplète. Le locus chromosomique impliqué, *THC2* (thrombocytopenia 2), est situé au niveau du bras court du chromosome 10 (10p11.2-12). Deux mutations non sens ont été décrites impliquant respectivement le gène *MASTL* et *ACBD5* dans la famille américaine et dans celle italienne. Un autre gène candidat a été décrit récemment, situé également au niveau du locus *THC2*. Il s'agit du gène *ANKRD26* codant pour une protéine du cytosquelette, l'ankyrine (92). Noris *et coll.* (2011) ont mené une étude chez les neuf familles diagnostiquées avec cette mutation de *ANKRD26*. Cent-cinq individus supplémentaires ont été intégrés à cette étude, diagnostiqués par recherche systématique de la mutation dans une population présentant une thrombopénie héréditaire non étiquetée. Les auteurs décrivent des plaquettes relativement pâles à l'examen du frottis sanguin coloré au MGG lié à une diminution des grains azurophiles. Un immunomarquage fluorescent des granules  $\alpha$  via la thrombospondine confirme le déficit en ces granules. L'analyse par CMF montre une moindre expression de GPIa. La concentration de TPO est augmentée, ce qui est cohérent avec la présence de MK dysplasiques dans la moelle osseuse. Il n'y a pas de thrombopathie associée. Ils ont par ailleurs constaté un pourcentage élevé d'individus souffrant de leucémie aiguë (myéloïde ou forme indéfinie) avec une prévalence estimée à 167 individus pour 100000, ce qui est bien plus élevé que dans la population générale (3,4 à 6,6 pour 100 000) (91). Des études supplémentaires portant sur un plus grand nombre d'individus permettront de confirmer ou non cette tendance.

### **c) Amégacaryocytose congénitale**

Cette anomalie génétique est à l'origine d'une thrombopénie majeure se manifestant rapidement après la naissance par des manifestations hémorragiques parfois graves

(hémorragies intracérébrales et digestives). La thrombopénie se complique ensuite d'une aplasie médullaire responsable d'une pancytopenie. Le mode de transmission n'est pas connu mais des formes *de novo* et autosomiques récessives ont été décrites (81). Seuls une vingtaine de cas ont été diagnostiqués à travers le monde. Mais d'après Savoia *et coll.* (2007), cette incidence pourrait être sous-estimée du fait d'une présentation initiale caractérisée par une thrombopénie isolée qui peut être confondue avec une thrombopénie néonatale acquise puis une évolution en pancytopenie indistinguable d'une aplasie médullaire (93). L'absence de MK à l'examen d'un frottis médullaire est l'élément clé du diagnostic. Lorsqu'ils sont présents, ils sont rares, hypolobés et de petite taille. *In vitro*, les progéniteurs médullaires CD 34 + ne peuvent se différencier en MK (73). Ce défaut de différenciation s'explique par une anomalie du gène codant pour le récepteur de la TPO, *c-MPL*, situé sur le chromosome 1 (1p34). Par un mécanisme de rétrocontrôle, le taux de TPO est très augmenté dans le sang des patients. La survenue de la pancytopenie pourrait être liée à des taux anormalement élevés de cytokines inhibitrices de la mégacaryopoïèse (TNF- $\alpha$  et IFN- $\gamma$ ), comme observé dans l'anémie de Fanconi ou les aplasies médullaires auto-immunes (21,93). Différents types de mutations du gène *c-MPL* ont été identifiés. Celles par anomalies du cadre de lecture ou de type non-sens sont associées à un déficit complet en *c-MPL* et au développement rapide de l'aplasie médullaire. Les mutations de type faux-sens, où il existe une expression résiduelle du récepteur de la TPO, sont associées à une progression moins rapide de la maladie (94).

#### ***d) Thrombopénie et aplasie radiale (syndrome TAR)***

Le syndrome TAR est une maladie autosomique récessive rare dont l'incidence est estimée à 0,5 à 1 cas pour 500 000 naissances vivantes. La plupart des cas rapportés sont sporadiques avec de rares cas à transmission autosomique récessive (81). Il se caractérise par une thrombopénie et une aplasie radiale bilatérale avec des pouces présents. D'autres anomalies cardiaques et également squelettiques peuvent être présentes mais les mains et les doigts ne sont généralement pas affectés (21,73). La thrombopénie est généralement grave, inférieure à 50 G/L. Elle se manifeste dès la naissance par des manifestations hémorragiques et jusqu'à la première année de vie. Au-delà, la numération plaquettaire peut se normaliser spontanément. L'examen d'un frottis médullaire montre une moelle riche avec une hypoplasie ou une aplasie mégacaryocytaire. Les rares MK présents sont immatures, de petite taille avec un noyau monolobé (81). La concentration sérique de TPO est élevée et les plaquettes ne répondent pas à des recombinants de la TPO *in vivo*. Une anomalie du gène *c-MPL* a été évoquée, similairement à l'amégacaryocytose congénitale, mais un screening de ce gène n'a pas montré

de mutations. Une anomalie du signal de transduction de *c-MPL* pourrait être responsable de la thrombopénie. Une autre hypothèse concerne les gènes impliqués dans l'ontogénèse embryonnaire et également dans l'hématopoïèse comme *HOXA10* (21,81).

#### ***e) Syndrome oculo-oto-radial***

Le syndrome oculo-oto-radial ou syndrome d'IVIC (Instituto Venezolano de Investigaciones Cientificas) est une maladie rare de transmission autosomique dominante décrite initialement dans une famille vénézuélienne (95). Il associe un syndrome malformatif caractérisé par des anomalies des membres supérieurs, une surdité, une atteinte des muscles oculomoteurs externes et une thrombopénie modérée (40 à 120 G/L) présente dans plus de la moitié des cas. La mutation responsable serait située au niveau du locus *SALL4* (96).

#### ***f) Syndrome de Québec***

Décrit initialement sous le nom de facteur V Québec en raison de la diminution du taux de facteur V plaquettaire, le syndrome plaquettaire Québec est également une thrombopathie liée à une anomalie des granules  $\alpha$  comme le syndrome des plaquettes grises. De transmission autosomique dominante, il n'y a pas d'anomalies de stockage des granules mais une protéolyse de toutes les protéines contenues dans les granules  $\alpha$  par l'activateur du plasminogène de type urokinase contenu en excès (21,81). La thrombopénie est inconstante caractérisée par un VPM et une morphologie plaquettaire normale. L'agrégation plaquettaire à l'adrénaline ou l'épinéphrine est souvent nulle. Le déficit en facteur V plaquettaire, qui correspond normalement à environ 20 % des taux plasmatiques, entraîne une diminution des fonctions procoagulantes (1). Les saignements sont rarement spontanés. Ils surviennent plus volontiers secondairement à un acte chirurgical ou à un traumatisme. Il est alors important d'établir le diagnostic car le syndrome hémorragique est contrôlé par les anti-fibrinolytiques alors que les transfusions plaquettaires sont inefficaces (81).

#### ***g) Amégacaryocytose et synostose radio-cubitale (73,81)***

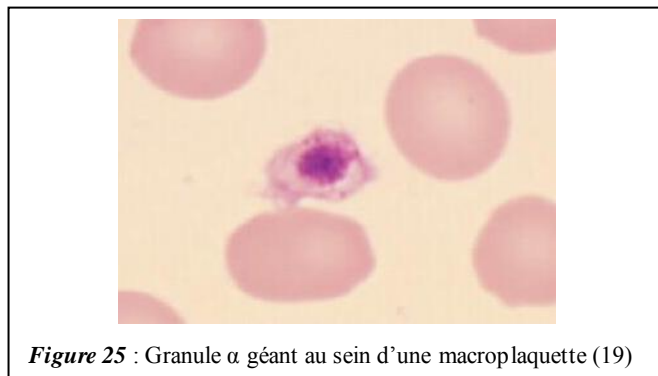
Décrite initialement en 2000 dans deux familles non apparentées, non consanguines et d'origine ethnique différente, cette association se caractérise par une limitation de la pronosupination associée à une clinodactylie, une syndactylie, une hypoplasie des hanches et des troubles auditifs de façon inconstante. La thrombopénie peut être modérée. Dans les cas les plus sévères, la thrombopénie est importante et objectivée par une amégacaryocytose à l'examen du frottis médullaire. Évoluant vers une aplasie médullaire, elle peut justifier une allogreffe de moelle osseuse. L'anomalie moléculaire retrouvée chez tous les individus

concernait le gène *HOXA11* (chromosome 7p14-15) impliqué dans la morphogénèse de l'avant bras et dans la différenciation mégacaryocytaire au stade embryonnaire.

### 3. Thrombopénies constitutionnelles avec macroplaquettes

#### a) *Thrombopénie Paris-Trousseau/syndrome de Jacobsen*

Le syndrome de Jacobsen est un désordre congénital de transmission autosomique dominante ou survenant plus souvent *de novo* (85 % des cas). La prévalence est évaluée à moins de 1 pour 100000 naissances vivantes (97). Décrit pour la première fois en 1973 par Jacobsen, il résulte de la délétion partielle de l'extrémité distale du bras long du chromosome 11 (11q3.3, 11q24, 11q25). Ce syndrome malformatif associe un retard staturo-pondéral, un retard mental généralement modéré, une dysmorphie faciale (trigonocéphalie, hypertélorisme, épicanthus, strabisme, cataracte, élargissement de l'ensellure nasale, rétrognathie, anomalie palatine et dentaire, implantation basse des oreilles...) et des malformations cardiaques responsables des 25 % de cas de mortalité avant 2 ans (81). La thrombopénie de Paris-Trousseau, décrite initialement par Favier en 1993, correspond à la thrombopénie associée au syndrome de Jacobsen dans 50 % des cas. Elle est modérée (30 à 80 G/L), généralement asymptomatique, comportant un contingent de macroplaquettes (10%) (73). Certaines possèdent une granulation géante correspondant à la fusion des granules  $\alpha$  intraplaquettaires (15 % de la population plaquettaire)(98) (*figure 25*).



*Figure 25* : Granule  $\alpha$  géant au sein d'une macroplaquette (19)

L'incapacité de ces granules géants à libérer leur contenu après activation par la thrombine ne se traduit pas par une thrombopathie car le contingent plaquettaire anormal est minoritaire. L'expression de cette thrombopénie est fluctuante et peut s'atténuer à l'âge adulte. Elle s'accompagne dans 20 % des cas d'une bi- ou pancytopenie (97). Au niveau médullaire, on observe une hyperplasie mégacaryocytaire associée à une fibrose réticulinique pérिमégacaryocytaire et une dysmégacaryopoïèse avec des MK de petite taille et des micromégacaryocytes retrouvés également dans le sang. La richesse de la moelle contraste

avec une production plaquettaire diminuée de 30 % (97). En culture, les colonies mégacaryocytaires sont de petite taille et précocement lysées (81). Ces anomalies cytologiques s'expliquent par la délétion d'une partie du chromosome 11, décrite dans le syndrome de Jacobsen, responsable d'une haplo-insuffisance du gène *FLI-1* (Friend Leukemia virus Integration 1). Ce gène code pour la protéine fli-1 qui est un facteur de transcription nécessaire à la mégacaryopoïèse (99). Le mécanisme de la thrombopénie est donc central par dysmégacaryopoïèse et par avortement intramédullaire au stade tardif des MK.

### **b) Thrombopénie macrocytaire liée à l'X et dysérythropoïèse**

Alors que la thrombopénie constitutionnelle liée à l'X était bien connue et notamment associée à une mutation du gène *WAS*, une nouvelle entité a été décrite en 2000 dans une famille par Nichols *et coll.* se différenciant de la précédente par une thrombopénie à plaquettes de grande taille et une dysérythropoïèse (100). L'identification du gène *GATA1* et la compréhension de son rôle fonctionnel ont permis de mieux définir cette nouvelle entité. Ce gène est situé sur le chromosome Xp11.23. Il code pour un facteur de transcription qui joue un rôle important dans l'hématopoïèse, en particulier dans la différenciation du précurseur commun érythro-mégacaryocytaire mais aussi dans la transcription de gènes cibles (gènes codant pour GPIb et GPIX) (73). Le modèle murin de la thrombopénie macrocytaire liée à l'X avec dysérythropoïèse par inactivation génique du gène *GATA-1* en est une bonne illustration. Les souris présentent une anémie qui régresse rapidement et une thrombopénie macrocytaire permanente. Elles ont également un excès de MK qui ne se différencie pas en proplaquettes et elles développent progressivement une myélofibrose (101). Chez l'Homme, quatre mutations de *GATA-1* ont été décrites. En fonction de cette mutation, la thrombopénie est plus ou moins sévère et l'anémie peut être présente ou absente. Ainsi, la mutation Val205Met est associée à la symptomatologie la plus marquée avec une thrombopénie inférieure à 20 G/L et une anémie sévère et précoce. Une greffe de moelle peut d'ailleurs être proposée dans ce contexte (81). Gly208Ser et Asp218Gly correspondent à des formes modérées sans anémie malgré une thrombopénie sévère (102). Seule la mise en évidence d'une de ces mutations sur le gène *GATA-1* permet d'établir le diagnostic de thrombopénie macrocytaire liée à l'X avec dysérythropoïèse (68).

En microscopie électronique, les plaquettes présentent une diminution des granules  $\alpha$ . Elles se caractérisent également par une diminution de certaines glycoprotéines membranaires et notamment de GPIb et GPIX. Une faible agglutination en réponse à la ristocétine peut

s'expliquer par cette anomalie quantitative de GPIb (102). L'exploration médullaire montre une moelle riche avec une lignée mégacaryocytaire abondante présentant des signes de dysmégacaryopoïèse (micromégacaryocytes dysmorphiques, à noyaux excentrés et/ou fragmentés) et une dysérythropoïèse (retard de maturation, macroblastes, ponctuations basophiles, noyaux multinucléés, bourgeonnement nucléaire et carryorhexis) (81). Il existe une anisocytose et une poïkylocytose érythrocytaire périphérique avec présence d'érythroblastes binucléés circulants.

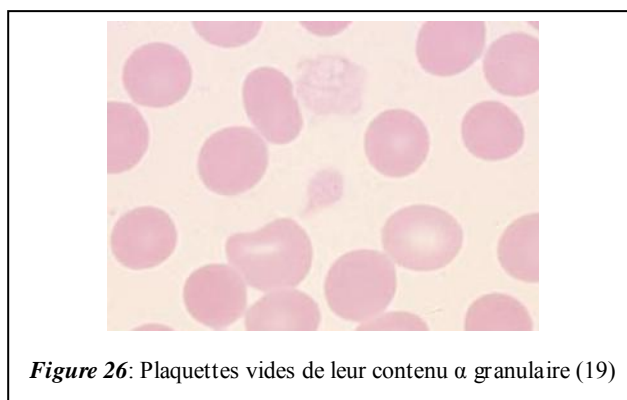
Outre les trois mutations décrites précédemment, une autre mutation du gène de *GATA1* a été décrite (Arg216Gln). Elle correspond à une forme particulière de thrombopénie liée à l'X associée à un trait  $\beta$ -thalassémique et à une splénomégalie modérée. La thrombopénie est modérée (90 G/L) contrastant avec un allongement majeur du temps de saignement (supérieur à 30 min) et une augmentation de l'agrégation plaquettaire à l'ADP. Les hommes porteurs de cette anomalie présente inconstamment une anémie mais systématiquement un déséquilibre de synthèse des chaînes de la globine, des signes d'hémolyse périphérique et une dysmégacaryopoïèse majeure au niveau médullaire (68). Les femmes conductrices sont asymptomatiques et présentent une discrète thrombopénie parfois associée à un déséquilibre des chaînes de la globine.

### ***c) Syndrome vélo-cardio-facial***

Encore appelé syndrome de Di George ou par l'acronyme CATCH 22 (cardiac abnormality, T-cell deficit, cleft palate, hypocalcemia due to a chromosome 22 deletion), ce syndrome est relativement fréquent, survenant chez 1 enfant pour 4000 naissances. Bien que l'expression phénotypique soit variable, elle se caractérise dans sa forme classique par une dysmorphie faciale caractéristique (petit nez rond, microstomie, fente palatine, implantation basse des oreilles mal ourlées, micrognathie), des malformations cardiaques et des vaisseaux, une hypoplasie thymique et des glandes parathyroïdes responsables d'un déficit de l'immunité cellulaire et d'une hypocalcémie (73). Ce syndrome est lié à une délétion du bras long du chromosome 22 qui peut également concerner le gène de la glycoprotéine plaquettaire GPIIb/IIIa (22q11.2). La thrombopénie associée à ce syndrome malformatif correspond donc à une forme hétérozygote du syndrome de Bernard-Soulier, sans défaut d'agglutination plaquettaire à la ristocétine. Elle est modérée, en règle supérieure à 100 G/L, avec un VPM augmenté (10 à 20 fL) (103). D'authentiques syndromes de Bernard-Soulier ont également été décrits associés au syndrome de Di George par délétion en 22q11.2 associée à une mutation sur l'allèle controlatéral (81).

#### **d) Syndrome des plaquettes grises**

Le syndrome des plaquettes grises (ou  $\alpha$ -storage pool deficiency,  $\alpha$ SPD) est une maladie de transmission autosomique dominante. Des cas sporadiques ont également été décrits (81). Il se manifeste par des hémorragies cutanéomuqueuses d'intensité modérée. Il associe une thrombopénie d'intensité variable ( $> 20$  G/L), une augmentation du VPM et une absence du contenu en granules  $\alpha$ . Ce sont particulièrement les protéines synthétisées par les MK qui sont absentes (vWF, PF4,  $\beta$ -thromboglobuline) malgré une synthèse préservée. Les protéines endocytées à partir du plasma ne sont que partiellement diminuées (81). Une splénomégalie, témoin de l'hématopoïèse extra-médullaire secondaire à une myélofibrose, est parfois présente. Cette fibrose médullaire réticulinique pérимégacaryocytaire est liée à la libération de facteurs de croissance (PDGF, TGF- $\beta$ , PF4) par les MK stimulant les fibroblastes tandis que le PF4 serait responsable d'une inhibition de la mégacaryopoïèse (21). Le diagnostic est évoqué par l'observation de plaquettes agranulaires de couleur grise à l'examen du frottis sanguin (figure 26).



**Figure 26:** Plaquettes vides de leur contenu  $\alpha$  granulaire (19)

Ce syndrome doit être différencié du pseudo-syndrôme du pool vide par dégranulation plaquettaire (granules denses et  $\alpha$ ) dû à l'EDTA (104). Il est confirmé par un défaut d'agrégation à la thrombine (étude de l'agrégation plaquettaire au TRAP) alors que la réponse aux autres agonistes plaquettaires est le plus souvent normale.

La microscopie électronique met en évidence l'absence de granules  $\alpha$  mais la présence de vacuoles, de granules denses et d'hypothétiques précurseurs des granules  $\alpha$  (105). Une anomalie d'agrégation au collagène et une moindre expression de la GPVI ont également été rapportées.

L'identification du gène responsable est tout à fait récente. Il s'agit du gène *NBEAL2*, codant pour une protéine à domaine BEACH impliqué dans la formation et le transport vésiculaire (106). Ce domaine BEACH vient de « Beige and CHS domain » en allusion au syndrome de



Chediak-Higashi et au nom de la maladie équivalente chez la souris. L'hypothèse physiopathologique retenue serait un défaut de stockage et de transport vésiculaire responsable d'une fuite des protéines dans le système de démarcation membranaire pendant la maturation mégacaryocytaire (25).

Des syndromes acquis des plaquettes grises ont été décrits au cours de syndromes myéloprolifératifs, du lupus, du diabète, de l'insuffisance rénale mais aussi au cours d'infarctus du myocarde et de circulation extra-corporelle où un état d'hyperactivation plaquettaire responsable d'une sécrétion granulaire augmentée a été démontrée *in vivo* (25).

### ***e) Macrothrombopénies autosomiques dominantes***

En 1975, von Behrens étudie la numération plaquettaire et le VPM chez 145 individus, apparemment en bonne santé, d'Italie et de la péninsule des Balkans. Nombre d'entre eux présentaient une forme indéfinie de macrothrombocytopénie. En raison de l'absence de description de cette entité dans une population témoin du nord de l'Europe, elle a été nommée macrothrombocytopénie Méditerranéenne (107). Il s'agit d'une thrombopénie modérée familiale autosomique dominante, peu ou pas symptomatique.

Chez certains patients a été trouvée la mutation Ala156Val à l'état hétérozygote sur le gène codant pour GPIb $\alpha$ . Cette mutation, dite variant Bolzano, est responsable d'un syndrome de Bernard-Soulier pour les sujets homozygotes ou hétérozygotes composites. Une partie de ces macrothrombocytopénies méditerranéennes pourrait donc être des variants dits Bolzano (81).

Il a récemment été décrit des anomalies morphologiques plaquettaires avec présence de grandes plaquettes chez des patients atteints de filaminopathie. Cette maladie autosomique dominante liée à l'X est due à des mutations du gène *FLNA* codant la filamine A. Cette protéine serait le site d'attachement de la glycoprotéine membranaire GPIb $\alpha$  au niveau du cytosquelette plaquettaire et mégacaryocytaire. Une nouvelle mutation du gène *FLNA* a également été identifiée chez une femme présentant une thrombopénie isolée diagnostiquée en premier lieu comme un PTI (108).

Un cas isolé de macrothrombopénie autosomique dominante a été rapporté au Japon chez un garçon et sa mère. Ils portaient une mutation du gène *TUBB1* codant pour la tubuline, protéine exclusivement exprimée dans les plaquettes et les MK.

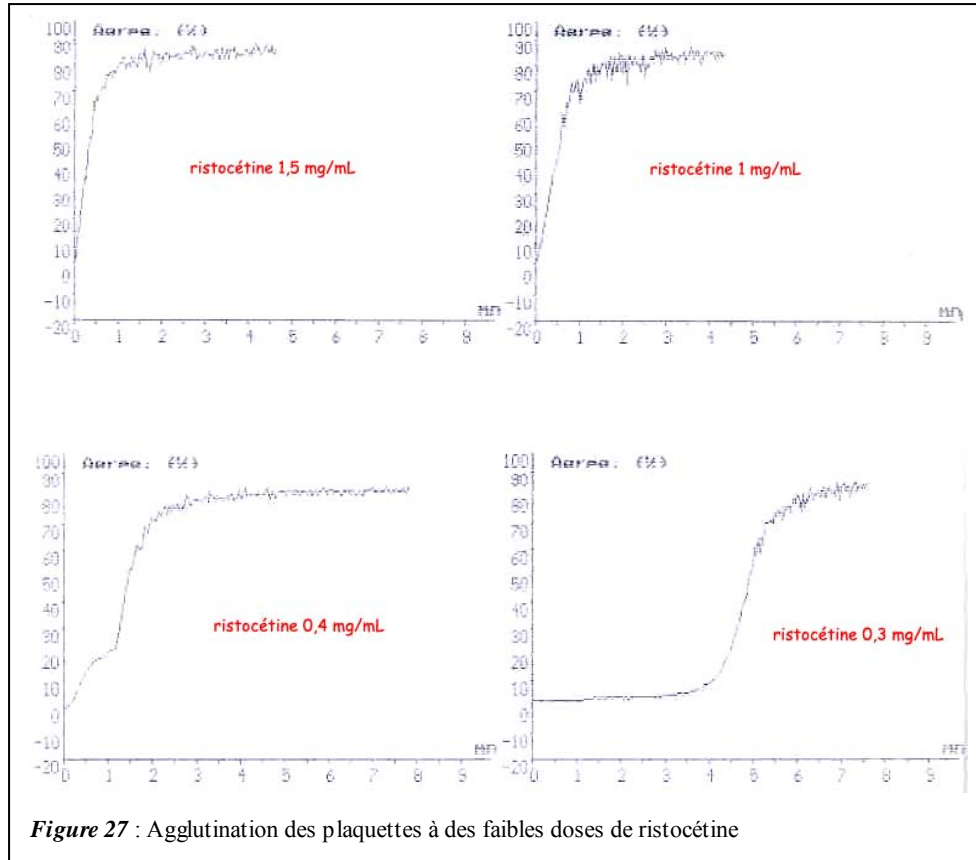
La découverte de ces mutations (gènes *FLNA*, *TUBB1*) pourrait expliquer des macrothrombopénies encore non étiquetées.

Ainsi dans la démarche de typage d'une macrothrombocytopénie non incluse dans un syndrome génétique particulier et ne présentant pas d'anomalie du complexe GPIb-IX-V, le

diagnostic de macrothrombocytopénie chronique autosomique dominante est souvent retenu. Il s'agit d'une catégorie hétérogène contenant différentes formes de macrothrombocytopénie non syndromique qui ne peuvent, à l'heure actuelle, pas être diagnostiquées plus précisément (68).

### f) *Pseudo-Willebrand plaquettaire*

Comme le syndrome de Bernard-Soulier, le syndrome de pseudo-Willebrand est également lié à une anomalie de la glycoprotéine GPIb $\alpha$  et plus particulièrement au niveau de la zone de fixation du vWF. De transmission autosomique dominante, il a pour origine une mutation du gène codant GPIb $\alpha$  (Gly233Val, Gly233Ser ou Met239Val) situé sur le chromosome 17 (21). Le syndrome de pseudo-Willebrand se caractérise par une augmentation de l'affinité de la GPIb $\alpha$  pour le vWF ce qui explique la diminution du taux de vWF circulant et la symptomatologie hémorragique par défaut d'adhésion plaquettaire. Il comporte les mêmes caractéristiques cliniques et biologiques que la maladie de Willebrand de type 2B, pathologie trois fois plus fréquente que le syndrome de pseudo-Willebrand (109), où l'anomalie réside sur le vWF : diminution du vWF plasmatique et des multimères de haut poids moléculaire, agglutination plaquettaire *in vitro* à de faibles doses de ristocétine (figure 27).



La présence d'une thrombopénie normo ou macrocytaire est fluctuante et souvent majorée en cas de syndrome inflammatoire ou de stress (81). Seule la recherche des mutations respectives sur les chromosomes 12 et 17 permet de différencier les deux maladies.

Le syndrome plaquettaire de Montréal est une pathologie de transmission autosomique dominante décrite dans une seule famille. Il se caractérise par une agglutination spontanée des plaquettes au repos ou agitées dans un PRP (68) Il existe également une hyperagrégation plaquettaire pour l'ensemble des agonistes à l'exception de la thrombine. La présence d'agrégats plaquettaires après mélange des plaquettes du patient avec un plasma normal est en faveur d'une anomalie de la GPIb qui pourrait être compatible avec un syndrome de Montréal (81).

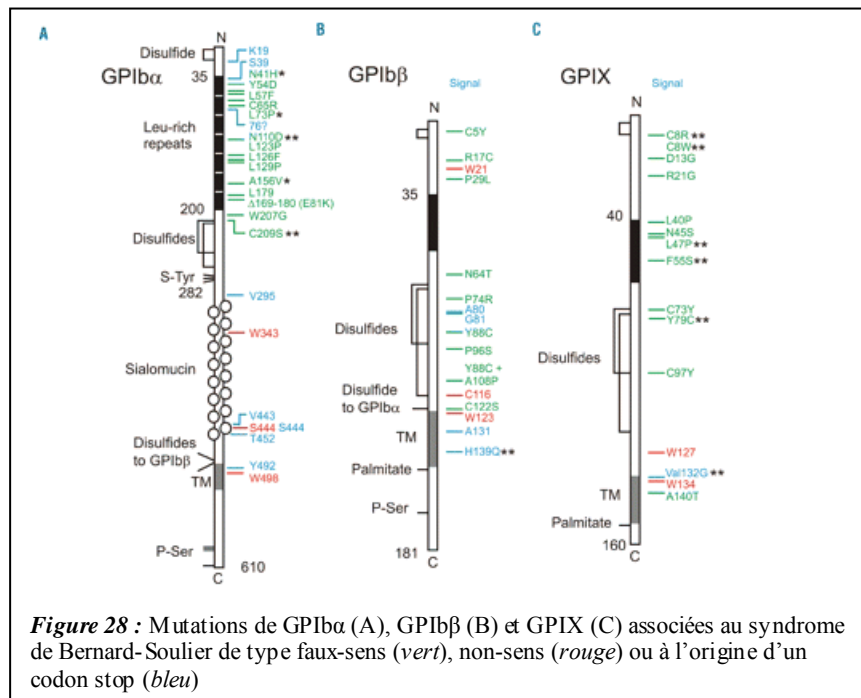
#### **4. Thrombopénies constitutionnelles avec plaquettes géantes**

##### ***a) Syndrome de Bernard Soulier***

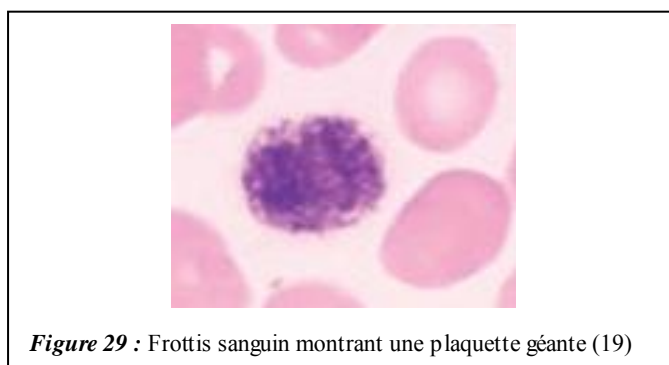
Décrit en 1948 par Jean Bernard et Jean-Pierre Soulier sous le nom de dystrophie thrombocytaire hémorragique congénitale, le syndrome de Bernard-Soulier (SBS) est présent dans 1 cas pour  $10^6$  naissances (110). Environ 40 patients présenteraient la forme homozygote en France. De transmission autosomique récessive, seuls les individus homozygotes ou hétérozygotes composés présentent un syndrome hémorragique sévère. Il se manifeste rapidement après la naissance et dans la jeune enfance par un purpura, un épistaxis, des saignements gingivaux ou encore des ménorragies chez l'adulte. Les saignements gastro-intestinaux et l'hématurie sont plus rares. Les manifestations hémorragiques les plus graves surviennent surtout après un traumatisme ou un geste chirurgical (appendicectomie, extraction dentaire). Il existe également des formes de SBS de transmission autosomique dominante (formes dites monoalléliques) dans lesquelles la thrombopénie et les manifestations hémorragiques sont modérées ou absentes (111). Le SBS résulte d'un déficit quantitatif ou qualitatif du complexe glycoprotéique plaquettaire GPIb-IX-V assurant la liaison avec le vWF. Plus de 50 mutations impliquant les gènes codant pour GPIb $\alpha$ , GPIb $\beta$  ou GPIX ont été identifiées (112) (*figure 28*).

Les anomalies les plus souvent retrouvées concernent la sous-unité GPIb $\alpha$ . En particulier, la mutation Ala156Val correspond à une forme de SBS monoallélique dite « variant Bolzano ». Trois types de mutations ont été décrits. Les mutations faux-sens aboutissent à une diminution de l'expression du complexe glycoprotéique ou à sa dysfonction. Les mutations non-sens

entraînent la synthèse de petites sous-unités glycoprotéiques non retrouvées sur la membrane plaquettaire. Les insertions ou délétions survenant dans le cadre de lecture codent pour une nouvelle séquence polypeptidique dont la synthèse est prématurément arrêtée. Dans de rares cas, des mutations de la sous-unité GPIb $\alpha$  ou GPIX affectent principalement la fonctionnalité du récepteur qui est malgré tout exprimé à la surface plaquettaire (110).



Sur le plan biologique, le SBS se présente par une thrombopénie d'intensité variable (20 - 150 G/L) avec un contingent de plaquettes géantes aisément reconnaissables sur le frottis sanguin (*figure 29*) (75). Comparativement à des sujets témoins normaux qui possèdent 0,2 % de plaquettes de taille supérieure à 8  $\mu$ m, Balduini *et coll.* (2003) a montré que les individus homozygotes pour le SBS avaient 6% de plaquettes de grande taille (68). Lanza *et coll.* (2006) décrit une population plaquettaire dont le VPM varie entre 11 et 16 fL (110).



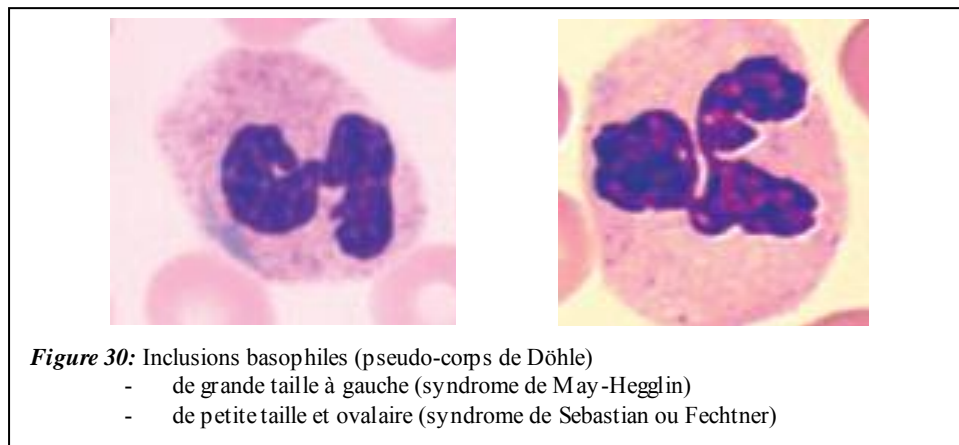
Cette population de plaquettes géantes s'expliquerait par un défaut de maturation des MK mais aussi par l'altération des interactions entre la membrane et le cytosquelette plaquettaire (81). A ce propos, la découverte de plaquettes de grande taille dans les filaminopathies (anomalie du gène codant la filamine A impliquée dans les interactions GPIb $\alpha$  et cytosquelette) pourrait expliquer cette altération des interactions membrane/cytoplasme plaquettaire (108). En microscopie électronique, les plaquettes se caractérisent par de nombreuses vacuoles cytoplasmiques également retrouvées dans les MK (21). Elle révèle également des anomalies du système de démarcation mégacaryocytaire (81). Une thrombopathie est associée au SBS, mise en évidence par un défaut d'agglutination à la ristocétine. La réponse à la thrombine est également diminuée alors que celles à l'ADP et au collagène restent normales. Le diagnostic est confirmé par CMF en utilisant des anticorps monoclonaux anti-CD 42a (anti GPIX) et -CD 42b (anti GPIb $\alpha$ ).

### ***b) Syndrome MYH9***

Le syndrome de May-Hegglin (SMH), le syndrome de Fechtner (SF), le syndrome d'Epstein (SE) et celui de Sebastien (SS) font partie d'un même groupe d'affections rares (dit syndrome MYH9) dont les caractéristiques communes sont la transmission autosomique dominante, une thrombopénie d'intensité variable avec présence de plaquettes géantes (*figure 29*) et une anomalie du gène *MYH9* situé en 22q12-13 (81). Une élévation des enzymes hépatiques qui ne semble pas avoir de répercussion clinique, est observée chez 50 % des patients présentant un syndrome MYH9 (113). Outre la thrombopénie, le SF comprend une atteinte rénale à type de glomérulonéphrite interstitielle, une surdité neurosensorielle et une cataracte bilatérale. Le SE se différencie du SF par l'absence de cataracte et d'inclusions leucocytaires (81). Le SMH et le SS sont des formes hématologiques pures qui se différencient par l'aspect des inclusions leucocytaires (*figure 30*). Les polynucléaires présentent, en effet, des inclusions bleu pâles à l'examen du frottis sanguin coloré au MGG, excepté pour le SE (*figure 30*). Autrefois décrites sous le nom de pseudo-corps de Döhle pour les différencier des corps de Döhle observés au cours des sepsis ou des syndromes myélodysplasiques, on les définit désormais par des « inclusions leucocytaires basophiles » (68,114).

En microscopie électronique, les plaquettes sont sphériques avec une augmentation de taille des granules  $\alpha$  et un système de démarcation intra-membranaire irrégulier. Les plaquettes géantes ont une anomalie de distribution de l' $\alpha$ -tubuline qui est dispersée dans l'ensemble du cytoplasme alors qu'elle est en position sous-membranaire dans les plaquettes normales (81).

La microscopie électronique permet également d'apprécier l'ultrastructure des inclusions leucocytaires (zone amorphe constituée d'un groupement de ribosomes, dépourvue d'organites et entourée par du réticulum endoplasmique) (114).



Ces inclusions sont ovalaires, se constituent de filaments disposés parallèlement les uns aux autres et mesurent 5-10  $\mu\text{m}$  dans le SMH. Dans le SS et le SF, elles mesurent 1-2  $\mu\text{m}$ , sont ovalaires, parfois multiples et se constituent de filaments dispersés peu organisés. Situées en périphérie du cytoplasme, elles sont difficilement visibles à l'œil nu. Les inclusions basophiles intraleucocytaires associées aux infections présentent, en microscopie électronique, plusieurs rangées de réticulum endoplasmique granuleux (68).

Ces syndromes constituent les variants alléliques du gène *MYH9* codant pour la chaîne lourde de la myosine non musculaire de type IIA (NMMHC-IIA). Elle appartient à la superfamille des myosines. Deux types de protéines, A et B, constituent le groupe des myosines non musculaires. Le type A (NMMHC-IIA) est présent dans différents tissus comme les plaquettes, le rein, les leucocytes et la cochlée. Ce complexe hexamérique est constitué de deux chaînes lourdes et de deux paires de chaînes légères. Son rôle essentiel est d'assurer les fonctions contractiles et sécrétoires de la plaquette (115). La myosine non musculaire de type B est ubiquitaire et est codée par le chromosome 17 (81). Une anomalie moléculaire est retrouvée dans 70 % des cas de syndrome MYH9. Plus de 40 mutations, majoritairement réparties sur les exons 1, 16, 30 et 40, ont été décrites. Une étude moléculaire réalisée sur 19 familles présentant un syndrome MYH9 a révélé que dans 9 cas sur 19 il s'agissait de mutations *de novo* (68). Ces anomalies du gène de la myosine entraînent une dimérisation anormale de la NMMHC-IIA, un défaut de polymérisation et une précipitation avec la NMMHC-IIA normale dans le cytoplasme des leucocytes formant ainsi les inclusions observées. La NMMHC-IIA anormale est à l'origine d'une désorganisation du cytosquelette

mégacaryocytaire et plaquettaire responsable de la thrombopénie (116). Le cytosquelette des autres lignées hématopoïétiques n'est pas concerné car la myosine non musculaire de type IIB, présente dans ces cellules, compense l'absence de la NMMHC-IIA (81).

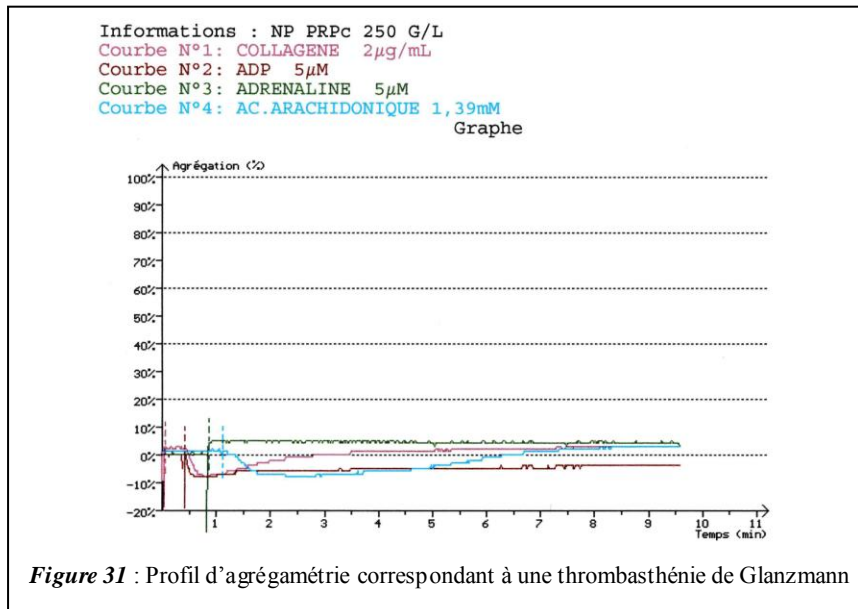
La présentation clinique de ce groupe de syndromes étant hétérogène, le diagnostic est évoqué devant la présence d'inclusions leucocytaires et d'une thrombopénie à plaquettes géantes. Seri *et coll.* rapporte 12 % de plaquettes de VPM supérieur à 8  $\mu\text{m}$  déterminé par un microscope à oculaire graduée, tandis que Balduini *et coll.* (2003) conclue à 16,8 % (68). Une analyse spécifique des plaquettes par immunocytochimie ou immunofluorescence utilisant des anticorps anti- NMMHC-IIA permet de mettre en évidence une anomalie de distribution de cette molécule dans les polynucléaires même si les inclusions basophiles ne sont pas visibles à l'examen du frottis sanguin coloré au MGG. Du fait de l'organisation normale de cette myosine dans les polynucléaires dans des cas de thrombopénies constitutionnelles non-MYH9, ce test apparaît donc hautement spécifique et doit être réalisé en cas de forte suspicion. La recherche d'une mutation par biologie moléculaire permet de confirmer le diagnostic (68).

## 5. Autres thrombopathies constitutionnelles

### a) *Thrombasthénie de Glanzmann*

Décrite initialement par Glanzmann en 1918, cette thrombopathie constitutionnelle sans thrombopénie est de transmission autosomique récessive. En France, cette maladie est le plus fréquemment observée chez les gitans, groupe ethnique à forte endogamie (1). Environ 500 patients sont suivis (71). La thrombopathie est liée à un déficit quantitatif ou qualitatif du complexe GPIIbIIIa ou intégrine  $\alpha\text{IIb}\beta_3$ , glycoprotéine majeure de la phase d'agrégation plaquettaire. Les anomalies les plus communes sont des mutations non-sens situées sur les sites d'épissage ou encore des mutations faux-sens liées à la substitution d'un acide aminé (94). En 2010, 164 mutations responsables de ce phénotype ont été répertoriées (117). Il semblerait que les mutations impliquant la sous-unité  $\beta_3$  soient associées à un déficit en intégrine  $\alpha\text{V}\beta_3$  (récepteur plaquettaire de la vitronectine) (1). L'ensemble de ces mutations affecte la synthèse d'une sous-unité de l'intégrine au niveau des MK ou altère la synthèse protéique au niveau du transport entre le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi (118). Un déficit du complexe GPIIbIIIa entraîne l'absence d'interactions des plaquettes entre elles aux points de lésion vasculaire empêchant l'arrêt du saignement. Il existe une grande variabilité dans l'expression clinique de cette maladie. Certaines mutations pourraient être

plus délétères que d'autres. Seuls les individus homozygotes présentent généralement des symptômes hémorragiques (119). Ces symptômes apparaissent souvent précocement, parfois dès la naissance, avec des hémorragies cutanéomuqueuses. Des hémorragies gastro-intestinales et des hématuries sont moins fréquentes (119). Elles peuvent s'estomper à l'âge adulte (1).



Le diagnostic s'établit à partir de tests fonctionnels plaquettaires anormaux en dépit d'une numération, une morphologie plaquettaire et d'un VPM normaux. Quelques cas présentant une thrombopénie avec la présence de grandes plaquettes ont été rapportés associés à une mutation Arg995 de GPIIb ou Asp723 GPIIIa (120). Les cas concernés étaient de transmission autosomique dominante (121). Le temps d'occlusion mesuré par l'appareil PFA-100<sup>®</sup> est infini avec les deux cartouches testées. Le test photométrique par agrégamétrie montre une absence d'agrégation des plaquettes quel que soit l'agoniste utilisé et l'absence de rétraction du caillot (64) (figure 31). Le déficit en GPIIb/IIIa peut également être mis en évidence par CMF et par immuno-blot.

Une classification biologique est proposée en fonction du pourcentage d'expression résiduelle de l'intégrine  $\alpha$ Ib $\beta$ 3 (tableau III). Elle ne permet pas de prédire fidèlement la gravité du syndrome hémorragique. Il n'existe, en effet, pas de corrélations entre la quantité d'intégrine  $\alpha$ Ib $\beta$ 3 et la sévérité des hémorragies (119).



	Agrégation	$\alpha$ IIb $\beta$ 3 membranaires (% normale)	Fibrinogène intraplaquettaire	Rétraction du caillot
<b>Type 1</b>	absent	0-5	absent	absente
<b>Type 2 a</b>	absent	10-20	présent	différée
<b>Type 2 b</b>	absent	50-100	présent	variable

**Tableau III** : Classification de la thrombasthénie de Glanzmann (1)

### ***b) Déficit en granules denses***

Le déficit en granules denses ( $\delta$ -SPD,  $\delta$ -storage pool deficiency) ou maladie du pool vide est une thrombopathie définie par un déficit qualitatif ou quantitatif en granules denses intraplaquettaires. Les étiologies du  $\delta$ -SPD sont multiples (122). Il existe une forme isolée, congénitale, à transmission autosomique dominante qui représente près de 20 % des thrombopathies congénitales (1) mais également des formes associées à d'autres pathologies héréditaires. C'est le cas du syndrome de Wiskott-Aldrich mais aussi des syndromes d'Hermansky-Pudlak, de Chediak-Higashi (mutation de la protéine CHS à domaine BEACH) et de Griscelli où l'anomalie des granules denses s'accompagne d'une anomalie des mélanosomes (21). Il existe également une forme de  $\delta$ -SPD associée à un déficit en granules  $\alpha$ . Les formes secondaires ou acquises sont observées au cours d'hémopathies malignes mais aussi au cours de maladie auto-immunes, de valvulopathie et d'insuffisance rénale chronique terminale (122).

Les manifestations hémorragiques sont très hétérogènes mais sont le plus souvent modérées. Le diagnostic est évoqué devant une réduction du nombre de granules denses totale ou partielle en microscopie électronique et un profil caractéristique des tests d'agrégation plaquettaire. Il se traduit par une agrégation des plaquettes diminuée et réversible en présence de collagène et d'acide arachidonique, diminuée et réversible (absence de seconde vague) en présence d'ADP et d'adrénaline et généralement normale en présence de ristocétine. Toutefois, la littérature rapporte des cas de  $\delta$ -SPD associés à des tests d'agrégation normaux.

### ***c) Syndrome de Scott***

Du nom de la première patiente décrite, le syndrome de Scott est une thrombopathie constitutionnelle très rare. Elle se manifeste par des épisodes hémorragiques provoqués notamment au cours de l'accouchement ou d'actes chirurgicaux. La symptomatologie résulte d'un défaut d'exposition des phospholipides procoagulants à la surface plaquettaire. Ces

phospholipides, et plus particulièrement la phosphatidylsérine, restent séquestrés dans le feuillet interne de la membrane plasmique malgré l'activation plaquettaire. Cette anomalie du flip-flop plaquettaire empêche la fixation des facteurs Va et Xa de la coagulation aux phospholipides plaquettaires et la conversion de prothrombine en thrombine ainsi que la libération de microvésicules procoagulantes (123). Une augmentation de la concentration sérique de prothrombine résiduelle est très évocatrice du syndrome. Le déficit de la microvésiculation peut être évalué en CMF par marquage fluorescent de l'annexine V à la surface des plaquettes et des hématies. Des mutations du gène *TMEM16F* codant pour un canal calcique transmembranaire seraient impliquées dans ce syndrome (94).

#### ***d) Autres pathologies des récepteurs plaquettaires***

Des déficits concernant divers récepteurs des agonistes plaquettaires ont été décrits. Ce vaste groupe est très hétérogène et il s'agit le plus souvent de cas isolés. Le syndrome de Bolin-Jamieson se caractérise par un variant de la GPIb $\alpha$ . Des manifestations hémorragiques ont été décrites consécutivement à une anomalie du complexe GPIaIIa, GPVI, des récepteurs P2 à l'ADP ou encore des récepteurs du TxA2. Des anomalies des voies du collagène, du TxA2 ou de l'ADP ont également été décrites consécutivement à une anomalie de certaines enzymes ou protéines G impliquées dans la voie de signalisation (1).

### **B. Prise en charge thérapeutique**

Le but de la prise en charge thérapeutique de ces pathologies plaquettaires est double : mettre en place des mesures prophylactiques pour prévenir toutes hémorragies et stopper tout saignement par des mesures à visée curative pour rétablir une hémostase suffisante (1).

#### **1. Mesures préventives**

Ces mesures consistent à éviter tout comportement majorant le risque hémorragique. Il s'agit de limiter la pratique de sports violents. Les injections intramusculaires et tout traitement interférant avec les fonctions plaquettaires (anti-agrégants plaquettaires, anti-inflammatoires) sont contre-indiqués. La prévention des saignements gingivaux repose sur un suivi dentaire régulier et une bonne hygiène buccale.

Le CRPP met à disposition des familles concernées des cartes de santé officielles sur la pathologie et les mesures préventives nécessaires à appliquer au quotidien. L'efficacité de ces mesures nécessite, en effet, une véritable éducation du patient et de son entourage.

## **2. Prise en charge d'une hémorragie**

La gestion de manifestations hémorragiques superficielles, et notamment en cas d'épistaxis, repose, en premier lieu, sur des mesures locales par compression directe à l'aide d'une compresse voire une compresse hémostatique en cas d'échec. L'utilisation d'anti-fibrinolytiques comme l'acide tranexamique peut être nécessaire. Il est utilisé par voie locale (bains de bouche) lors d'extractions dentaires et également par voie orale dans les jours suivant un geste chirurgical (amygdalectomie, par exemple). La desmopressine, analogue synthétique de la vasopressine, a montré son intérêt dans des thrombopathies héréditaires sauf dans la maladie de Glanzmann.

La transfusion de plaquettes est indiquée en cas d'hémorragie sévère, en per-partum pour les césariennes programmées et dans des chirurgies à haut risque hémorragique. Ces transfusions doivent rester limitées afin de prévenir une allo-immunisation anti-HLA et donc la survenue d'un état réfractaire aux transfusions (1). Les sujets présentant une maladie de Glanzmann de type I peuvent développer des iso-anticorps anti-GPIIb/IIIa qui peuvent bloquer l'agrégation plaquettaire et accélérer la clairance des plaquettes transfusées par un mécanisme immun. Cette iso-immunisation rend les transfusions de plaquettes inefficaces (1,119).

Le Novoseven<sup>®</sup>, facteur VII activé recombinant, représente une alternative intéressante chez des patients ayant des anticorps anti-HLA ou anti-GPIIb/IIIa (plasmaphèreses d'épuration insuffisantes) et présentant une absence de réponse aux transfusions plaquettaires. En augmentant la quantité de thrombine générée, cet agent thérapeutique améliore l'interaction des plaquettes déficientes avec le sous-endothélium via la fibrine formée (124).

## **3. Greffe de moelle osseuse**

Bien que les mesures préventives et thérapeutiques décrites précédemment soient privilégiées dans la majorité des cas, l'allogreffe de moelle osseuse garde une indication dans les cas où le pronostic vital est menacé. Ainsi dans le syndrome WAS, l'allogreffe de cellules souches a transformé le pronostic de cette maladie en corrigeant la thrombopénie et le dysfonctionnement immunitaire (eczéma, susceptibilité aux infections, manifestations auto-immunes, évolution vers un lymphome non hodgkinien). Dans l'attente de la greffe de moelle, la thrombopénie peut être corrigée de façon inconstante par une corticothérapie, des perfusions d'immunoglobulines intraveineuses ou par splénectomie qui corrige en partie la numération plaquettaire (81). Dans l'amégacaryoctyose congénitale et l'amégacaryoctyose avec syndrome radio-cubital, la greffe de moelle constitue la seule prise en charge adaptée.

Elle est souvent rapidement indiquée du fait d'une symptomatologie marquée et de l'évolution rapide en aplasie médullaire.

#### **4. Diagnostic anténatal et conseil génétique**

En cas de consanguinité et notamment dans la maladie de Glanzmann, le diagnostic prénatal peut être proposé par phénotypage des plaquettes fœtales dès la 16<sup>ème</sup> semaine d'aménorrhée à partir d'une ponction de villosités choriales. Pour les cas sporadiques, ce n'est qu'après la naissance d'un premier enfant atteint qu'un diagnostic prénatal peut être envisagé car l'anomalie génétique doit être identifiée parmi de nombreuses possibilités (119).

#### **C. Diagnostics différentiels : thrombopénies acquises**

Si la découverte fortuite d'une thrombopénie isolée doit faire évoquer une origine constitutionnelle, une origine acquise reste la cause la plus fréquente et demande une prise en charge bien spécifique. La transfusion plaquettaire peut être nécessaire lorsque le risque d'hémorragies menaçant le pronostic vital doit être écarté. Cependant les anti-fibrinolytiques, la desmopressine ou encore la greffe de moelle n'ont pas leur place dans les thrombopénies acquises.

Les étiologies des thrombopénies acquises sont nombreuses et varient en fonction de l'âge. Chez le nouveau-né, une atteinte médullaire consécutive à un sepsis, une allo-immunisation ou encore un passage transplacentaire d'anticorps antiplaquettaires maternelles sont les étiologies les plus fréquentes. Chez l'enfant, les thrombopénies liées aux infections virales et le PTI prédominent. Chez l'adulte, les étiologies sont très nombreuses (72).

#### **1. Thrombopénies non auto-immunes**

##### **(1) Thrombopénies infectieuses**

Une infection virale est une cause fréquente de thrombopénie, surtout chez l'enfant. Plusieurs virus en sont responsables, et notamment le virus des oreillons, de la varicelle, de la mononucléose infectieuse (Ebstein-Barr virus, EBV), de la rubéole, des hépatites, le VIH (virus d'immunodéficience humaine) ou encore le CMV (cytomégalovirus). L'infection virale peut passer inaperçue sur le plan clinique et une thrombopénie, éventuellement accompagnée d'un syndrome mononucléosique (hyperlymphocytose à grands lymphocytes hyperbasophiles), en est le seul stigmat. Généralement transitoire, elle devient chronique dans l'infection à VIH ou à VHC (virus de l'hépatite C). Chez le nouveau-né, des infections virales à herpès virus, EBV, CMV, virus de la rubéole peuvent être responsables d'une

thrombopénie mais rarement isolée (pancytopénie). Et la symptomatologie bruyante (atteinte pluri viscérale) ne pose généralement pas de problème de diagnostic avec les thrombopénies constitutionnelles (125).

Certaines infections bactériennes s'accompagnent d'une thrombopénie comme la brucellose ou encore la fièvre typhoïde. Dans un contexte néonatal, les germes impliqués sont ceux des infections materno-fœtales (streptocoque B, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*) ou plus rarement la syphilis congénitale. Dans les services de soins intensifs, les prématurés sont sujets à des infections par des germes nosocomiaux (*Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*). La thrombopénie est généralement sévère mais s'améliore rapidement avec une antibiothérapie efficace (125).

## (2) Thrombopénies médicamenteuses (126,127)

Dans la démarche étiologique d'une thrombopénie, la recherche d'une origine médicamenteuse s'impose mais l'enquête est souvent difficile, surtout si les patients sont poly-médicamentés. De plus, il n'existe pas de tests biologiques accessibles en routine permettant de confirmer la responsabilité d'un médicament, en dehors de l'exploration d'une thrombopénie induite par l'héparine (TIH). Le mécanisme est rarement d'origine central (sauf hydrochlorothiazide). Il est le plus souvent périphérique par un mécanisme immunologique. Des anticorps dépendant du médicament en question se fixent sur des épitopes de surface plaquettaires en présence de ce médicament. Le mécanisme de survenue de la thrombopénie consécutive à la prise d'abciximab (fragment Fab de l'anticorps chimérique anti  $\alpha$ IIb $\beta$ 3) est différent. Il s'explique par la présence d'anticorps naturels reconnaissant le fragment murin. Le délai de survenue de la thrombopénie est variable : dans les 24 premières heures pour l'abciximab et entre le 5<sup>ème</sup> et le 21<sup>ème</sup> jour pour les héparines. Il est d'ailleurs recommandé de surveiller la numération plaquettaire lors de la prise de ces médicaments. Dans le cadre de la TIH, la physiopathologie repose sur la formation d'anticorps reconnaissant le PF4 modifié par les héparines, l'activation plaquettaire et l'émission de microparticules procoagulantes à l'origine de manifestations thrombotiques.

La thrombopénie médicamenteuse survient souvent brutalement et expose à un risque d'hémorragies graves du fait de sa sévérité. Des manifestations thrombotiques sont plutôt attendues dans la TIH. De nombreux médicaments parmi la quinine, la rifampicine, les héparines, le triméthoprime-sulfaméthoxazole...etc... peuvent être incriminés. Une base de données disponible sur internet décrit le risque de thrombopénie associé à de nombreux médicaments (128). L'arrêt du médicament incriminé permet d'améliorer la thrombopénie dès

le premier ou le deuxième jour. La normalisation de la numération plaquettaire survient en une semaine environ.

### (3) Thrombopénie de consommation

La CIVD correspond à une activation généralisée de l'hémostase, de la coagulation et de la fibrinolyse à l'origine d'une thrombopénie et d'une coagulopathie de consommation. Les étiologies (infectieuses, traumatiques, tumorales...) sont nombreuses. Un bilan d'hémostase systématique comprenant TP, TCA et fibrinogène permet d'écarter cette hypothèse dans la démarche étiologique d'une thrombopénie isolée (129).

Les microangiopathies thrombotiques (syndrome hémolytique et urémique, purpura thrombotique thrombocytopénique) sont également des causes de thrombopénie de consommation mais s'accompagne nécessairement d'une anémie hémolytique avec la formation de schizocytes.

### (4) Thrombopénie par hypersplénisme

Une rate normale séquestre 20 à 30 % des plaquettes synthétisées par la moelle (5). Une splénomégalie importante, quelle soit d'origine infectieuse, tumorale ou par hypertension portale, hausse la proportion de plaquettes intraspléniques par rapport à celle du sang. Il en résulte une thrombopénie pouvant aller jusqu'à 40-50 G/L même si la thrombopoïèse est intacte.

### (5) Thrombopénies centrales

Chez l'enfant, les étiologies sont les leucémies aiguës et l'aplasie médullaire. Néanmoins, il est exceptionnel que la thrombopénie soit isolée dans ces contextes. La prise de diurétiques thiazidiques par une femme au cours de la grossesse peut induire une thrombopénie centrale toxique chez le nouveau-né.

Chez l'adulte les causes centrales de thrombopénie sont représentées par l'intoxication alcoolique et médicamenteuse (diurétiques thiazidiques). Une carence en vitamine B12 ou en folates, l'aplasie médullaire ou l'envahissement de la moelle par des cellules tumorales (blastes, cellules lymphomateuses, métastases de cancer solide) sont également des causes de thrombopénie mais rarement isolées. En revanche, une thrombopénie isolée peut être le seul signe annonciateur d'un syndrome myélodysplasique (130). Cette possibilité impose la réalisation d'un myélogramme chez tout individu de plus 60 ans chez qui a été découvert une thrombopénie isolée chronique (13).

## (6) Thrombopénies néonatales immunologiques

L'incidence des thrombopénies néonatales allo-immunes est faible avec un cas pour 3000 naissances. Il existe deux systèmes antigéniques plaquettaires distincts : le système HLA et les antigènes spécifiques plaquettaires. Ce sont ces derniers qui sont impliqués dans l'allo-immunisation fœto-maternelle et notamment l'antigène HPA1a présent chez 97,5 % de la population générale. L'immunisation d'une mère HPA1a négative contre les antigènes fœtaux hérités du père HPA1a entraîne une thrombopénie néonatale le plus souvent profonde et responsable d'hémorragies dès la naissance. Les antigènes HPA5, HPA1b et HPA3 peuvent également être impliqués mais plus rarement (125).

La présence d'auto-anticorps plaquettaires chez la mère dans le cadre d'un PTI ou d'une maladie auto-immune peut également être responsable d'une thrombopénie chez le nouveau-né.

## 2. Thrombopénies auto-immunes

### (1) Thrombopénies associées aux maladies auto-immunes

Une thrombopénie peut s'observer dans le cadre d'un syndrome des antiphospholipides, un lupus ou encore une thyroïdite auto-immune. Elle s'accompagne éventuellement de manifestations thrombotiques.

### (2) Purpura thrombopénique immunologique, PTI

Le PTI est une maladie auto-immune définie par une thrombopénie isolée inférieure à 150 G/L (thrombopénie immune idiopathique) due à la présence d'auto-anticorps plaquettaires et à un défaut de production médullaire d'origine immunologique (12). L'incidence est évaluée à 1 à 6 cas pour 100000 habitants (13,131,132). On distingue le PTI de l'adulte, qui touche un peu plus les femmes, de celui de l'enfant ainsi que les formes aiguës des formes chroniques. Le PTI est dit chronique pour une durée d'évolution supérieure ou égale à 12 mois. Chez l'adulte, cette chronicité concerne 70 % cas. Chez l'enfant, le PTI survient souvent dans un contexte d'infections virales (1 à 3 semaines auparavant) et 80 % des enfants atteints guérissent en quelques semaines (13). Les manifestations cliniques sont variables allant du PTI asymptomatique à des hémorragies intracrâniennes potentiellement fatales.

Comme de nombreuses maladies auto-immunes, le facteur déclenchant la perte de tolérance du soi n'est pas connu. La physiopathologie repose sur l'apparition d'anticorps antiplaquettaires responsables d'une destruction périphérique des plaquettes. Une population

émergente de lymphocytes T cytotoxiques qui induisent la production d'anticorps antiplaquettaires par les lymphocytes B joue également un rôle central dans la thrombopénie. La rate constituerait le site majeur de synthèse de ces anticorps et d'épuration des complexes plaquettes-anticorps. Enfin, les auto-anticorps plaquettaires interfèreraient avec la mégacaryocytopoïèse et la formation de proplaquettes (132).

L'examen du frottis sanguin montre des plaquettes de morphologie normale et de taille normale ou faiblement augmentée. A ce propos, plusieurs études rapportent une légère augmentation du VPM dans les thrombopénies périphériques liée à la régénération médullaire et soulignent l'intérêt du VPM pour le diagnostic différentiel des thrombopénies centrales et périphériques (133–136) (*cf* paragraphe III)C).

En l'absence de tests diagnostiques spécifiques, le diagnostic de PTI est retenu par exclusion des autres causes de thrombopénie. L'HAS recommande donc d'effectuer un bilan d'hémostase, d'auto-immunité, des sérologies virales, un myélogramme pour écarter une cause centrale (il montre une moelle riche avec hyperplasie mégacaryocytaire sans signes dysplasiques) ainsi qu'une échographie abdominale pour écarter un hypersplénisme (13).

Concernant la prise en charge thérapeutique, l'HAS recommande, chez l'adulte, l'instauration d'un traitement lorsque la thrombopénie est inférieure à 30 G/L (13). Le traitement de première ligne repose sur une corticothérapie *per os* pendant 2 à 3 semaines. L'association à des immunoglobulines intraveineuses se justifie en cas de syndrome hémorragique sévère. Les transfusions plaquettaires ne sont indiquées qu'en cas d'hémorragies menaçant le pronostic vital. Chez l'enfant, ce traitement de première ligne n'est instauré qu'en cas de thrombopénie inférieure à 10 G/L ou de manifestations hémorragiques sévères (13). En cas de PTI chronique avec échec du traitement de première ligne, la dapsonne ou le danazol peuvent être utilisés en attendant la splénectomie. En cas de contre-indication à la splénectomie ou de PTI réfractaire, les agonistes du récepteur de la TPO ont leur indication. Chez l'enfant, des études sont toujours en cours pour évaluer l'efficacité et la tolérance de ces traitements de deuxième ligne. La splénectomie n'est discutée que dans de rares cas étant donné le risque infectieux auquel elle expose.

### **III. Analyse des plaquettes par l'ADVIA® 2120**

L'ADVIA®2120, développé en 2004, constitue la version optimisée de l'ADVIA®120 mis sur le marché par Bayer Diagnostics en 1998 (*figure 32*). L'ADVIA®2120i lui a succédé en 2009. Ces appareils sont désormais distribués par Siemens Healthcare Diagnostics®.





Figure 32: ADVIA®120 (à gauche) et ADVIA®2120 (à droite)

### A. Principe de l'hématimètre ADVIA®2120

L'hématimètre ADVIA®2120 est un cytomètre de flux entièrement automatisé où la caractérisation des cellules repose sur une analyse bidimensionnelle de la lumière diffractée. L'appareil utilise cinq canaux d'analyse pour établir la numération des globules rouges, des globules blancs, des plaquettes et des réticulocytes et mesurer l'hémoglobine. Seule la méthode d'analyse des plaquettes et celle combinée aux globules rouges (GR) seront développées ici.

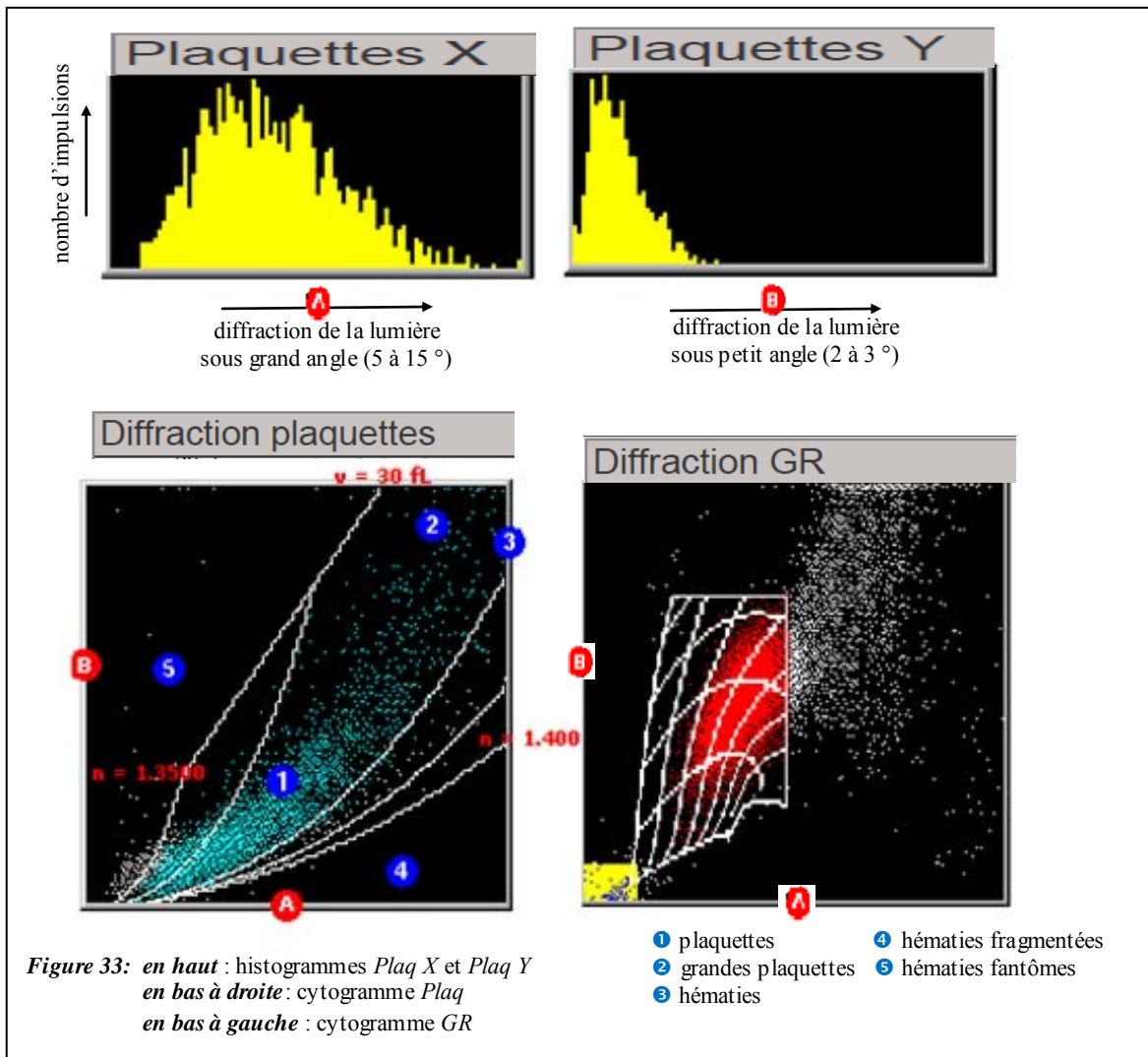
#### 1. Principe d'analyse des plaquettes et des érythrocytes

Après aspiration de 175 µL de sang, une vanne de cisaillement divise l'échantillon sanguin en aliquotes qui sont répartis dans les différents canaux. L'analyse des plaquettes et des érythrocytes dans le canal des globules rouges/plaquettes (GR/Plaq) nécessite au préalable une sphérisation des cellules au moyen d'un réactif contenant du dodécyl sulfate de sodium et du glutaraldéhyde. Cette étape permet de mesurer un signal identique quelle que soit la position de la cellule à son passage devant le laser (face ou profil).

L'analyse des plaquettes et des globules rouges s'effectue dans le bloc optique laser selon un principe d'hydrofocalisation dynamique, permettant une mesure de la diffraction lumineuse cellule par cellule. Selon la théorie de Mie sur la diffraction de la lumière appliquée à des sphères homogènes (137), les signaux de diffraction petit angle (2° à 3°) et grand angle (5° à 15°) mesurés sont respectivement convertis en volume cellulaire (la projection surfacique des plaquettes permet d'obtenir une taille elle-même transformée en volume) et en indice de réfraction (n).

L'ADVIA®2120 combine donc l'analyse d'une taille à une analyse de structure. Les cytogrammes de diffraction des plaquettes (Plaq) et des globules rouges (GR) sont la

représentation graphique des deux mesures de diffraction de la lumière (figure 33). La diffraction lumineuse à grand angle des plaquettes représentée sur l'axe des X du cytogramme *Plaq* est également représentée sur l'Histogramme *Plaq X* (figure 33). L'histogramme *Plaq Y* est la représentation de la diffraction lumineuse à petit angle qui correspond également à l'ordonnée du cytogramme *Plaq* (figure 33). Le cytogramme *Plaq* correspond à un agrandissement des mesures figurant dans le coin inférieur gauche du cytogramme *GR*.



Les plaquettes sont identifiées sur le cytogramme *Plaq* comme les événements de volume compris entre 1 et 30 fL et d'indice de réfraction (n) compris entre 1,35 et 1,40. La numération plaquettaire (NP) est établie selon l'algorithme suivant :

$$\text{Numération plaquettaire (G/L)} = \text{numération plaquette corrigée} \times \text{facteur d'étalonnage GR} \times \text{facteur étalonnage Plaq} \times \text{taux de dilution}$$

## **2. Intérêt de l'analyse combinée des globules rouges et des plaquettes**

La combinaison des mesures de taille et de densité utilisée par l'hématimètre ADVIA<sup>®</sup> assure un comptage précis des plaquettes en excluant des interférences liées à des particules de taille semblable aux plaquettes et en intégrant les grandes plaquettes.

### ***a) Exclusion des interférences liées aux microcytes et fragments de GR***

Les fragments de GR et les microcytes, connus pour interférer avec la numération plaquettaire dans les hématimètres fonctionnant par impédance (60), ont des propriétés de diffraction de la lumière qui leur sont propres. Ainsi, malgré un volume semblable aux plaquettes, ils s'en distinguent par un indice de réfraction supérieur à 1,40 dû à la présence d'hémoglobine. Les hématies fantômes se différencient également de la population plaquettaire par leur indice de réfraction inférieur à 1,35 lié à l'absence d'hémoglobine (54).

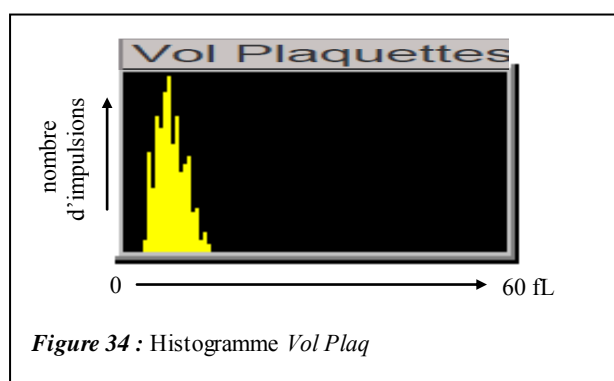
### ***b) Intégration des grandes plaquettes à la numération plaquettaire***

Les hématimètres à mesure par impédance sont également fréquemment limités avec la numération des grandes plaquettes (de volume supérieur à 20 fL) qui sont faussement intégrées à la numération des globules rouges (54). Sur les appareils ADVIA<sup>®</sup> à mesure optique, ces plaquettes sont clairement identifiées sur le cytogramme *Plaq* par leur indice de réfraction compris entre 1,35 et 1,40 et leur volume supérieur à 20 fL et sur le cytogramme *GR* par un indice de réfraction similaire et un volume inférieur à 60 fL (54). L'identification de ces plaquettes de grande taille permet de calculer le paramètre « **% Grandes plaquettes** » (% GP) qui indique le pourcentage de plaquettes dont le volume est supérieur à 20 fL. La numération de celle-ci s'effectue à partir de l'histogramme *Vol Plaq* qui représente la distribution log-normale des plaquettes en fonction de leur volume (*figure 34*). Une alarme « grandes plaquettes » est programmée pour se déclencher lorsque ce pourcentage de grandes plaquettes est supérieur à 10 % de la numération plaquettaire. Un autre cytogramme proposé par l'ADVIA<sup>®</sup> qui représente en abscisse l'indice de réfraction des plaquettes et en ordonnée leur volume montrent bien le nuage de grandes plaquettes distinct des globules rouges dans le continuum de la population plaquettaire (cytogramme *Volume / CP Plaq*, *figure 36*).

### 3. Calcul des autres paramètres

A partir des mesures de diffraction de la lumière, d'autres paramètres plaquettaires sont proposés par l'hématimètre ADVIA® 2120.

- Le **volume plaquettaire moyen (VPM)** est calculé à partir de l'histogramme *Vol Pla* (figure 34) qui représente la distribution des plaquettes en fonction de leur volume (compris entre 0 et 60 fL).
- Le **PDW, platelet volume distribution width (%)**, est un coefficient de variation du volume plaquettaire calculé par le rapport entre l'écart-type du VPM et le VPM. Il reflète le degré d'anisocytose plaquettaire.



- Le **plaquettocrite (PCT)** est calculé selon la formule suivante :

$$\text{PCT (\%)} = \text{Numération plaquettaire} \times \text{VPM} / 1000$$

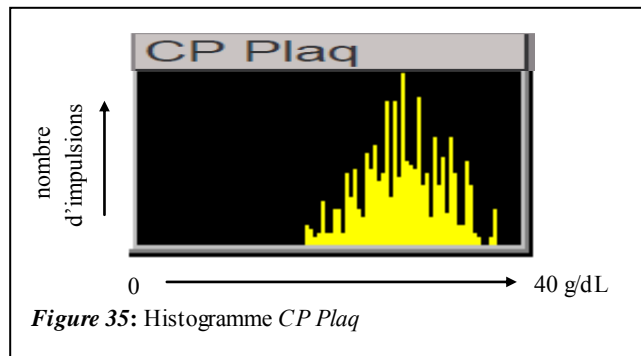
Il correspond au volume sanguin occupé par les plaquettes (46).

- L'indice de réfraction plaquettaire (n), corrélé à la densité plaquettaire, reflète la concentration des composés intra-plaquettaires (138). Il est converti en **concentration plaquettaire moyenne (MPC)** pour mean platelet component concentration) en le soustrayant à l'indice de réfraction de l'eau (1,333) et corrigé par un indice moyen (0,0018 dL/g). Celui-ci correspond à la moyenne pondérée des indices des différents composants des plaquettes (protéines, lipides, hydrates de carbone) (139).

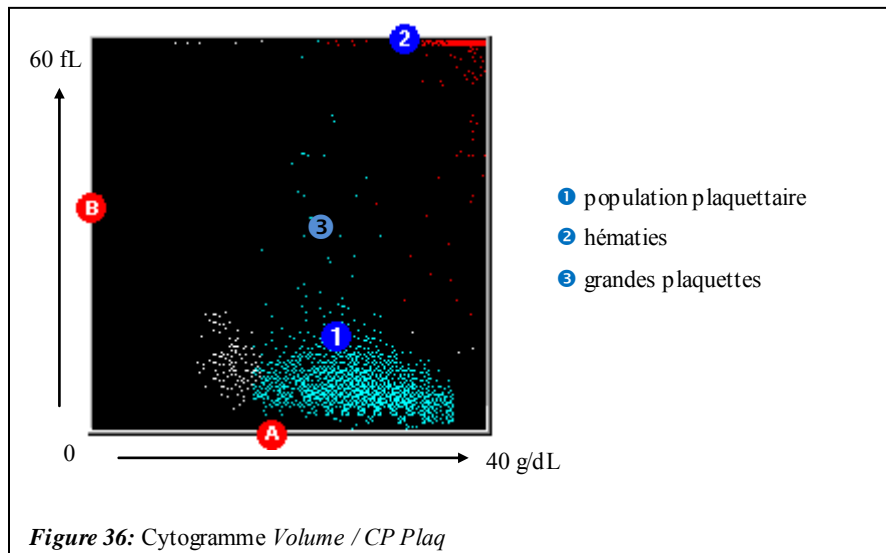
$$\text{MPC (g/dL)} = (n - 1,333) / 0,0018$$

Le **PCDW (platelet component distribution width)** correspond à l'écart-type de la distribution de la MPC.

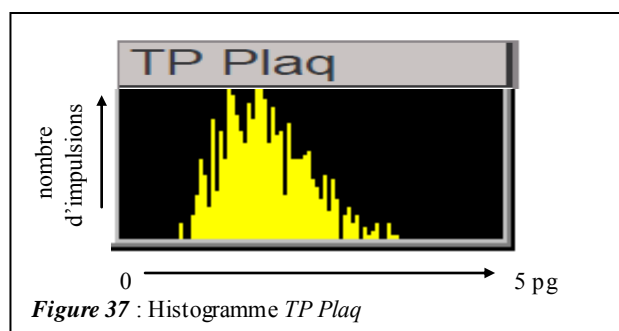
L'histogramme *CP Plaq* représente la distribution des plaquettes en fonction de la concentration plaquettaire. L'échelle varie en abscisse de 0 à 40 g/dL (figure 35).



Le cytogramme *Volume / CP Plaq* (figure 36) est une représentation en abscisse de la concentration plaquettaire (A) en fonction du volume plaquettaire (B).



- **Masse sèche plaquettaire** : l'histogramme *TP Plaq* est une représentation en deux dimensions de l'analyse des plaquettes montrant leur distribution en fonction de leur **masse sèche (TP)**. L'échelle de ce graphique s'étend de 0 pg à 5,0 pg (figure 37).



La masse sèche correspond au produit du volume par le contenu de chaque plaquette. La moyenne correspond au paramètre **MPM (mean platelet mass dry)** et l'écart-type de la MPM est exprimé par le **PMDW (platelet mass dry distribution width)** (45).

## **B. Valeurs de référence des paramètres plaquettaires et facteurs de variation**

Le réglage de l'hématimètre ADVIA<sup>®</sup> est effectué, selon les recommandations émises par le fabricant, par l'OPTIpoint<sup>™</sup> (Siemens) qui permet de positionner le laser et par un calibrateur (SETpoint<sup>™</sup>, Siemens) qui permet d'associer à un résultat numérique connu un nombre d'impulsions. Ce calibrant est défini par le fabricant pour la numération plaquettaire mais pas pour les autres paramètres plaquettaires.

- Brummit *et coll.* (2000) a réalisé une étude sur les paramètres plaquettaires mesurés par un hématimètre ADVIA<sup>®</sup>120 dans le but de proposer des valeurs de référence (45). Ces paramètres ont été évalués chez 122 individus (63 femmes et 59 hommes) âgés de 16 à 62 ans et mesurés à deux temps différents (30 minutes et 210 min après le prélèvement) dans le but d'évaluer la variabilité liée à l'âge, au sexe et au temps passé au contact de l'EDTA.

Concernant les variations liées à l'âge, Brummit *et coll.* (2000) ne rapporte pas de différences significatives pour tous les paramètres plaquettaires (45). En revanche, le sexe constitue un facteur de variation significatif mais pour lequel il n'y a aucun impact clinique. Concernant le tabac, si Brummit *et coll.* (2000) ne rapporte pas de différences significatives entre les sujets fumeurs et non fumeurs, une étude récente a conclu à un effet aigu du tabac sur l'activation plaquettaire mise en évidence par une augmentation du VPM (140).

Concernant les variations liées à l'EDTA présent dans le tube de prélèvement, il met en évidence une variation de certains paramètres en fonction du temps écoulé depuis le prélèvement. En effet, le VPM augmente avec le temps tandis que la MPC diminue de façon évidente. Bien que l'EDTA soit l'anticoagulant recommandé et le plus adapté pour la numération sanguine et la différenciation des populations leucocytaires, plusieurs études mettent en évidence son inaptitude à préserver l'ultra-structure des plaquettes et leur capacité fonctionnelle (141,142). Diaz-Ricart *et coll.* (2010) (143) rapporte une diminution significative des granules  $\alpha$  en microscopie électronique corrélée à une augmentation de l'expression du CD 62P (144) ainsi qu'une diminution du profil de phosphorylation des protéines. Il suggère d'ailleurs d'ajouter des inhibiteurs de la phosphorylation protéique dans le tube de prélèvement. Ma *et coll.* (2007) décrit une translocation membranaire de la

glycoprotéine GPIIb/IIIa (145). Patterson *et coll.* (1997) rapporte un grossissement des plaquettes et une perte de leur forme discoïde au-delà de 2 heures au contact de l'EDTA (146). D'autres anticoagulants comme le citrate préserveraient davantage la forme discoïde des plaquettes et influenceraient moins ces paramètres plaquettaires (45). Au-delà de 4 heures de contact avec l'EDTA, le VPM et la MPC ne sont plus fiables. La MPC, qui diminue de manière conséquente, reflète l'état d'activation plaquettaire et la dégranulation (147). Selon Macey *et coll.* (2002), un prélèvement sanguin réalisé dans un tube contenant du CTAD, conservé à 4 °C et analysé entre 1h et 3h après la ponction veineuse permettrait de préserver de manière optimale la MPC (144). Néanmoins, selon Bowles *et coll.* (2005), les variations du VPM liées à l'EDTA seraient moins importantes que celles observées dans un contexte de PTI (135). Elles ne remettraient donc pas en question son intérêt clinique (*cf* paragraphe C.).

- Giacomini *et coll.* (2001) a également mené une étude sur les paramètres plaquettaires mesurés par l'ADVIA®120 dans le but d'établir des valeurs de référence et d'identifier des facteurs de variation pré-analytiques (45). Les 500 individus témoins inclus dans cette étude ont été divisés selon 5 classes d'âge allant de 1 an à 85 ans. D'après cette étude, le sexe serait un facteur de variation de la numération plaquettaire, du PCT et de la MPC pour la tranche d'âge des 45-65 ans avec des valeurs plus élevées chez les femmes. Ils montrent également des différences significatives pour le VPM, la MPC et la MPM en fonction de l'âge. Il propose donc des valeurs de références en fonction de la tranche d'âge et également du sexe pour les individus âgés de 45 à 65 ans. Dans une étude portant sur 1822 individus âgés de 18 à plus de 80 ans, Lippi *et coll.* (2012) a également conclu à une augmentation du VPM lié à l'âge (148).

Si les valeurs de référence s'accordent entre ces deux études pour la numération plaquettaire et la MPM, elles diffèrent cependant pour la MPC, le VPM et le PCT.

Van Cott *et coll.* (2005) a étudié les variations subies par les paramètres plaquettaires en fonction du type de tube de collection et du temps de conservation de l'échantillon. Il confirme l'augmentation du VPM, et la diminution de la MPC, du PCDW et de la MPM avec le temps et ne montre pas de différence significative entre les mesures faites sur tube en plastique et celles sur tube en verre (149).

Latger-Cannard *et coll.* (2012) a évalué les variations du VPM en fonction du type de mesure utilisé par différents hématimètres (mesure par impédance et mesure optique bidimensionnelle). Sans revenir sur les limites des appareils à impédancemétrie pour l'identification des grandes plaquettes, cette étude a démontré une variabilité des valeurs de référence déterminées à partir d'une population de trente témoins entre les trois automates testés (ADVIA<sup>®</sup>2120, LH750<sup>®</sup> et Sysmex XE-2100D<sup>®</sup>). Comparativement à l'hématimètre LH750<sup>®</sup> (Beckman Coulter), l'ADVIA<sup>®</sup>2120 rend des valeurs de VPM inférieures avec un différentiel de -0,89 fL. Celles rendues par l'appareil Coulter sont elles-mêmes inférieures de 1,11 fL à celles du Sysmex XE-2100D<sup>®</sup>. Les variations observées entre l'ADVIA<sup>®</sup>2120 et le Sysmex<sup>®</sup> représentent ainsi une variation de 20 à 25 % des mesures. Hoffmann *et coll.* (2012) propose plusieurs explications à cette variabilité inter automates. Deux facteurs majeurs contribueraient à ces différences (150) : la technologie de mesure employée par l'automate et la façon dont est calculé le VPM. Bien que la mesure par impédancemétrie soit théoriquement plus adaptée puisque le signal mesuré est directement proportionnel au volume de la particule, on connaît les limites de cette technologie notamment dans la ségrégation plaquettes/microcytes responsables d'interférences dans la numération plaquettaire et l'estimation du VPM. Quant à la mesure optique, elle est moins sujette à ce type d'interférences mais la mesure de la lumière transmise est proportionnelle à la structure et au contenu des particules. La dégranulation des plaquettes *in vitro* consécutive à leur activation ainsi qu'une dilution du contenu cytoplasmique plaquettaire par le réactif utilisé pour la sphérisation des cellules peuvent donc modifier la détermination du VPM. Au-delà de la technologie utilisée, les variations inter-automates s'expliquent par le mode de calcul du VPM. Du fait d'une distribution non gaussienne du volume plaquettaire, les fabricants des automates utilisent un logarithme qui transforme les données avant le calcul du VPM. Ce logarithme n'est pas toujours adapté, surtout dans les cas où la population plaquettaire est très hétérogène et s'écarte de façon importante d'une population gaussienne. L'estimation du VPM est alors incorrecte. De plus, les fabricants limitent le calcul du VPM aux particules dont le volume est compris dans un certain intervalle qu'ils ont défini dans le but d'augmenter la précision de leur algorithme. Cet intervalle varie d'un automate à un autre (150).

L'étude de Latger-Cannard *et coll.* (2012) démontre donc les limites de la comparaison du VPM mesuré d'un laboratoire à un autre et dénonce l'absence de standardisation. Un contrôle externe de qualité serait utile pour évaluer l'exactitude de ces mesures. Et il apparaît



nécessaire que chaque laboratoire établisse ses propres valeurs de référence pour tous les paramètres plaquettaires (20).

## **C. Utilisation des paramètres plaquettaires**

### **1. Volume plaquettaire moyen**

Le VPM est le paramètre permettant d'apprécier la taille des plaquettes. Plusieurs facteurs interviennent dans la régulation de la taille plaquettaire. Elle est déterminée par la mégacaryopoïèse et la thrombopoïèse et ne serait pas corrélée à l'âge des plaquettes (151). Des études ont montré une relation positive directe entre le VPM et le taux de TPO et d'IL-6, cytokines régulant la ploïdie des MK et le nombre de plaquettes synthétisées.

Cet équivalent du volume globulaire moyen (VGM) chez les globules rouges tend à se faire une place dans l'hémoграмme. Depuis plusieurs années, nombreuses études tentent d'évaluer son intérêt clinique dans des domaines variés.

#### ***a) VPM et étiologie d'une thrombopénie***

Dans un contexte de thrombopénie qui peut nécessiter une prise en charge rapide du fait du risque hémorragique, la connaissance de son mécanisme est essentielle. En particulier, il est important de savoir si la thrombopénie résulte d'une diminution de la production ou d'une hyper-destruction plaquettaire. Dans ce sens, le VPM constitue un point-clé du diagnostic étiologique d'une thrombopénie. Plusieurs études ont souligné l'avantage de l'utilisation du VPM pour déterminer la nature régénérative d'une thrombopénie. Un VPM augmenté reflèterait la capacité de régénération de la moelle osseuse et l'augmentation du nombre de MK. Plusieurs auteurs ont d'ailleurs proposé des valeurs seuils permettant de différencier une thrombopénie centrale d'une origine acquise. Bowles *et coll.* (2005) conclut qu'un VPM supérieur à 9,8 fL mesuré sur Gen-S<sup>®</sup> Beckman Coulter exclurait l'origine médullaire de la thrombopénie tandis qu'un VPM inférieur à 8,1 fL serait en faveur d'une cause centrale (133). Kaito *et coll.* (2005) propose un seuil de VPM à 11 fL (mesuré sur Sysmex XE-2100<sup>®</sup>) au-delà duquel le diagnostic retenu est un PTI avec une spécificité de 87,2 % et une sensibilité de 80 % (134). Selon Ntaios *et coll.* (2008), un VPM supérieur à 9,0 fL (Sysmex XE-2100<sup>®</sup>) permettrait de différencier une thrombopénie périphérique d'une origine centrale post-chimiothérapie avec une sensibilité et une spécificité de 100 % (135). Enfin Numbenjapon *et coll.* (2008) propose une valeur seuil à 7,9 fL (STKS<sup>®</sup> Beckman Coulter) (136). Il souligne cependant les limites de l'utilisation du VPM pour des thrombopénies inférieures à 20 fL. Cette variabilité dans les valeurs seuils de VPM proposées pourrait s'expliquer par les

différents automates utilisés (20). Tous ces auteurs insistent particulièrement sur la simplicité d'obtention du VPM par rapport au myélogramme ou la recherche d'anticorps antiplaquettaires qui est peu fiable. Son intérêt concerne surtout le PTI qui est un diagnostic d'exclusion pour lequel il n'y a pas de tests spécifiques (134–136).

Le VPM a également été évalué pour différencier une thrombopénie périphérique d'une macrothrombopénie constitutionnelle (77). Noris *et coll.* (2009) a démontré que le VPM était augmenté par rapport à une population témoin dans le PTI et de façon encore plus importante dans deux thrombopénies constitutionnelles à plaquettes géantes (la maladie de Bernard-Soulier et le syndrome MYH9). Il conclut qu'une valeur seuil de VPM établie à 12,4 fL (Sysmex XE-2100<sup>®</sup>) permettrait de différencier une thrombopénie constitutionnelle d'un PTI avec une sensibilité de 83 % et une spécificité de 89 % (77). Dans ce contexte, le VPM est déjà utilisé comme critère de classification des thrombopénies constitutionnelles (68,111).

Enfin, l'intérêt du VPM a également été souligné par l'équipe de Gerday (2009) pour gérer les transfusions plaquettaires dans le cadre des thrombopénies néonatales (152).

Bien que l'intérêt du VPM ait été démontré dans le bilan étiologique d'une thrombopénie, son utilisation reste limitée dans des contextes complexes associant une diminution de la thrombopoïèse et une hyperdestruction périphérique ou lors d'un hypersplénisme (135,136).

### ***b) VPM et maladies thrombotiques***

Etant donné le rôle des plaquettes dans les événements thrombotiques, nombreuses études ont évalué le VPM dans des contextes de thromboses artérielles et veineuses. Chu *et coll.* (2010) a réalisé une méta-analyse de l'ensemble des études évaluant la variation du VPM dans l'infarctus du myocarde (151). Il rapporte une augmentation du VPM au diagnostic d'infarctus du myocarde par rapport à une population présentant une maladie coronarienne stable, un angor instable ou indemne de maladie coronarienne. Le différentiel était de 0,92 fL. Une augmentation du VPM avait déjà été constatée chez des sujets présentant des facteurs de risques cardiovasculaires comme le diabète, l'hypertension, l'hypercholestérolémie, le tabac et l'obésité (153,154). Une augmentation de 0,98 fL a également été relevée chez les individus présentant une resténose coronarienne dans les suites de l'angioplastie. Enfin, parmi les individus ayant déclaré un infarctus du myocarde, ceux ayant un VPM augmenté auraient un risque de mortalité plus élevé. Cette méta-analyse soulève donc l'intérêt du VPM,

marqueur simple et facilement dosable, comme bio-marqueur pronostic chez le patient souffrant de maladies cardiovasculaires. Le mécanisme physiopathologique expliquant le lien entre l'élévation du VPM et la progression d'une maladie coronarienne est mal élucidé. Mais on sait que les grandes plaquettes sont plus actives sur le plan enzymatique et métabolique que les petites. Leur potentiel pro-thrombotique est augmenté par une augmentation du TXA2, de l'expression de GPIIb/IIIa et des granules  $\alpha$  qui contiennent également des substances pro-thrombotiques comme la P-sélectine et le PF4 (155).

Dans le cadre des manifestations thrombotiques veineuses, Braekkan *et coll.* (2010) a démontré une augmentation significative du VPM indépendamment de la numération plaquettaire et a discuté de l'intérêt du VPM comme facteur prédictif de thromboses veineuses profondes (156). L'intérêt du VPM a également été abordé par Kamisli *et coll.* (2012) comme facteur prédictif de la sévérité des thromboses d'un sinus veineux cérébral. Il a, en effet, mis en évidence une augmentation plus importante du VPM en cas de souffrance du parenchyme cérébral associée à la thrombose (157).

La CIVD correspond à une activation généralisée de l'hémostase, de la coagulation et de la fibrinolyse à l'origine d'une thrombopénie et d'une coagulopathie de consommation. Une augmentation du VPM plus importante chez les individus n'ayant pas survécu à cet emballement de la coagulation a été mise en évidence par Kim *et coll.* (2008) par rapport aux survivants (158).

### ***c) VPM et maladies inflammatoires***

Plusieurs études ont étudié le VPM comme un marqueur de l'inflammation. Il a été rapporté que ce paramètre plaquettaire était sensible à un contexte inflammatoire. Notamment, une augmentation du VPM a été démontrée dans le sepsis, les syndromes de détresse respiratoire et les maladies pulmonaires chroniques (159). L'augmentation du VPM corrélée à celle de l'IL-6, cytokine pro-inflammatoire, corrobore ces résultats (160). En revanche, une diminution du VPM a été mise en évidence dans les maladies inflammatoires de l'intestin et l'appendicite de l'adulte et de l'enfant. L'hypothèse explicative retenue est la consommation et la séquestration des plaquettes de grande taille dans les vaisseaux irriguant les territoires inflammés (161). Cette diminution du VPM a également été mise en évidence dans la spondylarthrite ankylosante, la polyarthrite rhumatoïde et le syndrome de Kawasaki (162,163).

## **2. Coefficient de variation du volume plaquettaire, PDW**

Le PDW est un indice d'anisocytose plaquettaire qui reflète la variation de volume plaquettaire. Il a été étudié dans une population souffrant de manifestations thrombotiques (thrombose veineuse profonde, infarctus du myocarde) qui présente une activation des plaquettes. Il a été démontré une augmentation du PDW par rapport à une population témoin. Elle s'explique par le changement de forme des plaquettes activées et l'émission de pseudopodes (164). Dans un contexte similaire, Kamisli *et coll.* (2012) a discuté de l'intérêt du PDW associé au VPM comme facteur prédictif de la sévérité de thromboses d'un sinus veineux cérébral (157). Amin *et coll.* (2004) a également mis en évidence une augmentation du PDW chez les enfants souffrant de drépanocytose chez lesquels était suspectée une crise vaso-occlusive (165).

Comme pour le VPM, Ntaios *et coll.* (2008) démontre une augmentation significative du PDW dans le PTI par rapport à une thrombopénie d'origine centrale et propose un cut-off à 15 fL (Sysmex XE-2100<sup>®</sup>) pour le PDW (135). D'autres auteurs concluent au même résultat (134).

L'intérêt du PDW a surtout été étudié dans le diagnostic différentiel entre la thrombocytose réactionnelle et la thrombocytose associée à un syndrome myéloprolifératif. Une augmentation plus importante du PDW a été observée dans les syndromes myéloprolifératifs par rapport aux thrombocytoses réactionnelles (166,167).

## **3. Plaquettocrite, PCT**

L'équipe de Gerday (2009) a montré l'intérêt du VPM et du plaquettocrite (PCT) pour définir les indications de transfusions plaquettaires dans les thrombopénies néonatales. Notamment, un suivi attentif de ces paramètres permettait de réduire les indications transfusionnelles sans augmenter la survenue d'hémorragies (152).

Ce paramètre a également démontré son intérêt dans le diagnostic différentiel entre thrombocytose réactionnelle et thrombocytémie essentielle. Un PCT supérieur à 0,63 % est en faveur d'une thrombocytémie essentielle avec une spécificité de 80,0 % et une sensibilité de 80,6 % (167).

## **4. Concentration plaquettaire moyenne, MPC**

L'activation plaquettaire est impliquée dans de nombreux désordres pathologiques (thrombose, cancer, maladies inflammatoires). L'évaluation et la surveillance de l'état activé des plaquettes chez un patient peuvent s'avérer pertinentes. L'activation des plaquettes se

manifeste par leur changement de forme et leur dégranulation. Elle se traduit par la translocation de marqueurs de la membrane granulaire à la surface des plaquettes comme la P-sélectine (CD 62P) dont l'expression peut être mesurée par CMF. L'expression de CD 63, la fixation d'annexine V ou encore l'émission de microparticules mesurées par CMF permettent également d'évaluer l'activation plaquettaire (168). Dans le but d'utiliser une méthode de détection plus aisée que la CMF, Macey *et coll.* (1999) a étudié l'intérêt de la MPC mesurée par un hématimètre ADVIA<sup>®</sup> (147). En stimulant l'activation de plaquettes par de la thrombine bovine, il met en évidence une augmentation de l'expression de CD 62P par CMF corrélée à une diminution de la MPC sur l'ADVIA<sup>®</sup>. Cette relation négative entre l'expression de CD 62P et la MPC a été confirmée dans un PRP stimulé par de l'ADP, dans des pools plaquettaires conservés jusqu'à 13 jours ainsi que dans des produits plaquettaires destinés à la transfusion (168–170). La détection de l'activation plaquettaire est importante dans ce contexte car il est maintenant admis que des plaquettes transfusées à l'état activé ont un moins bon potentiel de survie (67).

Plusieurs études épidémiologiques ont établi un lien entre une hyperactivité plaquettaire et une augmentation des événements cardiovasculaires. L'efficacité des traitements antiagrégants plaquettaires dans la diminution du risque d'évènements vasculaires en est la preuve. L'intérêt de la MPC dans la prévention de ces maladies a donc été étudié. Une diminution de la MPC a été rapportée dans la thrombocytémie essentielle ainsi que dans l'hypertension artérielle (154,171). Bae *et coll.* (2003) a également décrit une diminution de la MPC chez des patients présentant une rétinopathie diabétique et conclue à une activation plaquettaire pour une valeur de MPC inférieure à 26,7 g/dL (172). Enfin, Ahnadi *et coll.* (2004) rappelle la variabilité de réponse interindividuelle aux traitements anti-agrégants plaquettaires et le risque associé d'évènements hémorragiques. Il démontre, alors, l'intérêt de la MPC pour rechercher une activation plaquettaire chez des patients ayant un syndrome coronarien aigu, définir les patients candidats à un traitement anti-agrégant plaquettaire et suivre la réponse à ce traitement (173).

## **5. Ecart-type de la concentration plaquettaire, PCDW**

Le PCDW mesure la variation de densité plaquettaire.

Comme pour la MPC, il a été démontré une corrélation inverse entre le PCDW et l'expression de CD 62P dans des pools plaquettaires prélevés sur EDTA et citrate. Cette corrélation n'est pas retrouvée pour les plaquettes issues d'aphérèse. La MPC représente un meilleur marqueur d'activation plaquettaire dans ce contexte (168). Dans des produits plaquettaires destinés à la

transfusion, le PCDW diminue également parallèlement à l'activation des plaquettes mais cette diminution ne survient qu'au bout de 5 jours de conservation (170). Selon Lim *et coll.* (2002), le PCDW serait le paramètre le plus sensible pour mettre en évidence une altération des plaquettes conservées. Il refléterait plus précocement un changement de forme plaquettaire en rapport avec leur altération (174).

Une diminution de ce paramètre est rapportée dans l'hypertension artérielle (154) tandis qu'une augmentation est décrite dans la thrombocytémie essentielle ainsi que dans la CIVD associée à une plus forte mortalité (158,171).

### **6. Pourcentage de grandes plaquettes, %GP**

Kaito *et coll.* (2005) montre dans son étude comparative entre PTI et thrombopénie centrale non seulement une augmentation du VPM, du PDW mais également du %GP associée au PTI (134). Parmi les trois paramètres, PDW et %GP seraient les plus fiables. En revanche selon Ntaios *et coll.* (2008), le VPM et le PDW ont montré leur supériorité (135).

Song *et coll.* (2009) a également démontré son intérêt dans le diagnostic différentiel entre thrombocytose réactionnelle et thrombocytémie essentielle. Une numération des grandes plaquettes supérieure à 23 G/L est en faveur d'une thrombocytémie essentielle avec une spécificité de 99,1 % et une sensibilité de 64,5 % (167).

### **7. Masse plaquettaire moyenne, MPM**

La MPM est l'équivalent de la TCMH (teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine) pour les globules rouges. Ce paramètre a peu été étudié et son intérêt semble limité.

Une augmentation de la MPM a été rapportée dans l'hypertension artérielle ainsi que dans la thrombocytémie essentielle (augmentation significativement plus importante que dans la thrombocytose réactionnelle (154,167).

### **8. Ecart-type de la masse plaquettaire, PMDW**

Peu d'études lui sont consacrées. Dans le cadre de la CIVD, Kim *et coll.* (2008) démontre une augmentation de ce paramètre associée à un mauvais pronostic (158).

En dépit de la valeur diagnostique ou pronostique de certains paramètres, l'amélioration de la stabilité des échantillons sanguins, le respect de conditions préanalytiques strictes ainsi que l'établissement de valeurs de référence propres à chaque laboratoire sont nécessaires pour l'obtention de mesures précises et une utilisation clinique pertinente.

**OBJECTIFS**

**DU**

**TRAVAIL**



Les pathologies constitutionnelles plaquettaires correspondent à des déficits ou à des anomalies fonctionnelles des plaquettes résultant de mutations génétiques. Avec une prévalence estimée à 1/30000 en France (71), ce groupe de pathologies reste rare et méconnu des équipes médicales non spécialistes confrontées à la prise en charge d'une thrombopénie ou de manifestations hémorragiques chroniques. Bien que la connaissance de la physiologie plaquettaire et de la mégacaryopoïèse ait largement progressé parallèlement à l'utilisation d'outils d'analyses moléculaires performants, toutes les bases moléculaires n'ont pas été identifiées et plusieurs cas de thrombopénies constitutionnelles ne s'inscrivent pas parmi les nombreuses entités déjà décrites. Le diagnostic des thrombopénies ou thrombopathies constitutionnelles reste donc difficile à établir mais les conséquences, en cas d'erreur, peuvent s'avérer délétères pour le patient. Plusieurs cas de diagnostics erronés de PTI ont été établis aboutissant à un traitement médicamenteux inapproprié voire à une splénectomie. Des progrès en terme de sensibilisation du corps médical mais aussi dans la reconnaissance phénotypique de ces nombreuses entités doivent encore être faits afin de mieux orienter la recherche moléculaire et adopter la prise en charge thérapeutique adaptée.

Depuis de nombreuses années, le marché de l'analyse hématologique propose des hématimètres à impédancemétrie et d'autres à mesure optique. Bien que le gold standard pour la numération plaquettaire reste la CMF (62), l'ADVIA<sup>®</sup>2120, appareil à mesure optique, a montré sa supériorité en terme de précision de la numération plaquettaire par rapport à la technologie Coulter, grâce à l'analyse bidimensionnelle combinée des plaquettes et des globules rouges (20,54,55). Plusieurs paramètres plaquettaires sont directement disponibles à partir du logiciel d'exploitation de l'ADVIA<sup>®</sup> donnant des informations sur l'hétérogénéité de la taille des plaquettes ainsi que sur leur contenu et la masse plaquettaire (PCT, VPM, GP, PDW, MPC, PCDW, MPM, PMDW). S'ils ont déjà fait l'objet d'études dans des domaines très variés comme les maladies thrombotiques, les thrombocytoses (thrombocytémie essentielle et thrombocytoses inflammatoires) ou encore comme indicateurs de conservation des produits de transfusion plaquettaire (151,153,154,156,167,170,174), peu de recherches leur ont été consacrées concernant les thrombopénies constitutionnelles comparativement aux thrombopénies immunes ou à des sujets sains. Seule une étude a décrit le VPM dans l'ensemble des thrombopénies constitutionnelles et a abouti à la classification de ces pathologies selon la taille plaquettaire (68).



L'étude que nous proposons ici est multicentrique et rétrospective et consiste à analyser l'ensemble de ces paramètres plaquettaires innovants dans une population d'individus suivis pour diverses thrombopénies ou thrombopathies constitutionnelles par les biologistes référents des CRPP des CHU de Nancy, Marseille et de l'hôpital Kremlin-Bicêtre APHP à Paris, respectivement dirigés par Dr V. Latger-Cannard, Pr M.C. Alessi et Dr M. Dreyfus.

Les objectifs de cette étude sont les suivants :

- 1- Connaître la répartition de l'ensemble des paramètres plaquettaires de l'ADVIA<sup>®</sup> 2120 pour une population de sujets témoins inclus à partir des trois CRPP. Cette première phase de l'étude nous a permis d'évaluer la variabilité inter-centres.
- 2- Etudier la répartition de ces paramètres plaquettaires pour chaque pathologie plaquettaire constitutionnelle suivie dans ces trois centres par rapport aux valeurs déterminées pour les témoins. Cette deuxième phase de l'étude a pour objectif de déterminer s'il est possible de caractériser chaque thrombopénie constitutionnelle par une « identité phénotypique plaquettaire ».
- 3- Le diagnostic différentiel des thrombopénies constitutionnelles étant principalement les thrombopénies immunes idiopathiques, le troisième objectif est de connaître la distribution de l'ensemble de ces paramètres plaquettaires pour une population de patients suivis pour un PTI et de les comparer à ceux trouvés pour la population de sujets témoins.

L'objectif final de ce travail est de montrer la potentielle application clinique de l'utilisation des paramètres plaquettaires en pratique courante puisqu'il s'agit de mesures disponibles directement, sans surcoût financier. La détermination d'une « identité phénotypique plaquettaire » permettrait dans un premier temps de différencier une thrombopénie constitutionnelle d'une thrombopénie immune idiopathique. Cette étape de dépistage permettrait, dans un second temps, de mieux orienter les analyses plaquettaires fonctionnelles complémentaires et par conséquent de mieux cibler le diagnostic moléculaire pour caractériser la thrombopénie constitutionnelle.

**MATERIELS**

**ET**

**METHODES**



## **I. Critères d'inclusion des sujets**

### **A. Témoins**

Comme nous l'avons vu dans la partie consacrée (*cf paragraphe III B*), les diverses études publiées sur les paramètres plaquettaires insistent sur les variabilités inter-laboratoires et inter-automates et l'importance d'établir des valeurs de référence pour chaque laboratoire. Ces valeurs ont donc été établies à partir d'une population témoin pour chacun des trois centres inclus.

La population témoin de Nancy a été sélectionnée parmi les donneurs de sang de l'EFS (Etablissement français du sang) de Brabois/Vandoeuvre-lès-Nancy. Les 86 témoins se constituent de 35 femmes et 51 hommes. Les hémogrammes collectés faisaient partie du bilan biologique systématique nécessaire à la qualification biologique du don.

Les populations de témoins de Marseille et de Paris comportent respectivement 22 et 34 individus « sains » (hommes et femmes).

### **B. Patients présentant une thrombopénie constitutionnelle**

L'ensemble des patients inclus présente une thrombopénie ou une thrombopathie constitutionnelle dont le diagnostic a été établi selon des critères cliniques, biologiques et moléculaires (*cf partie consacrée II*). Tous les hémogrammes collectés ont été réalisés au cours d'une consultation de suivi au CRPP.

Quarante-trois patients, suivis au Centre de Compétence des Pathologies Plaquettaires (CCPP) Nord-Est (CHU Nancy, coordonnateur : Dr V. Latger-Cannard) pour une thrombopénie constitutionnelle, sont inclus dans notre étude. Les patients qui n'ont pas été suivis depuis l'année 2006 ont été exclus faute de sauvegarde informatique des données des automates ADVIA<sup>®</sup> avant cette date.

A Marseille, le suivi des patients est assuré par le Centre d'Exploration des maladies Hémorragiques et Thrombotiques, également CRPP (coordonnateur : Pr M.C. Alessi), qui collabore avec le laboratoire d'hématologie biologique de la Timone. Vingt patients supplémentaires ont été inclus.

A Paris, 31 patients suivis pour une thrombopénie constitutionnelle ont été inclus (CRPP Kremlin-Bicêtre, coordonnateur : Dr M. Dreyfus).

### **C. Patients suivis pour un PTI**

Quatre-vingt douze patients suivis pour un PTI par les médecins des services de pédiatrie et hématologie clinique des hôpitaux de Nancy et Marseille ont été inclus. Le diagnostic avait été établi par exclusion des diagnostics différentiels de thrombopénie acquise sur la base des examens biologiques décrits dans la partie consacrée (*cf paragraphe II)C-2*).

La population de PTI incluse à Nancy comprend 15 adultes et 10 enfants présentant une forme aiguë de PTI. Vingt-quatre adultes et 10 enfants sont suivis pour un PTI chronique. Concernant les cas de PTI inclus à Marseille, il s'agit exclusivement d'enfants dont 10 cas de PTI chronique et 23 cas de PTI aigu.

Le diagnostic de PTI chronique a été retenu après un an d'évolution selon la définition de l'HAS (13).

Les hémogrammes collectés ont été réalisés au moment du diagnostic de PTI ou au cours du suivi.

## **II. Matériels**

Les hémogrammes analysés dans notre étude ont été rendus par des hématimètres ADVIA<sup>®</sup> de différentes générations. Le laboratoire d'hématologie biologique de Nancy est équipé de deux ADVIA<sup>®</sup>2120, celui de Marseille de deux ADVIA<sup>®</sup>120 et enfin l'hôpital Kremlin-Bicêtre à Paris utilise un ADVIA<sup>®</sup>2120.

Chacun des appareils est soumis à un réglage du laser (OPTIpoint<sup>™</sup>, Siemens) permettant un bon positionnement du nuage de cellules selon des paramètres GR X et GR Y donnés par le fournisseur, ainsi qu'à un étalonnage complet au moment de l'installation et en cas de dérive des mesures de contrôles (calibrateur SETpoint<sup>™</sup>, Siemens), selon les recommandations du fabricant. Cet étalonnage permet d'associer à un résultat numérique connu un nombre d'impulsions.

La vérification de la calibration des appareils ainsi que le suivi de leur précision et exactitude sont réalisés par le passage de contrôles de qualité internes quotidiens (TESTpoint<sup>™</sup> 3.en.1, Siemens). Ils évaluent à trois niveaux différents (valeurs basses, hautes et normales) la numération des cellules sanguines (globules rouges, globules blancs, plaquettes, réticulocytes) et la formule leucocytaire. Parmi l'ensemble des paramètres plaquettaires étudiés, seule la numération plaquettaire est étalonnée et contrôlée. Le VPM est uniquement suivi par un contrôle. Aucun suivi n'est effectué pour tous les autres paramètres.

Chaque ADVIA<sup>®</sup> est muni d'un logiciel de relecture (logiciel PlayBack) qui fonctionne sous le système d'exploitation Windows. Il constitue une interface possible entre l'analyseur et le technicien pour la gestion de l'appareillage et des données analytiques.

### **III.Méthodologie**

Tous les hémogrammes inclus dans notre étude sont issus de l'analyse d'échantillons de sang total réalisée dans les quatre heures suivant le prélèvement, à l'aide d'un tube EDTA (conformément aux recommandations en vigueur - GBEA, NF ISO15189). Chacun des trois laboratoires dispose de sauvegarde de ces hémogrammes sous forme de « raw datas » directement dans l'unité centrale ADVIA<sup>®</sup>, soit sur cédérom ou sur un disque dur externe pour les plus anciennes. Les données issues des trois laboratoires ont donc été centralisées au service d'hématologie biologique du CHU de Nancy sous ce format et ont toutes été traitées par l'ADVIA<sup>®</sup> 2120.

#### **A. Traitement des raw datas**

Les raws datas correspondent à des données brutes directement issues de l'analyseur qui nécessitent d'être relues par le logiciel d'exploitation d'ADVIA<sup>®</sup> (logiciel Playback). Ce logiciel permet, entre autre, d'accéder à l'« écran Run » qui affiche toutes les informations sur chaque échantillon après relecture par l'analyseur. Il comporte des paramètres de calculs intermédiaires, des alarmes échantillons/systèmes ainsi que des alarmes morphologiques et d'autres paramètres utiles qu'au laboratoire et qui ne sont pas destinés au rapport patient. Les paramètres plaquettaires explorés dans notre étude ne figurent pas sur le compte-rendu d'analyse à destination du prescripteur et ne sont accessibles qu'à partir de cet écran Run.

La lecture des raw datas issues des différents hématimètres ADVIA<sup>®</sup> par un seul et même logiciel Playback a permis d'interpréter de façon uniforme les cytogrammes selon la version de logiciel de l'ADVIA<sup>®</sup> de Nancy (réglages qui conditionnent le positionnement des courbes isovolumétriques et isoconcentrationnelles des cytogrammes Plaq et GR) et de s'affranchir de cette source de variation entre les trois automates inclus dans l'étude. Cependant, cette méthodologie ne permet pas de tenir compte des variations de réglage des lasers des différents ADVIA<sup>®</sup>.

L'ingénieur Applications Siemens a apporté une aide logistique importante sur les aspects méthodologiques de cette étude en configurant l'écran Run de façon à ne faire figurer que les

paramètres plaquettaires d'intérêt. Il a également établi une macro permettant de générer un tableau excel pour chaque échantillon analysé facilitant ainsi l'exploitation de ces données.

## **B. Analyse des données recueillies**

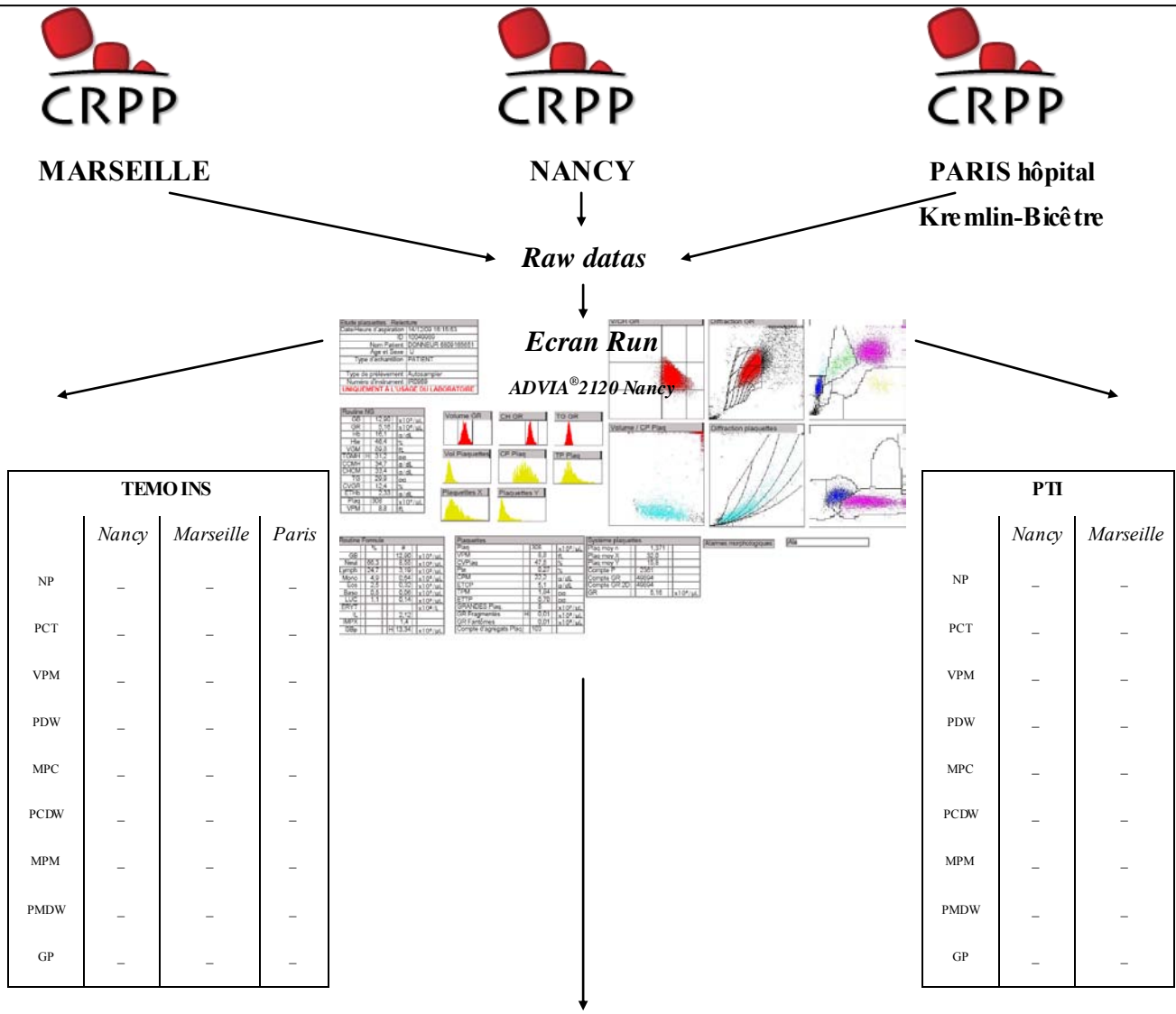
En partant de l'hypothèse que les paramètres plaquettaires étudiés possède une distribution normale, des valeurs de référence ont été définies pour chacun d'entre eux et pour chacune des trois populations de témoins selon l'intervalle  $[m - 1,96 \sigma ; m + 1,96 \sigma]$  où  $m$  correspond à la valeur moyenne et  $\sigma$ , l'écart-type (*tableau IV*). D'après la loi normale de distribution d'une population, cet intervalle représente 95 % de cette population. Ces valeurs de référence ont ensuite été comparées entre elles et à celles publiées dans la littérature (45,46).

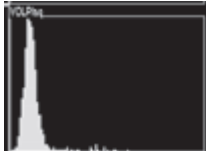
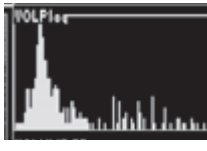
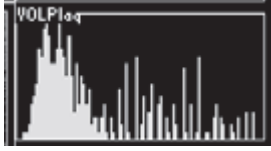
Les thrombopénies constitutionnelles ont été classées en fonction de la taille plaquettaire attendue dans différentes catégories (thrombopénies à petites plaquettes, à plaquettes normales, à macroplaquettes et à plaquettes géantes). Cette classification a été établie à partir des travaux menés par l'équipe de Dr Latger-Cannard qui avaient consisté à catégoriser la taille des plaquettes en fonction du profil de la courbe volumétrique plaquettaire, des mesures de VPM effectuées sur les automates ADVIA<sup>®</sup>2120, LH750<sup>®</sup> et XE-2100D<sup>®</sup> et de l'aspect des plaquettes à l'examen du frottis (*cf paragraphe I)D-1-a-(2)*) (20).

Concernant les patients suivis à Nancy, l'analyse des plaquettes sur le frottis sanguin et par les trois automates cités ci-dessus avaient été réalisées systématiquement au moment du diagnostic de la thrombopénie constitutionnelle.

Certaines entités cliniques présentes dans la base de données de Marseille ou Paris et absentes de celle de Nancy n'ont pas fait l'objet de cette analyse combinée par les trois automates. Leur classification en fonction de la taille des plaquettes a donc été établie en fonction du VPM des patients et des données de la littérature (68).

**ETUDE COMPARATIVE RETROSPECTIVE ET MULTICENTRIQUE DES PARAMETRES PLAQUETTAIRES DANS LES THROMBOPENIES CONSTITUTIONNELLES, LES PTI ET UNE POPULATION TEMOIN : METHODOLOGIE**



THROMBOPENIES et THROMBOPATHIES CONSTITUTIONNELLES				
	Plaquettes de petite taille	Plaquettes de taille normale	Macroplaquettes	Plaquettes géantes
				
<i>d'après Latger-Cannard et coll., 2012 (20)</i>				
NP	-	-	-	-
PCT	-	-	-	-
VPM	-	-	-	-
PDW	-	-	-	-
MPC	-	-	-	-
PCDW	-	-	-	-
MPM	-	-	-	-
PMDW	-	-	-	-
GP	-	-	-	-

# RESULTATS





## I. Sélection des données par analyse des cytogrammes et histogrammes plaquettaires

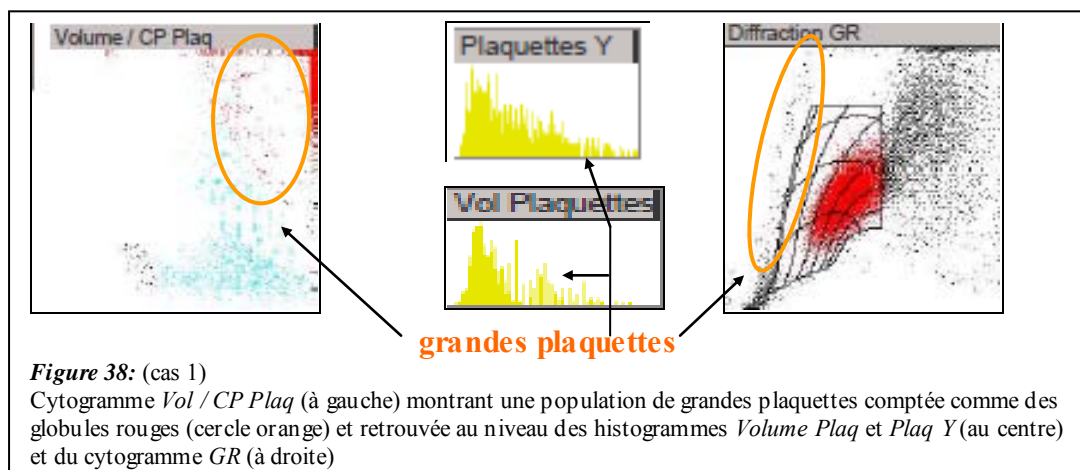
Avant de procéder à une comparaison des paramètres plaquettaires entre la population témoin et les patients inclus, l'ensemble des datas a été rigoureusement analysé et notamment les histogrammes et cytogrammes plaquettaires. Il s'agissait à travers cette analyse de mettre en évidence des potentiels problèmes analytiques de l'ADVIA<sup>®</sup> qui pourraient biaiser les résultats des paramètres plaquettaires.

Sur les 186 données (correspondant aux 186 patients inclus), 31 ont été exclues. La principale anomalie analytique mise en évidence par l'analyse des cytogrammes plaquettaires, ayant conduit à l'exclusion des données, a été un défaut d'identification de la population plaquettaire.

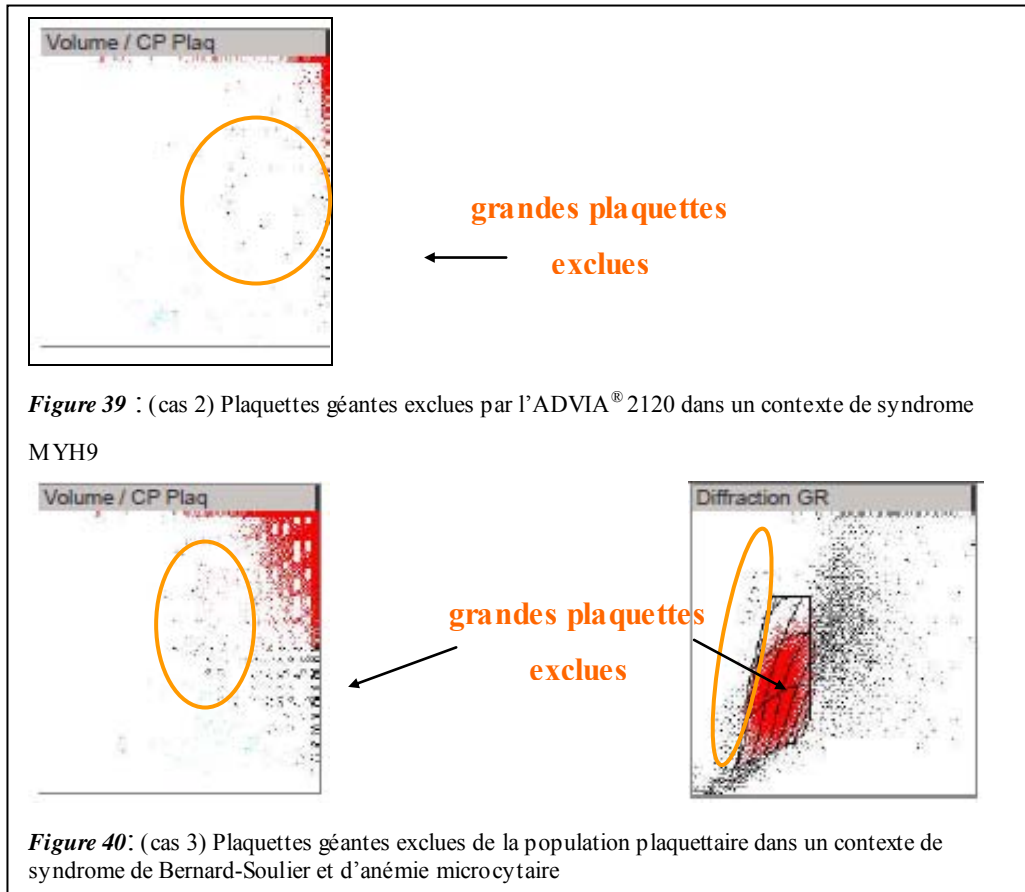
Celle-ci peut être mise en évidence au niveau du cytogramme *Volume / CP Plaq* et de l'histogramme *Vol Plaq*. Les cas suivants permettent d'illustrer ce problème d'identification de la population plaquettaire.

- Analyse du cytogramme *Volume / CP Plaq*

**Cas 1** (figure 38) : ce cas correspond à une thrombopénie à plaquettes géantes (syndrome MYH9). Il montre une population plaquettaire en bleue avec des points rouges dans la zone des grandes plaquettes. Ceux-ci correspondent également à des grandes plaquettes mais l'ADVIA<sup>®</sup> les a identifiés par erreur comme des globules rouges (cytogramme *Vol / CP Plaq*). Les histogrammes *Vol Plaq* et *Plaq Y*, qui sont deux représentations graphiques du volume plaquettaire, mettent en évidence la présence de ces plaquettes géantes. Elles sont également visibles au niveau du cytogramme GR et correspondent à la flèche présente à gauche du nuage de globules rouges. Ce problème analytique se traduit par une sous-estimation du VPM (évalué ici à 15,4 fL) et de la numération plaquettaire (105 G/L).



**Cas 2** (figure 39) : il s'agit également d'un cas de syndrome MYH9. Le nuage de points gris présent dans la zone des grandes plaquettes correspond à ces grandes plaquettes, que l'automate a faussement exclues de la population plaquettaire. La numération plaquettaire et le VPM, probablement sous-évalués par l'automate, ont été respectivement mesurés à 7 G/L et 8,5 fL.



Les cas de thrombopénies sévères (inférieure à 20 G/L) constituent une circonstance fréquente de défaut d'identification des plaquettes. Les patients exclus du fait d'un problème analytique sont représentés, en majorité, par des cas de PTI présentant une numération plaquettaire inférieure à 20 G/L.

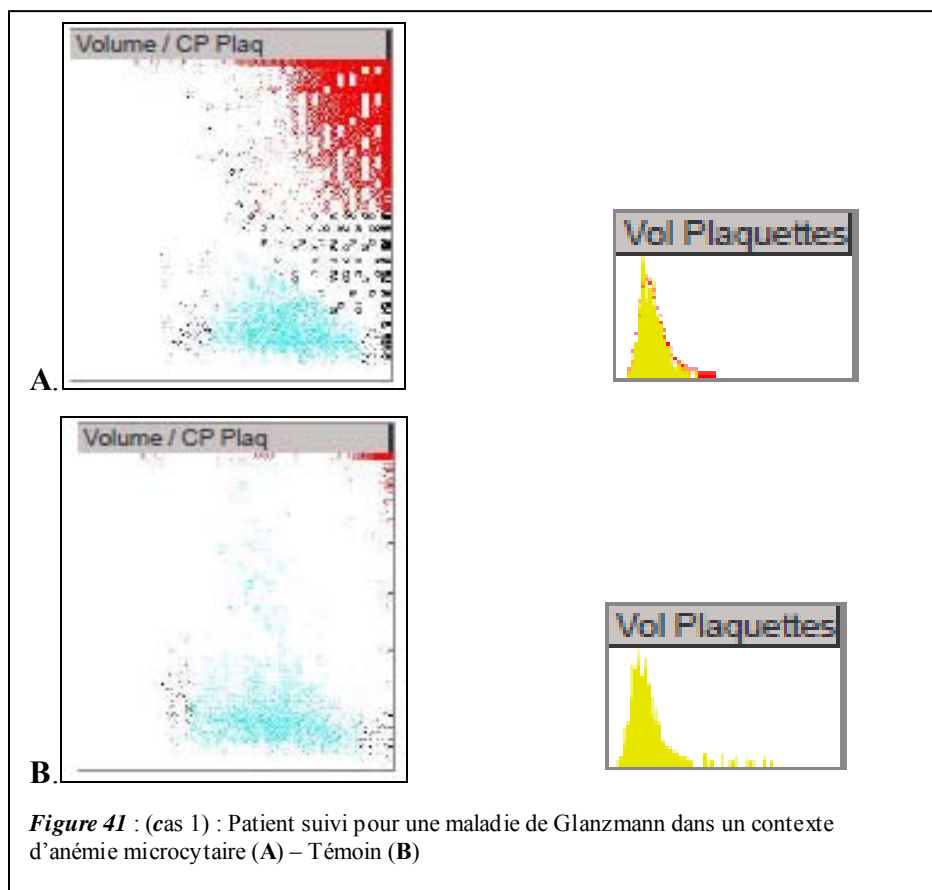
**Cas 3** (figure 40) : la patiente, suivie pour une maladie de Bernard-Soulier (thrombopénie à plaquettes géantes), présente une anémie microcytaire (Hb à 8,2 g/dL, VGM à 67,2 fL). Le cytogramme *Vol / CP Plaq* montre un nuage de points gris et rouges au niveau de la zone des plaquettes géantes. Si certains correspondent à des microcytes, la majorité de ces points correspond à des plaquettes géantes. On remarque, en effet, un continuum entre ces points et la population de plaquettes représentée en bleue dans la partie inférieure du cytogramme. La présence de ces plaquettes géantes est confirmée à gauche du nuage de globules rouges

(cytogramme *GR*). La numération plaquettaire et le VPM, probablement sous-évalués par l'automate, ont été respectivement mesurés à 8 G/L et 12,5 fL.

- Analyse de l'histogramme *Vol Plaq*

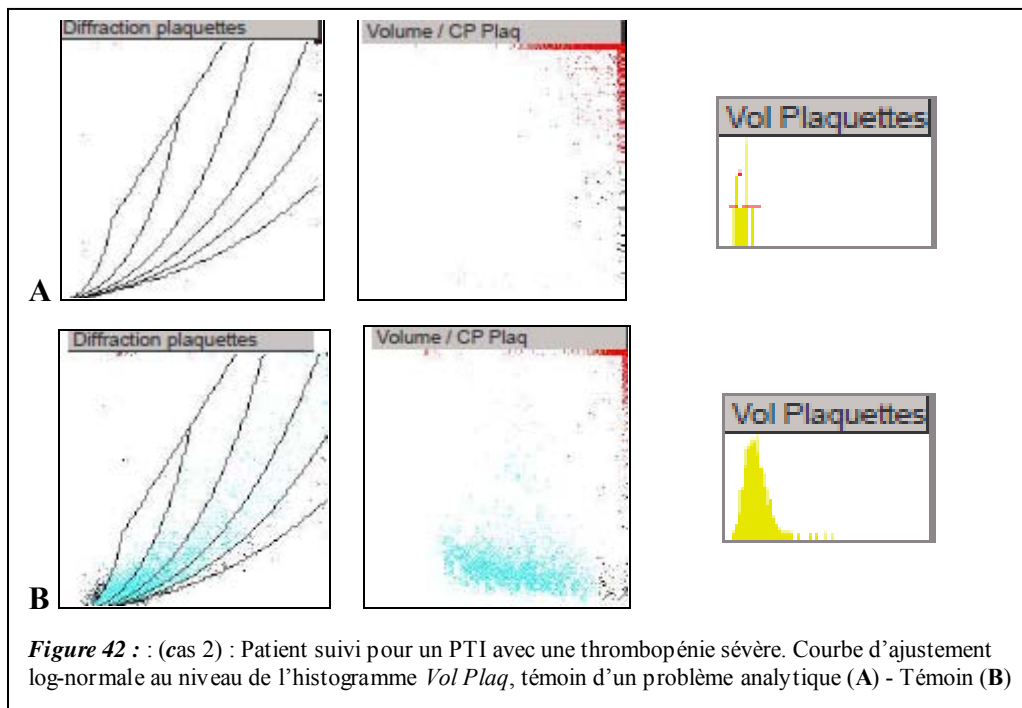
L'histogramme *Vol Plaq* a également été attentivement analysé. Il montrait dans certains cas une courbe en pointillés rouge superposée à la représentation graphique habituelle.

**Cas 1** (figure 41) : le patient, suivi pour une maladie de Glanzmann, présente une anémie microcytaire (Hb à 9,5 g/dL, VGM à 63,6 fL). On remarque au niveau de l'histogramme *Vol Plaq* l'apparition d'une courbe en pointillés rouge. D'après les informations transmises par le fournisseur de l'ADVIA®2120, quand le rapport entre les fragments de globules rouges et les plaquettes dépasse 0,25, le système utilise un calcul d'ajustement log normal pour déterminer la numération plaquettaire. La courbe en pointillés rouge, qui correspond à la courbe d'ajustement log normal, s'affiche alors sur l'histogramme de volume plaquettaire et traduit ici la juste exclusion des microcytes de la population plaquettaire.



**Cas 2** (figure 42) : le patient présente un PTI avec une thrombopénie sévère, évaluée par l'ADVIA®2120 à 3 G/L. La courbe de distribution volumétrique (histogramme *Vol Plaq*) est

extrapolée par cette courbe en pointillés rouge. Elle reflète ici un défaut d'identification de la population plaquettaire par l'ADVIA®2120.



Le coefficient d'anisocytose plaquettaire (PDW) est mesuré à partir de l'histogramme *Vol Plaquet*. L'apparition de la courbe rouge (figures 41 et 42) sur cet histogramme entraîne une diminution importante de la valeur de ce paramètre lorsqu'on le compare à la valeur des témoins mais aussi à celle de l'ensemble des patients. En effet, le PDW, respectivement égal à 52,4 %, 49,7 % et 52,3 % dans la population témoin de Nancy, Paris et Marseille, oscille entre 13,3 % et 26,6 % pour les patients dont l'histogramme *Vol Plaquet* est extrapolé par la courbe d'ajustement. Pour l'ensemble des patients pour lesquels l'analyse des histogrammes et cytogrammes plaquettaires ne montre pas d'anomalie, le PDW varie entre 35,4 % et 82,6 % en fonction de la pathologie plaquettaire.

La présence de cette courbe d'ajustement associée à un PDW anormalement bas a donc permis de repérer les cas de défaut d'identification de la population plaquettaire et de les exclure systématiquement de notre analyse.

## II. Populations témoins et détermination des valeurs de référence

### A. Valeurs de références

Ces valeurs de référence ont été définies pour chacun des paramètres plaquettaires et pour chacune des trois populations de témoins selon l'intervalle  $[m - 1,96 \sigma ; m + 1,96 \sigma]$  où  $m$  correspond à la valeur moyenne et  $\sigma$ , l'écart-type (tableau IV).

		NP (G/L)	PCT (%)	VPM (fL)	GP (G/L)	PDW (%)	MPC (g/dL)	PCDW (g/dL)	MPM (pg)	PMDW (pg)
NANCY <i>n=86</i>	m	284	0,26	9,2	8	52,4	23,9	5,5	2,01	0,80
	$\sigma$	64	0,06	0,7	4	6,3	2,0	0,5	0,15	0,09
	m +/- 1,96 $\sigma$	159-409	0,14-0,38	7,8-10,6	0-16	40,1-64,7	20,0-27,8	4,5-6,5	1,72-2,30	0,62-0,98
PARIS <i>n=34</i>	m	263	0,22	8,3	5	49,7	26,5	5,3	2,09	0,86
	$\sigma$	49	0,04	0,6	2	5,5	1,6	0,4	0,16	0,08
	m +/- 1,96 $\sigma$	167-359	0,14-0,30	7,1-9,5	1,0-9,0	38,9-60,5	23,4-29,6	4,5-6,1	1,78-2,40	0,70-1,02
MARSEILLE <i>n=22</i>	m	287	0,24	8,4	7	52,3	26,0	6,0	2,05	0,85
	$\sigma$	54	0,05	0,6	4	5,1	1,0	0,4	0,16	0,07
	m +/- 1,96 $\sigma$	181-392	0,15-0,33	7,2-9,5	0-14	42,4-62,2	24,1-27,9	5,3-6,7	1,74-2,36	0,71-1,00

Tableau IV : Valeurs de référence des paramètres plaquettaires pour les trois centres inclus

### B. Comparaison statistique des trois populations de témoins

L'analyse statistique effectuée par un test ANOVA (analyse de la variance) met en évidence une différence statistique ( $p < 0,05$ ) des valeurs moyennes des trois populations de témoins pour les paramètres suivants : PCT, VPM, GP, MPC, PCDW, MPM, PMDW (tableau V).

Seules les valeurs moyennes de la numération plaquettaire et du coefficient d'anisocytose PDW sont statistiquement identiques.

		NP (G/L)	PCT (%)	VPM (fL)	GP (G/L)	PDW (%)	MPC (g/dL)	PCDW (g/dL)	MPM (pg)	PMDW (pg)
NANCY	m	284	0,26	9,2	8	52,4	23,9	5,5	2,01	0,80
	$\sigma^2$	4096	0,00	0,5	16	39,7	4,0	0,3	0,02	0,01
PARIS	m	263	0,22	8,3	5	49,7	26,5	5,3	2,09	0,86
	$\sigma^2$	2401	0,00	0,4	4	30,3	2,6	0,2	0,03	0,01
MARSEILLE	m	287	0,24	8,4	7	52,3	26,0	6,0	2,05	0,85
	$\sigma^2$	2919	0,00	0,3	14	25,6	1,0	0,1	0,02	0,01
ANOVA	<i>p</i>	> 0,05	0,001	0,000	0,000	> 0,05	0,000	0,000	0,036	0,001

Tableau V : Comparaison des trois populations de témoins par un test statistique d'analyse de la variance (test ANOVA)

## III. Paramètres plaquettaires en fonction du type de thrombopénie

Les profils biologiques obtenus pour chaque pathologie plaquettaire ont été comparés aux valeurs de référence des centres dont elles sont issues.

## A. Thrombopénie avec plaquettes de petites tailles

Quatre patients présentant un syndrome de Wiskott-Aldrich ont été inclus dans notre étude. L'un d'entre eux a été secondairement écarté de la base de données car l'histogramme plaquettaire *Vol Plaq* montrait la courbe pointillée rouge, témoin d'un problème analytique (cf paragraphe I), dans un contexte de thrombopénie importante (évaluée à 6 G/L par l'automate). Deux patients suivis à Nancy pour ce syndrome n'ont pu être inclus car ils ont été greffés avant 2006, date avant laquelle nous ne disposions pas de raw datas sauvegardées.

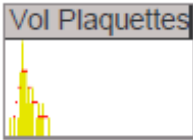

		NP (G/L)	PCT (%)	VPM (fL)	GP (G/L)	PDW (%)	MPC (g/dL)	PCDW (g/dL)	MPM (pg)	PMDW (pg)
PARIS	Valeurs de réf.	167-359	0,14-0,30	7,1-9,5	1,0-9,0	38,9-60,5	23,4-29,6	4,5-6,1	1,78-2,40	0,70-1,02
	Patient 1 WAS	35	0,03	7,3	0	45,3	21,4	6,7	1,43	0,56
	Patient 2 WAS	84	0,06	7,6	0	35,7	18,9	5,7	1,35	0,44
MARS.	Valeurs de réf.	181-392	0,15-0,33	7,2-9,5	0-14	42,4-62,2	24,1-27,9	5,3-6,7	1,74-2,36	0,71-1,00
	Patient 1 (mère patient 2)	149	0,11	7,5	2	44,3	28,2	5,4	2,06	0,78
	Patient 2 WAS	 (patient exclu de la base de données)								

Tableau VI : Profils plaquettaires des cas de thrombopénies à petites plaquettes (WAS)

 Valeur patient < Valeur de réf.

 Valeur patient > Valeur de réf.

Les deux patients parisiens présentent des similarités dans leur profil biologique avec, en particulier, une thrombopénie à plaquettes normales (tableau VI). Le VPM est, en effet, dans les valeurs basses de référence mais non diminué. Cependant les PCT, MPC et MPM sont diminués ainsi que la numération des grandes plaquettes (GP) correspondant aux plaquettes de volume supérieur à 20 fL.

Le « patient 1 » de Marseille est la mère « conductrice » asymptotique du patient 2 qui a été exclu. Son profil biologique ne montre pas d'anomalies notables (tableau VI). La numération plaquettaire tend vers les valeurs normales (150-400 G/L). On note simplement une légère augmentation de la concentration plaquettaire moyenne MPC.

## B. Thrombopénies constitutionnelles avec plaquettes de taille normale

Douze patients suivis pour une thrombopénie constitutionnelle à plaquettes normales ont été inclus (tableau VII). Six présentent une thrombopénie autosomique dominante avec anomalie du gène *ANKRD26*. Les six autres sont suivis pour une thrombopénie avec prédisposition à

développer des leucémies (FPD/AML). La thrombopénie est toujours constante, évaluée entre 50 et 120 G/L avec un VPM normal ou augmenté pour 2 cas de FPD/AML. Le contingent de plaquettes de grandes tailles est normal pour tous les patients. Le PDW est normal ou augmenté ce qui correspond à une anisocytose plaquettaire plus marquée. Deux paramètres semblent varier entre ces deux thrombopénies constitutionnelles. La MPC est augmentée ou dans les valeurs hautes de la normale pour les patients « *ANKRD26* », ce qui correspond à une population plaquettaire plus granuleuse alors qu'elle est normale pour les patients « FPD/AML ». La MPM est, en revanche, normale pour les patients « *ANKRD26* » et plutôt diminuée pour les patients « FPD/AML ».

		NP (G/L)	PCT (%)	VPM (fL)	GP (G/L)	PDW (%)	MPC (g/dL)	PCDW (g/dL)	MPM (pg)	PMDW (pg)
MARSEILLE	<i>Valeurs de réf.</i>	181-392	0,15-0,33	7,2-9,5	0-14	42,4-62,2	24,1-27,9	5,3-6,7	1,74-2,36	0,71-1,00
	Patient 1 ANKRD26	15	0,01	7,7	0	48,9	27,7	5,4	1,96	0,74
	Patient 2 ANKRD26	67	0,05	7,9	2	57,4	27,0	4,6	2,04	0,96
	Patient 3 ANKRD26	62	0,05	7,9	2	70,1	29,1	5,3	2,13	0,95
	Patient 4 ANKRD26	47	0,04	7,6	1	61,4	29,1	5,4	2,01	0,83
	Patient 5 ANKRD26	65	0,05	7,8	2	62,5	29,6	5,1	2,08	0,81
	Patient 6 ANKRD26	85	0,06	7,1	2	62,7	30,0	5,4	1,92	0,74
	Patient 1 FPD/AML	86	0,07	7,4	2	71,1	25,1	6,8	1,60	0,65
	Patient 2 FPD/AML	54	0,04	7,2	1	46,2	22,4	6,7	1,55	0,74
	Patient 3 FPD/AML	74	0,09	12,8	10	81,5	26,5	4,4	2,36	0,97
	Patient 4 FPD/AML	83	0,09	10,5	6	63,8	27,8	5,9	2,63	1,14
Patient 5 FPD/AML	120	0,08	7,0	1	42,1	21,8	6	1,47	0,63	
NANCY	<i>Valeurs de réf.</i>	159-409	0,14-0,38	7,8-10,6	0-16	40,1-64,7	20,0-27,8	4,5-6,5	1,72-2,30	0,62-0,98
	Patient 1 FPD/AML	80	0,06	8,1	2	55,5	23,1	6,6	1,69	0,76

Tableau VII : Profils plaquettaires des cas de thrombopénies à plaquettes normales

□ Valeur patient < Valeur de réf.

■ Valeur patient > Valeur de réf.

### C. Thrombopénies constitutionnelles avec macroplaquettes

Onze patients présentant une thrombopénie à macroplaquettes ont été inclus. Concernant les patients nancéiens, huit d'entre eux ont été étiquetés « macrothrombopénie non MYH9 ». Ils présentent, en effet, une thrombopénie constitutionnelle avec présence de grandes plaquettes à l'examen du frottis sanguins mais pour lesquels une mutation du gène *MYH9* n'a pas été retrouvée pour les huit principaux exons analysés. On met en évidence chez ces patients une thrombopénie modérée (entre 60 et 130 G/L) avec un VPM toujours augmenté compris entre 11,0 fL et 16,5 fL (tableau VIII). La population de plaquettes de VPM supérieur à 20 fL (GP) n'est pas nécessairement augmentée. Le coefficient d'anisocytose plaquettaire, PDW, et la

MPC sont normaux ou augmentés. La masse plaquettaire, MPM, est en revanche systématiquement augmentée.

Pour l'unique cas de syndrome de Paris-Trousseau (*tableau VIII*), la population plaquettaire est très hétérogène en taille (PDW) et présente un VPM dans les limites de la normale sans excès de grandes plaquettes (GP). La MPM est augmentée.

Sept cas de maladies de Willebrand 2B et deux cas de Pseudo-Willebrand ont été inclus, issus du CRPP de Paris. Bien que la maladie de Willebrand 2B ne constitue pas, *stricto sensu*, une thrombopénie constitutionnelle, nous l'avons classée dans la catégorie des thrombopénies à macroplaquettes avec le Pseudo-Willebrand plaquettaire afin de comparer ces pathologies très proches sur le plan clinique et biologique. Dans la maladie de Willebrand de type 2B, la numération plaquettaire est variable. Trois patients sur les sept ne présentent pas de thrombopénie. La population plaquettaire est hétérogène en taille (PDW) avec un VPM systématiquement augmenté, qui varie entre 10,9 fL et 13,2 fL (*tableau VIII*). La masse plaquettaire est également augmentée dans chacun des cas.

		NP (G/L)	PCT (%)	VPM (fL)	GP (G/L)	PDW (%)	MPC (g/dL)	PCDW (g/dL)	MPM (pg)	PMDW (pg)
NANCY	<i>Valeurs de réf.</i>	<b>159-409</b>	<b>0,14-0,38</b>	<b>7,8-10,6</b>	<b>0-16</b>	<b>40,1-64,7</b>	<b>20,0-27,8</b>	<b>4,5-6,5</b>	<b>1,72-2,30</b>	<b>0,62-0,98</b>
	Patient 1 mMYH9-	124	0,15	12,5	17	67,5	28,5	5,1	2,78	1,06
	Patient 2 mMYH9-	135	0,21	15,3	28	71,0	27,1	4,8	3,02	1,13
	Patient 3 mMYH9-	82	0,10	11,8	8	64,4	29,7	4,8	2,80	0,93
	Patient 4 mMYH9-	101	0,16	15,5	22	76,9	26,7	4,4	2,64	1,06
	Patient 5 mMYH9-	88	0,10	11,2	10	72,1	28,9	5,1	2,46	0,92
	Patient 6 mMYH9-	54	0,07	12,4	7	56,8	26,7	3,3	2,89	0,99
	Patient 7 mMYH9-	86	0,11	12,7	10	60,7	26,7	5,3	2,89	1,02
	Patient 8 mMYH9-	69	0,11	16,4	20	63,4	26,6	3,6	3,25	1,05
Patient 1 Paris-Trousseau	99	0,10	10,6	8	70,7	27,0	5,4	2,35	1,00	
PARIS	<i>Valeurs de réf.</i>	<b>167-359</b>	<b>0,14-0,30</b>	<b>7,1-9,5</b>	<b>1,0-9,0</b>	<b>38,9-60,5</b>	<b>23,4-29,6</b>	<b>4,5-6,1</b>	<b>1,78-2,40</b>	<b>0,70-1,02</b>
	Patient 1 Pseudo-Will.	345	0,26	7,4	4	46,6	29,1	5,3	2,08	0,80
	Patient 2 Pseudo-Will.	199	0,18	9,1	8	57,5	27,0	5,0	2,30	0,98
	Patient 1 Willebrand 2B	33	0,04	12,5	5	68,4	27,8	5,9	2,92	1,29
	Patient 2 Willebrand 2B	97	0,11	11,2	10	59,9	30,8	4,5	3,02	1,22
	Patient 3 Willebrand 2B	232	0,24	10,3	15	58	28	4,8	2,66	1,07
	Patient 4 Willebrand 2B	74	0,08	10,9	8	66,4	29,3	3,9	2,82	1,18
	Patient 5 Willebrand 2B	51	0,07	13,2	8	63,7	28,7	4,4	3,19	1,19
	Patient 6 Willebrand 2B	182	0,21	11,5	19	68,3	26,3	4,5	2,64	1,11
Patient 7 Willebrand 2B	107	0,13	12,4	14	67,5	27,2	5,2	2,85	1,19	

*Tableau VIII* : Profils plaquettaires des cas de thrombopénies à macroplaquettes

□ Valeur patient < Valeur de réf.

■ Valeur patient > Valeur de réf.



En revanche, les deux cas de Pseudo-Willebrand plaquettaires présentent des valeurs dans les intervalles de référence pour les différents paramètres plaquettaires (tableau VIII).

#### D. Thrombopénies constitutionnelles à plaquettes géantes

Quinze patients présentant un syndrome MYH9 ont été inclus (tableau IX). Les résultats sont homogènes entre les trois centres et mettent en évidence une thrombopénie variable (31-120 G/L) avec un VPM augmenté qui varie entre 15,3 et 28,1 fL. La population de grandes plaquettes est augmentée dans 14 cas sur 15. L'anisocytose plaquettaire est peu marquée avec un PDW normal dans la majorité des cas.

		NP (G/L)	PCT (%)	VPM (fL)	GP (G/L)	PDW (%)	MPC (g/dL)	PCDW (g/dL)	MPM (pg)	PMDW (pg)
MARSEILLE	<b>Valeurs de réf.</b>	<b>181-392</b>	<b>0,15-0,33</b>	<b>7,2-9,5</b>	<b>0-14</b>	<b>42,4-62,2</b>	<b>24,1-27,9</b>	<b>5,3-6,7</b>	<b>1,74-2,36</b>	<b>0,71-1,00</b>
	Patient 1 MYH9	99	0,16	16,4	27	57,5	29,4	3,9	3,76	1,19
	Patient 2 MYH9	71	0,2	28,1	42	53,8	24	3,8	3,1	1,2
	Patient 1 SBS	86	0,11	12,9	12	67,7	28,5	3,9	3,11	1,22
	Patient 2 SBS	43	0,08	18,1	13	61,6	27,8	4,1	3,74	1,23
	Patient 1 Bolzano	103	0,13	12,9	12	64,5	28,9	3,9	2,89	0,96
	Patient 2 Bolzano	125	0,17	13,6	22	64,8	28,8	3,9	3,27	1,22
	Patient 3 Bolzano	76	0,13	16,5	23	60,6	29,4	3,6	3,74	1,21
NANCY	<b>Valeurs de réf.</b>	<b>159-409</b>	<b>0,14-0,38</b>	<b>7,8-10,6</b>	<b>0-16</b>	<b>40,1-64,7</b>	<b>20,0-27,8</b>	<b>4,5-6,5</b>	<b>1,72-2,30</b>	<b>0,62-0,98</b>
	Patient 1 MYH9	86	0,16	18,4	31	58,4	29,1	4,3	3,15	1,01
	Patient 2 MYH9	85	0,15	16,9	26	62,0	28,0	4,3	3,18	1,08
	Patient 3 MYH9	78	0,14	18,1	26	61,1	28,4	4,3	3,30	1,06
	Patient 4 MYH9	105	0,18	16,9	33	60,4	27,7	4,1	3,19	1,02
	Patient 5 MYH9	55	0,11	20,5	23	59,8	27,0	4,4	3,64	1,08
	Patient 6 MYH9	31	0,05	17,5	10	70,8	26,5	5,4	3,07	1,32
	Patient 7 MYH9	52	0,10	19,8	20	59,6	27,1	3,9	3,38	1,03
	Patient 8 MYH9	62	0,12	19,2	22	63,5	28,1	4,5	3,29	1,10
	Patient 9 MYH9	46	0,08	18,7	17	61,4	27,3	4,5	3,60	1,15
	Patient 1 SBS	36	0,08	21,7	16	58	26,7	5,1	3,95	1,14
	Patient 2 SBS	56	0,10	17,3	18	61	27,8	4,6	3,56	1,09
	Patient 3 SBS	52	0,13	25,1	30	56,2	27,8	4,4	3,19	1,00
PARIS	<b>Valeurs de réf.</b>	<b>167-359</b>	<b>0,14-0,30</b>	<b>7,1-9,5</b>	<b>1,0-9,0</b>	<b>38,9-60,5</b>	<b>23,4-29,6</b>	<b>4,5-6,1</b>	<b>1,78-2,40</b>	<b>0,70-1,02</b>
	Patient 1 MYH9	72	0,11	15,3	17	66	29,6	4,2	3,5	1,22
	Patient 2 MYH9	105	0,16	15,4	25	60,8	28,1	4,8	3,46	1,23
	Patient 3 MYH9	120	0,22	18,2	35	64,7	25,8	4,2	3,56	1,18
	Patient 4 MYH9	32	0,07	22,6	15	59,5	25,3	3,9	3,86	1,24
	Patient 1 SBS	17	0,04	24,3	10	50,9	26,5	3,4	4,26	0,93
	Patient 2 SBS	54	0,10	17,7	18	61,2	27,8	5,9	3,48	1,24
	Patient 1 SBS HZ	148	0,19	13,1	24	74,2	27,4	5,1	2,88	1,25

Tableau IX : Profils plaquettaires des cas de thrombopénies à plaquettes géantes

□ Valeur patient < Valeur de réf.

■ Valeur patient > Valeur de réf.

La masse plaquettaire moyenne et son écart-type sont systématiquement augmentés tandis que la MPC est augmentée dans la moitié des cas.

Les sept cas de syndrome de Bernard-Soulier présentent une thrombopénie qui varie de 17 à 86 fL. Le VPM est systématiquement supérieur à 15 fL sauf un cas (*patient 1 Marseille*) dont l'analyse des cytogrammes et histogrammes plaquettaires ne permet pas d'apporter d'explications. On observe également une augmentation de la population des grandes plaquettes, un coefficient d'anisocytose plaquettaire et une MPC normale dans la majorité des cas. La masse plaquettaire moyenne et son écart-type sont augmentés dans chacun des cas. Le PDW est normal, dans la majorité des cas, ce qui témoigne de l'homogénéité de la population plaquettaire avec la présence quasi-systématique de plaquettes de VPM supérieur à 20 fL (GP). Les plaquettes semblent également plus granuleuses avec une MPC élevée ou dans les valeurs hautes de la normale et cela de façon homogène (PCDW normal ou bas).

## E. Thrombopathie

Quinze patients suivis aux CRPP de Nancy ou Paris pour une maladie de Glanzmann ont été inclus (*tableau X*).

		NP (G/L)	PCT (%)	VPM (fL)	GP (G/L)	PDW (%)	MPC (g/dL)	PCDW (g/dL)	MPM (pg)	PMDW (pg)	
GLANZMANN	NANCY	<b>Valeurs de réf.</b>	<b>159-409</b>	<b>0,14-0,38</b>	<b>7,8-10,6</b>	<b>0-16</b>	<b>40,1-64,7</b>	<b>20,0-27,8</b>	<b>4,5-6,5</b>	<b>1,72-2,30</b>	<b>0,62-0,98</b>
	Patient 1	138	0,14	10,3	10	70,8	29,2	5,6	2,40	1,02	
	Patient 2	300	0,27	9,1	13	62,9	27,7	5,2	2,24	0,90	
	Patient 3	235	0,19	7,9	3	48,6	24,6	5,5	1,82	0,70	
	Patient 4	207	0,18	8,8	6	55,4	28,1	5,3	2,19	0,78	
	Patient 5	236	0,19	8,2	6	58,6	28,8	5,6	2,13	0,77	
	Patient 6	331	0,37	11,2	15	53,2	20,7	3,8	2,12	0,78	
	Patient 7	174	0,15	8,9	6	59,2	27,7	5,3	2,25	0,89	
	Patient 8	299	0,24	7,9	5	51,6	27,9	5,5	2,05	0,78	
	PARIS	<b>Valeurs de réf.</b>	<b>167-359</b>	<b>0,14-0,30</b>	<b>7,1-9,5</b>	<b>1-9</b>	<b>38,9-60,5</b>	<b>23,4-29,6</b>	<b>4,5-6,1</b>	<b>1,78-2,40</b>	<b>0,70-1,02</b>
	Patient 1	146	0,15	10	11	66,2	27,6	4,7	2,48	1,11	
	Patient 2	130	0,18	13,5	22	72,0	28,1	4,2	3,08	1,22	
	Patient 3	242	0,33	13,5	39	75,3	25,6	4,1	2,80	1,16	
	Patient 4	213	0,23	10,6	15	70,4	24,5	4,1	2,31	0,98	
	Patient 5	215	0,19	8,9	8	60,9	25,2	4,9	2,10	0,91	
Patient 6	126	0,12	9,4	5	58,6	26,3	4,5	2,31	0,99		
Patient 7	188	0,16	8,7	6	53,5	26,5	5,1	2,21	0,95		

Tableau X : Profils plaquettaires des cas de maladie de Glanzmann

□ Valeur patient < Valeur de réf.

■ Valeur patient > Valeur de réf.

L'analyse de leurs paramètres biologiques ne permet pas de mettre en évidence une identité phénotypique particulière. Seuls quatre patients présentent une thrombopénie modérée, supérieure à 120 G/L. Le VPM est, dans la majorité des cas, normal. Il est augmenté dans quatre cas (< à 16 fL) et s'accompagne d'une augmentation du contingent de grandes plaquettes (GP).

## F. Anomalies des granules

Les neuf cas d'anomalies des grains denses ( $\delta$ -SPD) présentent une numération plaquettaire normale ou augmentée (tableau XI). Le VPM est normal ou diminué sans excès de grandes plaquettes. La concentration plaquettaire (MPC) est normale ou augmentée mais jamais diminuée, bien qu'il s'agisse d'une anomalie des granules. La MPM est diminuée dans les deux seuls cas où le VPM est diminué.

Le profil biologique des paramètres plaquettaires est différent concernant le syndrome des plaquettes grises ( $\alpha$ -SPD) (tableau XI). Les deux patients présentent une thrombopénie avec un VPM augmenté, mais qui reste inférieur à 16 fL. Cette population plaquettaire est plus hétérogène en taille avec un PDW plus élevé que les valeurs de référence.

		NP (G/L)	PCT (%)	VPM (fL)	GP (G/L)	PDW (%)	MPC (g/dL)	PCDW (g/dL)	MPM (pg)	PMDW (pg)
NANCY	Valeurs de réf.	159-409	0,14-0,38	7,8-10,6	0-16	40,1-64,7	20,0-27,8	4,5-6,5	1,72-2,30	0,62-0,98
	Patient 1 $\delta$ SPD	525	0,44	8,5	4	36,4	21,3	5,2	1,73	0,61
	Patient 2 $\delta$ SPD	283	0,22	7,8	2	41,0	23,6	5,1	1,79	0,66
	Patient 3 $\delta$ SPD	537	0,36	6,7	2	39,7	26,3	6,4	1,66	0,53
	Patient 4 $\delta$ SPD	341	0,25	7,3	4	48,1	28,2	5,7	1,92	0,67
	Patient 5 $\delta$ SPD	521	0,40	7,6	2	35,4	23,2	5,4	1,71	0,62
	Patient 6 $\delta$ SPD	182	0,13	7,2	4	56,0	29,4	6,1	2,01	0,89
	Patient 7 $\delta$ SPD	106	0,10	9,9	5	55,5	25,1	4,8	2,31	0,95
	Patient 8 $\delta$ SPD	198	0,16	7,9	3	52,8	27,5	5,6	2,01	0,75
	Patient 9 $\delta$ SPD	181	0,20	11,0	13	65,3	27,8	4,4	2,53	0,90
Patient 10 $\alpha$ SPD	71	0,10	14,0	12	66,9	22,2	3,8	2,63	1,10	
PARIS	Valeurs de réf.	167-359	0,14-0,30	7,1-9,5	1,0-9,0	38,9-60,5	23,4-29,6	4,5-6,1	1,78-2,40	0,70-1,02
	Patient 1 $\alpha$ SPD	60	0,06	10,0	3	75,1	22,9	5,0	2,06	1,05

Tableau XI : Profils plaquettaires des cas de pathologies des granules

□ Valeur patient < Valeur de réf.

□ Valeur patient > Valeur de réf.

## G. Autres pathologies plaquettaires

Nous rapportons deux cas de thrombopathies constitutionnelles très rares recensées au CCPP de Nancy (tableau XII). Il s'agit d'une patiente suivie pour un syndrome de Scott et une patiente présentant une anomalie de la voie de l'ADP. Avec un unique cas représentatif de chacune de

ces pathologies, aucune interprétation ne peut être proposée à partir de leurs profils biologiques, qui sont présentés ici à titre indicatif.

		NP (G/L)	PCT (%)	VPM (fL)	GP (G/L)	PDW (%)	MPC (g/dL)	PCDW (g/dL)	MPM (pg)	PMDW (pg)
NANCY	<b>Valeurs de réf.</b>	<b>159-409</b>	<b>0,14-0,38</b>	<b>7,8-10,6</b>	<b>0-16</b>	<b>40,1-64,7</b>	<b>20,0-27,8</b>	<b>4,5-6,5</b>	<b>1,72-2,30</b>	<b>0,62-0,98</b>
	Patient SCOTT syndrome	456	0,33	7,3	4	45,7	27,7	5,8	1,91	0,68
	Patient anomalie voie ADP	335	0,28	8,4	7	54	25,2	7,2	1,92	0,76

Tableau XII : Profils plaquettaires d'un cas de syndrome de Scott et d'un cas d'anomalie de la voie de l'ADP

□ Valeur patient < Valeur de réf.

■ Valeur patient > Valeur de réf.

#### IV. Profil biologique des cas de purpura thrombopénique immunologique

Parmi les 92 cas de PTI inclus dans notre étude, 24 cas ont été exclus de la base de données, soit 26 %, du fait d'un problème analytique de l'ADVIA®. (cf partie Résultats I).

		NP (G/L)	PCT (%)	VPM (fL)	GP (G/L)	PDW (%)	MPC (g/dL)	PCDW (g/dL)	MPM (pg)	PMDW (pg)
NANCY	<b>Valeurs de réf.</b>	<b>159-409</b>	<b>0,14-0,38</b>	<b>7,8-10,6</b>	<b>0-16</b>	<b>40,1-64,7</b>	<b>20,0-27,8</b>	<b>4,5-6,5</b>	<b>1,72-2,30</b>	<b>0,62-0,98</b>
	m	32	0,03	10,1	2	60,0	25,1	5,6	2,16	0,91
	σ	30	0,03	2,4	2	12,7	2,8	1,3	0,42	0,19
MARSEILLE	<b>Valeurs de réf.</b>	<b>181-392</b>	<b>0,15-0,33</b>	<b>7,2-9,5</b>	<b>0-14</b>	<b>42,4-62,2</b>	<b>24,1-27,9</b>	<b>5,3-6,7</b>	<b>1,74-2,36</b>	<b>0,71-1,00</b>
	m	19	0,02	8,5	1	40,2	21,6	5,5	1,86	0,86
	σ	17	0,02	3,3	1	21,3	7,8	2,0	0,67	0,30

Tableau XIII : Valeurs moyennes des paramètres plaquettaires dans une population de patients suivis pour un PTI

□ Valeur patient < Valeur de réf.

■ Valeur patient > Valeur de réf.

Le tableau XIII représente les valeurs moyennes des paramètres plaquettaires calculées à partir des 68 cas restants, après exclusion des données erronées.

Il montre une numération plaquettaire moyenne et un plaquetto-crite très diminués ainsi qu'une diminution du PDW et de la MPC dans la population marseillaise, qui n'est pas retrouvée pour les cas de Nancy. Le VPM moyen est dans les intervalles de référence pour la population de Nancy et celle de Marseille ainsi que la valeur moyenne de PCDW, MPM et PMDW.

Lorsqu'on regarde les profils plaquettaires de chacun des cas de PTI (annexes 1 et 2), on observe un VPM augmenté dans 27 cas/68 qui est généralement associé à une augmentation du PDW,

de la MPM ou de la MPC. Le VPM est dans les valeurs de référence dans 28 cas/68 et est diminué dans les 13 cas restants. On notera que, quelle que soit la valeur du VPM, le contingent de grandes plaquettes (GP) n'est jamais augmenté.

Afin de faciliter la lecture de ces résultats, nous proposons une représentation simplifiée sous forme de tableaux récapitulatifs pour les cas de thrombopénies constitutionnelles (*annexes 3-5*) ainsi qu'une représentation graphique où les résultats ne sont plus différenciés en fonction des centres d'inclusion (*annexe 6*).

**DISCUSSION**

**ET**

**PERSPECTIVES**



La thrombopénie est une situation très fréquente en hématologie clinique. Elle s'accompagne souvent d'autres anomalies de l'hémodiagnostic et le contexte clinique permet, en général, d'orienter le diagnostic. Quand la thrombopénie est isolée, sa présence depuis l'enfance, voire la naissance, et l'anamnèse familiale sont des facteurs orientant fortement vers une thrombopénie constitutionnelle plutôt que vers un PTI. Cependant, ces critères peuvent être manquants ou mal recherchés et faire conclure à tort à une étiologie immune. Dans ces conditions, l'analyse des histogrammes, des cytogrammes et des paramètres plaquettaires proposés par l'ADVIA<sup>®</sup>2120 apporte des informations facilement disponibles qui pourraient, d'une part, constituer des critères distinctifs entre les étiologies immune et constitutionnelle, et d'autre part, caractériser les différentes entités de thrombopénies constitutionnelles.

L'équipe du service d'hématologie biologique de Nancy a déjà acquis une expérience dans l'étude du paramètre VPM en proposant une standardisation de l'évaluation de la taille des plaquettes (20), permettant de s'orienter vers un type de thrombopénie constitutionnelle (thrombopénie à grandes plaquettes, à plaquettes normales ou à petites plaquettes), selon la classification de Balduini (111). Fort de cette expérience et grâce au recrutement de pathologies plaquettaires au Centre de Compétence des Pathologies Plaquettaires de Nancy et à la participation des CRPP de Paris et Marseille, ce travail multicentrique a permis de colliger un grand nombre de thrombopénies constitutionnelles et d'étudier ces paramètres plaquettaires pour quinze entités différentes. Si le syndrome MYH9, le syndrome de Bernard-Soulier ou le syndrome de Wiskott-Aldrich constituent les pathologies plaquettaires les plus communes, la FPD/AML, la thrombopénie autosomique dominante liée à *ANKRD26* ou le syndrome des plaquettes grises sont beaucoup plus rares et leur caractérisation moléculaire reste récente (92,106). On notera qu'un cas d'anomalie combinée des grains denses et des granules  $\alpha$  a été découvert très récemment au CCPP de Nancy chez une patiente de 56 ans en errance diagnostique depuis son enfance (données non présentées). Les CRPP et CCPP, développés dans le cadre du plan national des pathologies rares, disposent donc de moyens techniques adaptés au diagnostic de ces pathologies et jouent un rôle essentiel pour sensibiliser les médecins non-spécialistes et mettre en place une filière de soins adaptée.

- La littérature ayant rapporté l'influence de facteurs préanalytiques et analytiques sur la détermination des paramètres plaquettaires, la première étape de ce travail a été de définir des « valeurs de référence » pour chacun des trois laboratoires inclus. Nous avons vérifié, dans un deuxième temps, si les valeurs trouvées pour des sujets sains pouvaient être assimilées dans

un seul groupe ou présentaient des différences. La comparaison de ces valeurs a mis en évidence des différences statistiques significatives (*tableaux IV et V*). Outre la variabilité d'hématimètre, elles peuvent s'expliquer par une population témoin différente selon les trois centres avec des effectifs variables et probablement des origines ethniques ainsi qu'une répartition des âges et des sexes différentes. Des études ont rapporté que le sexe était une source de variation des paramètres plaquettaires et notamment pour la classe d'âge 45-65 ans où les femmes présentent un PCT supérieur et une MPC inférieure aux hommes (46). Concernant l'âge, deux études démontrent qu'il constitue une source de variation et proposent de définir des valeurs de référence en fonction des différentes classes d'âge (148,169).

Comparativement à l'étude déjà menée au laboratoire de Nancy sur un ADVIA®2120 qui rapportait un VPM compris dans l'intervalle [7,1-10,5 fL] (moyenne,  $m \pm 1$  écart-type,  $\sigma$ ) établi à partir de 30 individus sains, nous rapportons ici un intervalle de référence égal à [7,8-10,6 fL], déterminé par  $m \pm 1,96 \sigma$ .

Les valeurs de référence trouvées pour les trois sites sont cohérentes avec les données de la littérature pour la numération plaquettaire, PCT, PDW, PCDW, MPM et PMDW (*tableau XIV*).

		NP (G/L)	PCT (%)	VPM (fL)	GP (G/L)	PDW (%)	MPC (g/dL)	PCDW (%)	MPM (pg)	PMDW (%)
<b>NANCY</b> n=86	m +/- 1,96 $\sigma$	159-409	0,14-0,38	7,8-10,6	0-16	40,1-64,7	20,0-27,8	4,5-6,5	1,72-2,30	0,62-0,98
<b>PARIS</b> n=34	m +/- 1,96 $\sigma$	167-359	0,14-0,30	7,1-9,5	1,0-9,0	38,9-60,5	23,4-29,6	4,5-6,1	1,78-2,40	0,70-1,02
<b>MARSEILLE</b> n=22	m +/- 1,96 $\sigma$	181-392	0,15-0,33	7,2-9,5	0-14	42,4-62,2	24,1-27,9	5,3-6,7	1,74-2,36	0,71-1,00
<b>Brummit et coll. (2000)</b> n=122 ADVIA®120	m +/- 1,96 $\sigma$	146-344	0,12-0,29	7,3-10,5	-	39,7-66,9	23,0-27,5	4,2-5,9	1,7-2,5	0,6-1,06
<b>Giacomini et coll. (2001)</b> n=500 ADVIA®120	m +/- 1,96	197-273	0,16-0,24 (toutes classes d'âge confondues)	9,4-10,3 8,5-12,8 (18-45 ans)	-	40,4-47,0	21,2-22,8	4,9-5,3	2,0-2,2	0,7-0,9
<b>Hoffmann et coll. (2001)</b> ADVIA®120	m +/- 1,96	-	-	5,6-8,9	-	-	-	-	-	-

*Tableau XIV* : Valeurs de références établies pour les trois laboratoires inclus comparativement aux données de la littérature

Concernant le VPM, *Giacomini et coll. (2001)* rapporte des valeurs un peu plus élevées (ADVIA®120) avec une valeur supérieur définie à 12,8 fL pour la classe d'âge des 18-45 ans (138). *Hoffmann et coll. (2012)* rapporte un intervalle de référence compris entre 5,6 et 8,9 fL mesuré également sur ADVIA®120 (150). Cette revue de la littérature témoigne des petites variations observées dans les intervalles de référence. Si la technologie (optique ou impédance) constitue la source de variation la plus importante, on montre que pour une même



famille d'automate (ici les ADVIA<sup>®</sup>), les différences persistent. *Giacomini et coll.* (2001) les explique par des fluctuations d'échantillonnages et affirme qu'elles n'ont peu de conséquences en pratique clinique (46). On notera cependant que les patients considérés comme ayant une pathologie à grandes plaquettes selon les valeurs de référence de Nancy (VPM supérieur à 10,6 fL) ont une population plaquettaire de taille normale si on applique les valeurs de référence rapportées dans l'étude de *Giacomini et coll.* (2001). Bien que la littérature recommande d'établir des valeurs de référence pour chaque centre, notre étude illustre les difficultés liées, entre autre, au choix de la population témoin et à la définition même de l'intervalle de référence et montre la nécessité de la calibration et de la standardisation des paramètres plaquettaires.

Ayant démontré des différences statistiquement significatives dans les valeurs obtenues entre les trois centres, nous n'avons pas uniformisé les valeurs de référence et avons déterminé des intervalles spécifiques à chaque laboratoire.

- Le deuxième objectif de ce travail a été de comparer les paramètres plaquettaires trouvés pour les sujets atteints de thrombopénies constitutionnelles à ceux correspondant à la population de témoins.

- Concernant les thrombopénies associées à des plaquettes de taille diminuée, notre étude s'est portée sur deux cas de WAS (*tableau VI et annexe 3*). Deux autres cas suivis à Nancy n'ont pu être inclus car les patients ont été greffés avant l'année 2006, date avant laquelle nous ne disposons pas de sauvegarde informatique des données analytiques. Conformément à ce qui est rapporté dans la littérature, la numération plaquettaire est diminuée de façon importante (82). Malgré cette faible numération plaquettaire, la courbe de distribution du volume plaquettaire est de répartition log-normale, ce qui a permis de déterminer un VPM. En cas de plus forte thrombopénie, le VPM peut ne pas être rendu (175). Contrairement à la description cytologique (80,83), ce VPM a été trouvé normal avec une valeur basse. Ce comportement du VPM peut être en relation avec la sphérisation des cellules au préalable de l'analyse à l'aide du réactif contenant du dodecyl sulfate de sodium et du glutaraldéhyde. Cet aspect est important à prendre en considération puisqu'il signifie que dans notre petite expérience, un VPM non diminué n'exclue pas le WAS ou sa forme hématologique pure, l'XLT. Un cas de WAS avec des plaquettes de taille normale a déjà été rapporté dans la littérature en relation avec une mutation faux-sens (c.862 A>T) (176). Une centaine de mutations a été décrite à ce jour et cette variabilité de présentation est probablement en

rapport avec le polymorphisme génétique. Dans notre étude, l'analyse des autres paramètres plaquettaires montre que, même en cas de VPM normal bas, les autres paramètres MPC et MPM sont diminués, ce qui n'est jamais retrouvé dans les autres thrombopénies constitutionnelles. En conclusion pour cette entité, une thrombopénie importante avec un VPM limite bas ou diminué associée à une diminution de la MPM et de la MPC est caractéristique (voire pathognomonique) et oriente fortement le diagnostic. L'analyse du frottis sanguin coloré au MGG permettra de confirmer la nature ponctiforme de l'ensemble des plaquettes. Ces arguments biologiques, interprétés avec les renseignements cliniques (thrombopénie depuis la naissance, eczéma, infections éventuelles), seront suffisants, à notre avis, pour rechercher la mutation du gène *WAS*.

- Concernant les thrombopénies constitutionnelles avec des plaquettes de taille normale, nous avons pu étudier six cas de thrombopénies de type FPD/AML et six cas de thrombopénies liées à des mutations de *ANKRD26* (tableau VII et annexe 3). Nous n'avons pas pu étudier de TAR syndrome du fait de données analytiques non archivées (antérieures à 2006) mais le contexte clinique est, dans ce cas, assez suggestif du diagnostic. Les deux entités étudiées présentent des traits communs. Elles se caractérisent par une thrombopénie modérée comprise entre 47 G/L et 120 G/L, sauf pour un cas. Le VPM est toujours normal pour les cas de thrombopénies associées à *ANKRD26* et normal ou faiblement augmenté pour les cas de FPD/AML. Ces résultats sont cohérents avec ceux décrits dans la littérature (111). L'augmentation du PDW trouvée dans les deux entités est étonnante puisqu'elle est présente alors que le VPM n'est pas augmenté. Elle pourrait s'expliquer par une accentuation de l'anisocytose physiologique en rapport avec une dysmégarycytopoïèse que nous avons, par ailleurs, observé pour FPD/AML (90). Parmi les paramètres distinctifs entre ces deux entités, nous notons que la thrombopénie FDP/AML est plutôt associée à une MPC normale alors que la thrombopénie liée à *ANKRD26* est associée à une MPC augmentée. Ce comportement différentiel pourrait être attribué à une différence de contenu granulaire plaquettaire. La littérature et nos données (en cours de publication) montrent que la thrombopénie FDP/AML est souvent associée, quand elle est recherchée, à une anomalie des granules denses entraînant une thrombopathie de type  $\delta$ -SPD. Paradoxalement à nos résultats qui montrent une MPC augmentée, une étude de cas liés à une mutation du gène *ANKRD26* a montré la présence sur le frottis sanguin de plaquettes pâles avec une diminution des granules  $\alpha$  confirmée par immunomarquage (91). Ainsi la MPC et la MPM seraient plus sensibles à une anomalie des

granules denses qu'à celle des granules  $\alpha$ . Cette tendance observée sur un faible nombre de cas mériterait d'être confortée à partir d'un plus grand nombre d'entités car elle permettrait d'orienter la recherche moléculaire. En effet, à ce jour, la recherche de mutations des gènes *AML1* et *ANKRD26* est réalisée en cas de thrombopénie avec des plaquettes de taille normale, de transmission autosomique dominante avec éventuellement un contexte d'hémopathies familiales. Ces gènes comptant respectivement 9 et 34 exons, la recherche est longue et coûteuse. La détermination d'un profil biologique plus caractéristique d'une entité, en association avec l'étude de MYH10 (87) et en complément de l'exploration fonctionnelle plaquettaire et médullaire (recherche d'une dysmégacaryopoïèse), pourrait être proposée comme démarche diagnostique.

Dans le cadre du diagnostic différentiel d'une thrombopénie isolée associée à des plaquettes de taille normale se positionne le diagnostic de PTI. Le contexte de PTI aigu est souvent évocateur avec un antécédent de syndrome infectieux plus ou moins dramatique mais peut également faire évoquer une hémopathie aiguë justifiant la réalisation d'une exploration médullaire. Mais ces éléments peuvent manquer et un PTI chronique peut s'installer plus insidieusement. Le diagnostic différentiel entre PTI et thrombopénie constitutionnelle reste un problème récurrent rapporté régulièrement dans la littérature, soit par méconnaissance du contexte clinique par un interrogatoire mal adapté et/ou par une absence de prise en compte des données morphologiques plaquettaires. En 2009, Noris *et coll.* rapportait 50 cas de thrombopénies constitutionnelles publiés ces dix dernières années qui avaient été diagnostiqués à tort comme des PTI et dont 34 avaient été splénectomisés. Plus récemment, une enquête de pratiques cliniques a été menée et témoigne bien des progrès qu'il reste à faire en terme de diagnostic d'une thrombopénie (177).

Le VPM a fait l'objet de plusieurs études concernant son intérêt à démontrer l'origine périphérique ou centrale d'une thrombopénie. Bien que les valeurs seuils proposées par les auteurs divergent entre les études du fait de la variation d'automate, tous ont démontré une augmentation du VPM dans les PTI et le définissent comme un marqueur de la nature régénérative d'une thrombopénie (133,136). Certaines études démontrent une augmentation combinée du coefficient d'anisocytose PDW et du pourcentage de GP et les proposent également comme marqueurs d'une thrombopénie périphérique (134,135). Le VPM a également montré son intérêt dans le diagnostic différentiel entre les thrombopénies à plaquettes géantes et le PTI (75,77), mais aucun paramètre plaquettaire n'a fait l'objet de

telles études comparatives. Un de nos objectifs a donc été d'évaluer l'ensemble des paramètres plaquettaires dans des cas de PTI *versus* l'ensemble des thrombopénies plaquettaires.

Contrairement à certaines thrombopénies constitutionnelles où la population plaquettaire présente un profil biologique commun d'un patient à l'autre, les résultats de la population de PTI montrent une hétérogénéité importante (*tableau XIII et annexes 1 à 3*). Celle-ci peut, en partie, s'expliquer par l'inclusion d'enfants et d'adultes suivis pour des PTI chroniques mais aussi aigus. De plus, les hémogrammes inclus pour chaque patient ont été prélevés à des phases variables de l'évolution de la maladie, sans standardisation. Si la majorité des analyses a été effectuée au diagnostic, certaines ont été effectuées dans le cadre du suivi et éventuellement dans les suites d'une corticothérapie ou d'un traitement par immunoglobulines. Il n'est pas exclu que ces traitements puissent modifier les paramètres plaquettaires autres que la numération plaquettaire. Il aurait été intéressant de n'inclure que les hémogrammes réalisés au diagnostic pour s'inscrire véritablement dans la démarche de diagnostic différentiel d'une thrombopénie mais cela n'a pas été toujours possible, faute de sauvegarde informatique des données analytiques.

Malgré ces limites de notre étude concernant l'analyse des cas de PTI, quelques points peuvent être soulevés :


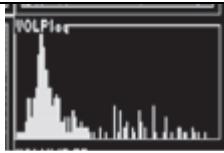
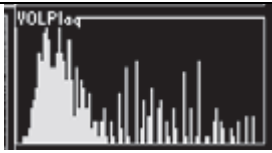
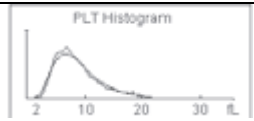
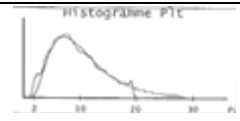
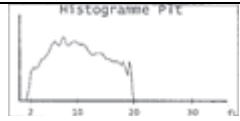
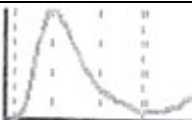
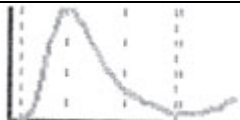

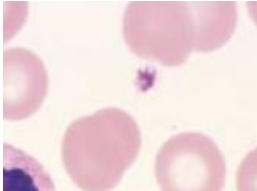

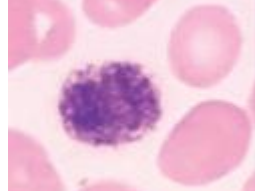
Contrairement aux données de la littérature, nous montrons une augmentation du VPM que dans 39,7 % des cas. Si les résultats de Bowles *et coll.* (2005), Kaito *et coll.* (2005) et Ntaios *et coll.* (2008) concluent à un VPM plus important dans le cadre d'un PTI, la comparaison a été effectuée par rapport à des cas de thrombopénies centrales et non par rapport à une population témoin d'individus sains (133–135). Contrairement aux études précédemment citées, Numbenjapon *et coll.* (2007) détermine un cut-off (7,9 fL) en fonction d'une population témoin pour laquelle ont été définies des valeurs de référence (5,6-10,9 fL, STKS<sup>®</sup> Coulter) (136). S'il montre effectivement que le VPM moyen des cas de PTI est significativement plus élevé que le cut-off (VPM moyen des témoins), il précise que les VPM des cas de PTI varient entre 4,7 et 12,0 fL démontrant qu'une proportion non négligeable de cas a un VPM normal. En pratique clinique, il semble donc difficile de conclure au cas par cas.

Dans nos cas de PTI où le VPM est augmenté, il n'y a pas d'augmentation de la population des grandes plaquettes (plaquettes de volume supérieur à 20 fL). Ce point est important à souligner pour différencier ces cas des cas de thrombopénies à macroplaquettes où la

population de GP est augmentée dans plus de la moitié des cas. Dans son étude publiée en 2005, Kaito *et coll.* montre que le pourcentage de GP est significativement augmenté dans les cas de PTI (134). Seulement, l'analyse des plaquettes a été effectuée sur un automate fonctionnant par impédancemétrie (Sysmex XE<sup>®</sup>2100) où les grandes plaquettes sont définies pour un volume supérieur à 12 fL. Sachant que cette technologie surestime le VPM par rapport à la méthode optique, on comprend que la population de GP décrites dans cette étude diffère de celle étudiée sur notre automate et que nos résultats divergent.

Dans nos cas de PTI où le VPM est normal, le diagnostic différentiel se pose avec les thrombopénies à plaquettes normales. On note simplement que la MPC est augmentée dans les cas de thrombopénie liée à *ANKRD26* alors qu'elle est diminuée ou normale dans les cas de PTI.

- Concernant les thrombopénies constitutionnelles associées à la présence de plaquettes de grande taille, nous avons appliqué notre démarche de caractérisation de la population plaquettaire en fonction de la courbe de distribution volumétrique d'automates différents complétée de l'analyse morphologique plaquettaire à partir du frottis sanguin (*rappel tableau I*).

	Population plaquettaire normale	Population plaquettaire avec macroplaquettes	Population plaquettaire avec plaquettes géantes
ADVIA <sup>®</sup> 2120			
LH750 <sup>®</sup>			
XE-2100D <sup>®</sup>			
Morphologie plaquettaire			

**Tableau I** : Classification des plaquettes en fonction de la courbe de distribution volumétrique et de la morphologie (20)

Ainsi nous avons distingué le groupe des entités associées à la présence majoritaire de plaquettes géantes (dont la taille est supérieure à celle des hématies à l'examen du frottis), qui comprend le SBS et le syndrome MYH9, des autres entités. Ces dernières correspondent à plusieurs cas de figure à l'observation du frottis sanguin :

- Présence d'une majorité de macroplaquettes sans plaquettes géantes
- Présence de macroplaquettes associées à un contingent variable de plaquettes géantes : dans ces cas, la recherche de mutations du gène MYH9 sur les principaux exons atteints (exons 1, 10, 16, 25, 26, 30, 38, 40) a été retrouvée négative (« macrothrombopénies MYH9-»).

Il est à noter que pour ces cas, la négativité de la recherche d'inclusions leucocytaires par immunofluorescence (agrégats de myosine) n'a pas incité à poursuivre la recherche de mutations dans d'autres exons dont la prévalence est plus rare. Aucune recherche intronique n'a été réalisée.

En présence d'une thrombopénie associée à une majorité de plaquettes géantes, le diagnostic différentiel entre SBS et syndrome MYH9 ne se pose pas, en général, tant la présentation clinique est différente. Cependant, dans notre expérience, le polymorphisme génétique liée aux mutations des gènes codant GPIb-IX a été associé à un cas de SBS faiblement hémorragipare et avec une agglutination à la ristocétine non nulle. Le diagnostic a été confirmé seulement par l'étude phénotypique par CMF et l'étude moléculaire.

La première étape du diagnostic de SBS ou du syndrome MYH9 est de bien repérer la présence de ces plaquettes géantes au cours d'un hémogramme systématique. Seule l'analyse attentive de la courbe de répartition volumétrique en complément de la détermination d'un VPM augmenté permet d'orienter le diagnostic de thrombopénie vers ces entités. Nous soulignons que l'utilisation de l'ADVIA<sup>®</sup>2120 a permis de rendre une numération plaquettaire et une mesure du VPM pour tous les cas de thrombopénies à plaquettes géantes. La courbe de répartition prend alors une allure bimodale très évocatrice (*cf tableau 1*). Il est important de rappeler que seule la technologie à mesure optique (ADVIA<sup>®</sup>) permet de rendre une valeur de VPM en cas de présence de plaquettes géantes, ce qui constitue une supériorité technologique dans l'approche des thrombopénies constitutionnelles (20,77). Le biais potentiel en cas de plaquettes géantes analysées par l'ADVIA<sup>®</sup>2120 est la possibilité de comptage des microcytes en plaquettes. Dans ce cas, l'analyse de l'histogramme *Volume / CP*

*Plaq* permet d'évoquer cette interférence et un comptage des plaquettes par CMF permet de corriger la valeur de la numération plaquettaire.

Pour le syndrome MYH9, classiquement décrit comme faiblement hémorragipare avec une numération plaquettaire diminuée modérément (81), nous avons trouvé dans certains cas une numération plaquettaire inférieure à 50 G/L (31-32-36 G/L) (*tableau IX et annexe 5*). Le VPM est très augmenté et systématiquement supérieur à 15 fL. Il est intéressant de noter que le PCT est non augmenté malgré la présence de plaquettes géantes. Cette constatation montre que ce paramètre ne doit pas être utilisé comme le reflet de la masse plaquettaire totale et du potentiel hémostatique du patient. Le paramètre GP, qui correspond à la numération des plaquettes de volume supérieur à 20 fL, est toujours augmenté. Le PDW est normal dans la grande majorité des cas indiquant que l'ensemble des plaquettes est de taille augmentée et que le contingent de plaquettes géantes est majoritaire. L'augmentation systématique de la MPM et inconstante de la MPC sont cohérentes avec l'observation cytologique de plaquettes géantes bien granuleuses. L'exploration fonctionnelle plaquettaire n'objective d'ailleurs pas d'anomalie des granules  $\alpha$  ou des grains denses.

Le phénotype des paramètres plaquettaires trouvé pour le SBS est similaire à celui du syndrome MYH9 attestant la présence de plaquettes géantes bien granuleuses (*tableau IX et annexe 5*). Cependant, nous notons que la numération plaquettaire est plus faible. Dans notre expérience, elle varie entre 17 G/L et 86 G/L. Par ailleurs, le VPM montre des valeurs encore plus élevées variant entre 17,3 et 25,1 fL (excepté un cas où le VPM est mesuré à 12,9 fL sans que nous n'ayons d'explications à apporter).

Cette étude nous permet donc de définir une identité phénotypique de plaquettes géantes avec un VPM très augmenté supérieur à 15 fL, une MPM et une population de GP systématiquement augmentées et une augmentation inconstante de la MPC.

La détermination de la valeur du VPM dans ce contexte de grandes plaquettes prend toute son importance comparativement aux cas de thrombopénies associées à la présence de plaquettes géantes mais pour lesquels la mutation MYH9 a été trouvée négative (groupe des « macrothrombopénies MYH9 - »). Il est important de noter que pour ces cas, le VPM est toujours inférieur à 16,5 fL (< 15 fL pour la majorité des cas) avec des valeurs comprises entre 11,2 et 16,4 fL. Pour ce groupe mal défini, la MPM et la MPC varient comme dans les cas de thrombopénies à plaquettes géantes et n'apportent donc pas de critères distinctifs. On remarque, cependant, une augmentation non systématique des grandes plaquettes (GP) et une augmentation du PDW témoignant d'une hétérogénéité de la population plaquettaire

(population plutôt homogène en taille dans les thrombopénies à plaquettes géantes). Nous concluons que la recherche de mutations de *MYH9* ne devrait être réalisée que pour des valeurs de VPM supérieures à 15 fL sur l'ADVIA®2120. Inversement, cette recherche ne semble pas justifiée pour des valeurs de VPM inférieures à 15 fL. Cette différence de VPM entre le groupe des thrombopénies à plaquettes géantes et le groupe des « macrothrombopénies MYH9 - » s'explique par une proportion moindre de plaquettes géantes. D'ailleurs l'observation microscopique rétrospective des frottis sanguins des cas de macrothrombopénies MYH9 - a confirmé la présence d'une majorité de macroplaquettes avec présence de quelques plaquettes géantes, contrairement au syndrome MYH9 qui présente une majorité de plaquettes géantes.

Ce groupe des macrothrombopénies MYH9 – n'est pas «sémiologiquement» satisfaisant et devrait faire l'objet d'analyses complémentaires permettant d'orienter ces cas vers les autres étiologies de macroplaquettes que nous allons aborder.

Auparavant, nous montrons au niveau du *tableau IX* et de l'*annexe 5* l'entité Bolzano comparativement aux cas de SBS. L'étude de notre faible effectif (n=3) montre que la numération plaquettaire est faiblement diminuée, la MPM et la MPC sont toujours augmentées et que le VPM est également augmenté avec des valeurs comprises entre 12,9 fL et 16,5 fL. Ces valeurs de VPM permettent de différencier l'entité Bolzano des cas de SBS homozygotes. Ces données sont cohérentes avec l'étude de Noris *et coll.* (2009).

Le groupe des thrombopénies avec macroplaquettes (*tableau VIII et annexe 4*) (en dehors des entités syndromiques comme le syndrome de la délétion 22q11.2 ou le syndrome de Paris-Trousseau inclus dans un syndrome de Jacobsen) est composé d'entités variées et hétérogènes. Les principales entités sont représentées par la maladie de Willebrand de type plaquettaire ou Pseudo-Willebrand plaquettaire qu'il faut distinguer de la maladie de Willebrand de type 2B, la forme macrocytaire de la maladie de Glanzmann et enfin le groupe des macrothrombopénies méditerranéennes autosomiques dominantes (dont le variant Bolzano). La distinction entre maladie de Willebrand 2B et Pseudo-Willebrand plaquettaire nécessite la recherche des mutations respectives sur les chromosomes 12 et 17 et peut être orientée par le test des « épreuves croisées plaquettaires » (68). Dans notre étude portant sur sept cas de maladie de Willebrand 2B et deux cas de Pseudo-Willebrand, il est intéressant de noter l'absence d'anomalies des paramètres plaquettaires dans les cas de Pseudo-Willebrand alors qu'une augmentation du VPM associée à celles du PDM et de la MPM et la présence



inconstante de GP témoignent de la présence de macroplaquettes dans la maladie de Willebrand 2B. Il est rapporté dans la littérature que la thrombopénie et la présence de macroplaquettes sont fluctuantes dans ces pathologies et dépendent notamment d'un contexte inflammatoire ou de stress (81). Dans le cas de nos patients, nous n'avons pas l'information d'un éventuel contexte inflammatoire ou même de stress qu'il serait difficile à appréhender à partir d'un simple bilan biologique. La tendance observée dans notre étude doit être confirmée sur un effectif plus important.

Récemment, des formes macrocytaires de la maladie de Glanzmann ont été décrites (120). Dans notre étude, nous rapportons quatre cas de maladie de Glanzmann associés à des macroplaquettes parmi les quinze cas inclus. Il serait intéressant de savoir si ces cas présentent la mutation Arg995 de GPIIb ou Asp723 de GPIIIa et sont de transmission dominante.

- Enfin, nous avons inclus un groupe de patients présentant une pathologie des granules. Concernant l'anomalie des granules denses, les résultats montrent une hétérogénéité des profils plaquettaires d'un patient à l'autre, ce qui ne permet pas de définir une identité phénotypique. L'étude des deux cas d'anomalie des granules  $\alpha$  (syndrome des plaquettes grises) montre une augmentation inconstante du VPM, alors qu'il est décrit que cette entité présentent des macroplaquettes optiquement vides. Les autres paramètres plaquettaires sont également trop hétérogènes pour être informatifs. Dans cette entité, c'est surtout l'observation du frottis sanguin qui peut orienter le diagnostic. En conclusion sur les anomalies des granules, les valeurs des paramètres plaquettaires sont trop discordantes d'un patient à l'autre pour être informatives dans la démarche diagnostique.

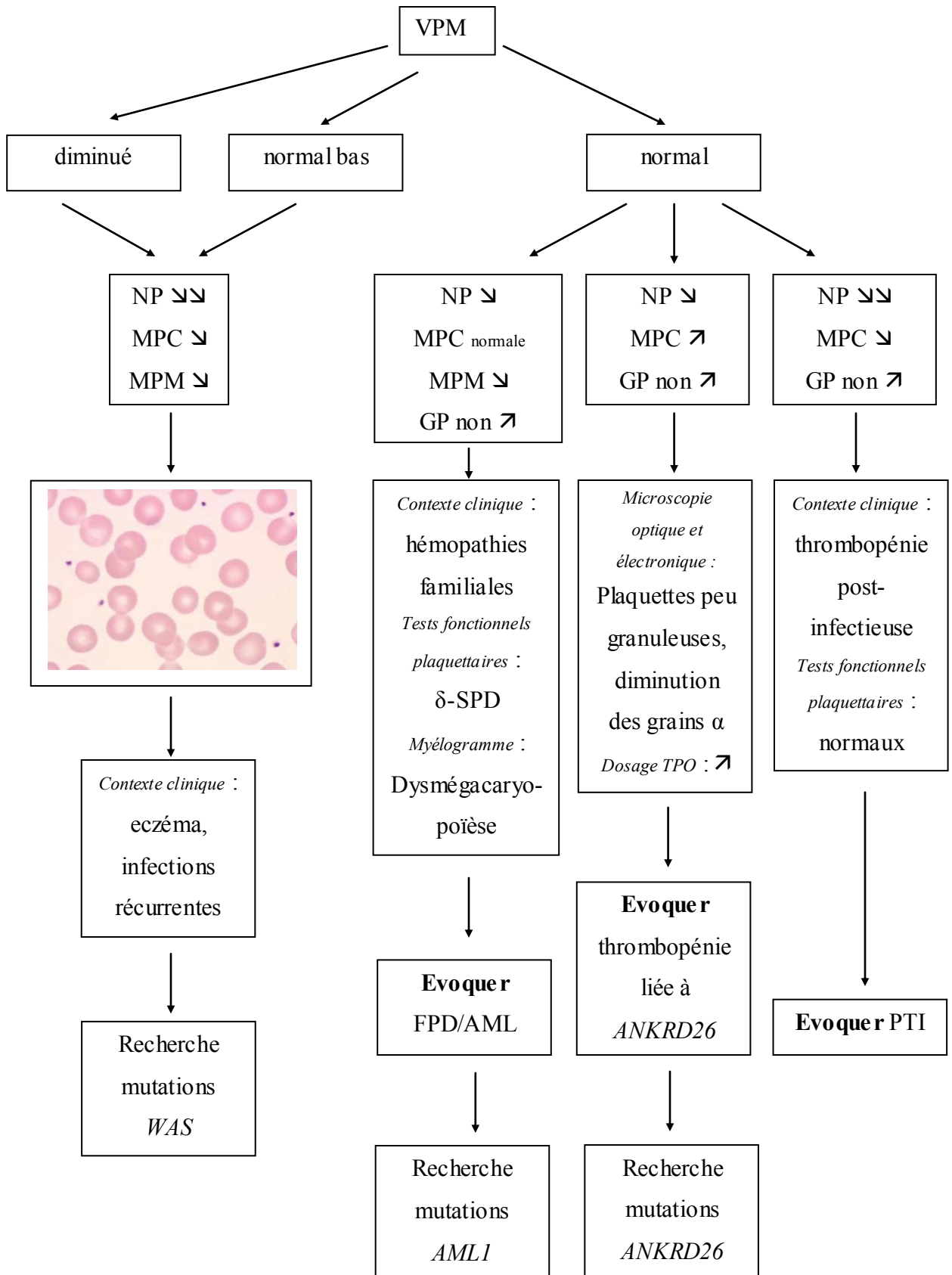
Bien que notre étude ait démontré les potentiels des paramètres plaquettaires dans la démarche diagnostique de certaines thrombopénies constitutionnelles, la première étape de ce travail, qui a consisté à analyser systématiquement l'ensemble des histogrammes et cytogrammes, a permis de revenir sur les limites de l'ADVIA<sup>®</sup>2120. Nombreuses publications ont mis en évidence la supériorité des appareils à mesure optique comparativement à la technologie par impédance, notamment concernant la reconnaissance des grandes plaquettes (54,55,178). L'analyse bidimensionnelle des plaquettes selon leur taille et leur réfraction et le principe de l'analyse combinée des globules rouges et des

plaquettes permettent une identification plus précise des plaquettes de grande taille. Plusieurs études ont d'ailleurs démontré l'incapacité des appareils à impédancemétrie à rendre un résultat de VPM dans des contextes de thrombopénies à plaquettes géantes (20,77). Cependant, une étude multicentrique, réalisée dans l'objectif de comparer la précision de différents automates dans des contextes de thrombopénies sévères (numération plaquettaire inférieure à 20 G/L) par rapport à la CMF, a démontré que la plupart des automates (dont l'ADVIA®120) surestimait la population plaquettaire ce qui entraînait une diminution des indications de transfusions (41). Dans ce contexte, les appareils à mesure optique ne montraient pas leur supériorité par rapport aux appareils à impédance. Dans les suites de cette étude, un des contrôles de qualité externe du Royaume-Uni (National External Quality Assessment Service, NEQAS) a proposé des échantillons dont la numération plaquettaire était inférieure à 20 G/L. Les résultats du contrôle national montraient un coefficient de variation inter-laboratoire de 22 à 66% (179).

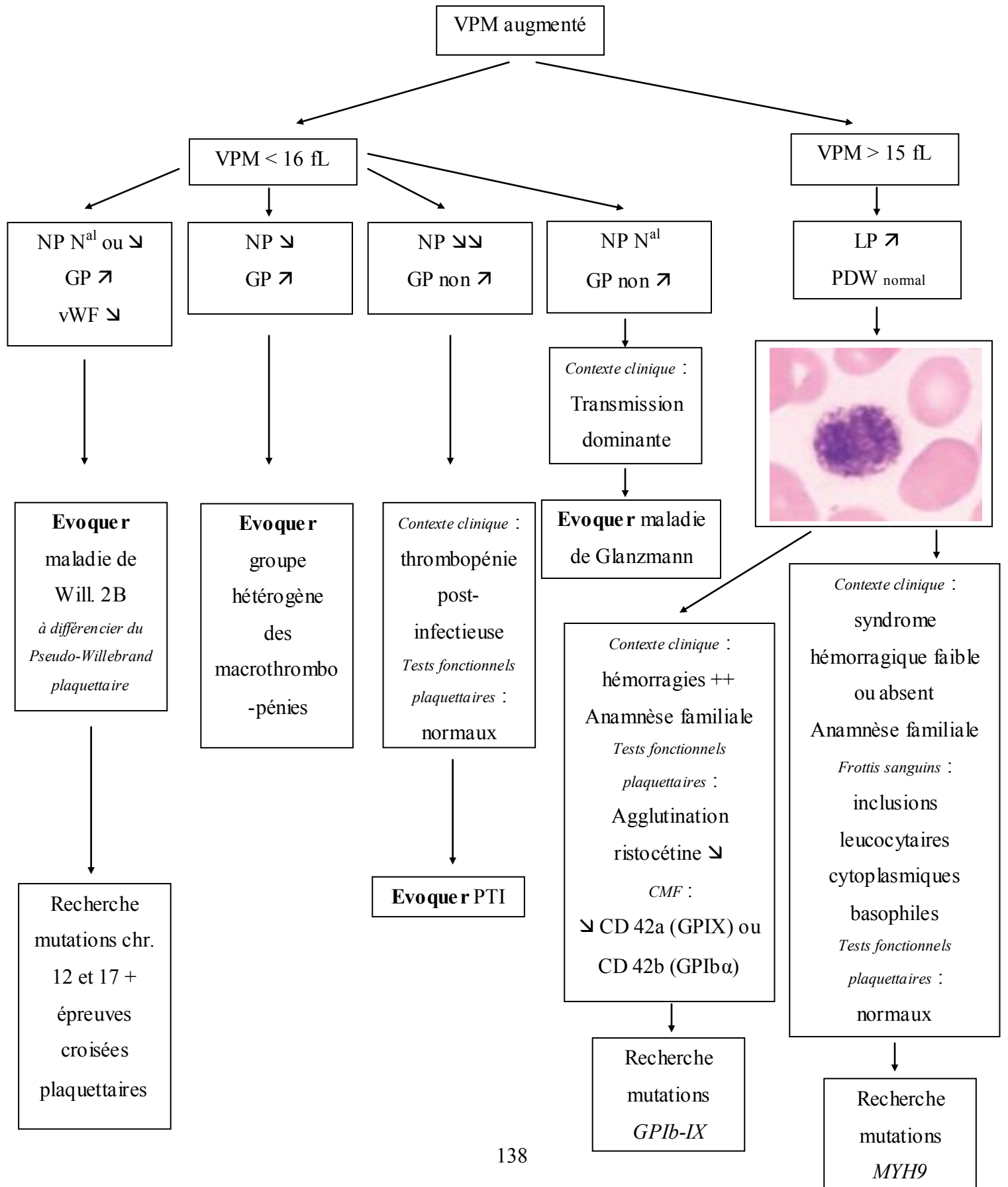
Dans notre étude, les cas de PTI, qui présentaient les numérations plaquettaires les plus basses, représente la population où le plus grand nombre de cas a été exclu de la base de données en raison d'un problème analytique. Dans la démarche de validation technique d'une analyse, il est donc essentiel d'observer attentivement l'histogramme *Volume / CP Plaq* ainsi que la courbe de distribution volumétrique (histogramme *Vol Plaq*). La présence d'une courbe d'ajustement rouge et une diminution importante du coefficient d'anisocytose plaquettaire (PDW) doivent alerter le technicien et le biologiste sur un éventuel problème d'identification de la population plaquettaire. Ces cas se présentant surtout dans des contextes de thrombopénie sévère (inférieure à 20 G/L), ils doivent faire discuter le contrôle de la numération plaquettaire par cytométrie en flux.

Cette étude multicentrique développée dans l'objectif de caractériser les thrombopénies constitutionnelles par des paramètres plaquettaires innovants nous a permis de proposer des organigrammes décisionnels en fonction des différents phénotypes plaquettaires (*cf page suivante*). En poursuivant cette étude dans une démarche prospective, l'inclusion d'un plus grand nombre de cas permettra de renforcer la cohorte et éventuellement de conforter les tendances observées. De plus, l'utilisation de ces organigrammes décisionnels dans la démarche diagnostique d'une thrombopénie permettra de conclure quant à la potentielle application clinique de ces paramètres.

ORGANIGRAMMES DECISIONNELS EN FONCTION DU PHENOTYPE  
PLAQUETTAIRE



ORGANIGRAMMES DECISIONNELS EN FONCTION DU PHENOTYPE  
PLAQUETTAIRE



**REFERENCES**

**BIBLIOGRAPHIQUES**



1. ELALAMY I (2006) Thrombopathies acquises et congénitales. *Hématologie*, 1-19.
2. PATEL SR, HARTWIG JH et ITALIANO JE (2005) The biogenesis of platelets from megakaryocyte proplatelets. *J. Clin. Invest.*, 115(12):3348-3354.
3. DEUTSCH VR et TOMER A (2006) Megakaryocyte development and platelet production. *British Journal of Haematology*, 134(5):453-466.
4. TOMER A (2004) Human marrow megakaryocyte differentiation: multiparameter correlative analysis identifies von Willebrand factor as a sensitive and distinctive marker for early (2N and 4N) megakaryocytes. *Blood*, 104(9):2722-2727.
5. GEORGE JN (2000) Platelets. *Lancet*, 355(9214):1531-1539.
6. LONG MW (1998) Megakaryocyte differentiation events. *Semin. Hematol.*, 35(3):192-199.
7. ZUCKER-FRANKLIN D et PETURSSON S (1984) Thrombocytopoiesis--analysis by membrane tracer and freeze-fracture studies on fresh human and cultured mouse megakaryocytes. *J. Cell. Biol.*, 99(2):390-402.
8. JANDROT-PERRUS M et NURDEN P (2010) Des fonctions plaquettaires aux implications thérapeutiques. *La Revue de Médecine Interne*, 31:319-323.
9. KAUSHANSKY K (2005) The molecular mechanisms that control thrombopoiesis. *J. Clin. Invest.*, 115(12):3339-3347.
10. Université Angers. *Hematocell.fr*. <http://hematocell.univ-angers.fr/>.
11. KELEMEN E, CSERHATI I et TANOS B (1958) Demonstration and some properties of human thrombopoietin in thrombocythemic sera. *Acta haematologica*, 20:350-355.
12. JAGERSCHMIDT A, FLEURY V, ANGER-LEROY M, THOMAS C, AGNEL M, OBRIEN D (1998) Human thrombopoietin structure–function relationships: identification of functionally important residues. *Biochem. J.*, 333(3):729-734.
13. HAS Haute autorité de santé. *Guide affection longue durée. Purpura thrombopénique immunologique de l'enfant et de l'adulte - Protocole national de diagnostic et de soins*. 2009.
14. MICHEL M (2006) Agonistes du récepteur de la thrombopoïétine : actualités et perspectives. *Hématologie*, 12(5):305-314.
15. SHINJO K, TAKESHITA A, NAKAMURA S, NAITOH K, YANAGI M et TOBITA T (1998) Serum thrombopoietin levels in patients correlate inversely with platelet counts during chemotherapy-induced thrombocytopenia. *Leukemia*, 12(3):295-300.
16. KASER A, BRANDACHER G, STEURER W, KASER S, OFFNER FA et ZOLLER H (2001) Interleukin-6 stimulates thrombopoiesis through thrombopoietin: role in inflammatory thrombocytosis. *Blood*, 98(9):2720-2725.
17. SEBAHOUN G. *Hématologie clinique et biologique - Plaquettes*. Arnette. 2005.

18. LATGER-CANNARD V, SALIGNAC S, SALMON A, MANSUY L, de MAISTRE E et BOTTE C (2005) Validation et classification clinicobiologique d'une thrombopénie. *Annales de biologie clinique*, 63(6):599-610.
19. LATGER-CANNARD V, FENNETEAU O et LECOMPTE T et le Centre de Référence des Pathologies Plaquettaires (2011) *Morphologie plaquettaire et mégacaryocytaire : aide au diagnostic des thrombopénies constitutionnelles*. [http://site.geht.org/site/Pratiques-Professionnelles/Thrombopenies-constitutionnelles/Morphologie-plaquettaire-et-diagnostic-des-thrombopenies-constitutionnelles\\_92\\_.html](http://site.geht.org/site/Pratiques-Professionnelles/Thrombopenies-constitutionnelles/Morphologie-plaquettaire-et-diagnostic-des-thrombopenies-constitutionnelles_92_.html) /
20. LATGER-CANNARD V, HOARAU M, SALIGNAC S, BAUMGART D, NURDEN P et LECOMPTE T (2012) Mean platelet volume: comparison of three analysers towards standardization of platelet morphological phenotype. *Int. J. Lab. Hematol.*, 34(3):300-310.
21. NURDEN P et NURDEN AT (2008) Congenital disorders associated with platelet dysfunctions. *Thromb. Haemost.*, 99(2):253-263.
22. LÓPEZ JA, ANDREWS RK, AFSHAR-KHARGHAN V et BERNDT MC (1998) Bernard-Soulier Syndrome. *Blood*, 91(12):4397-4418.
23. DU X et GINSBERG MH (1997) Integrin alpha IIb beta 3 and platelet function. *Thromb. Haemost.*, 78(1):96-100.
24. VARGA-SZABO D, PLEINES I et NIESWANDT B (2008) Cell adhesion mechanisms in platelets. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 28(3):403-412.
25. CRAMER E (2000) Le syndrome des plaquettes grises : un modèle de pathologie agranulaire. *Hématologie*, 6(3): 210-218.
26. Université Angers. *Hematocell.fr. Les plaquettes sanguines : structure, fonctions, méthodes d'exploration*. [hematocell.univ-angers.fr/](http://hematocell.univ-angers.fr/).
27. ADELSON E, RHEINGOLG J et CROSBY W (1961) The platelet as a sponge: a review. *Blood*, 17:767-774
28. de REVEL T et DOGHMI K (2004) Physiologie de l'hémostase. *EMC-Dentisterie*, 1:71-81.
29. JACKSON SP (2007) The growing complexity of platelet aggregation. *Blood*, 109(12):5087-5095.
30. MCNICOL A et ISRAELS SJ (2008) Beyond hemostasis: the role of platelets in inflammation, malignancy and infection. *Cardiovasc. Hematol. Disord. Drug Targets*, 8(2):99-117.
31. LENTZ BR (2003) Exposure of platelet membrane phosphatidylserine regulates blood coagulation. *Prog. Lipid Res.*, 42(5):423-438.
32. LECOMPTE T. *Médicaments antiplaquettaires (inhibiteurs des fonctions plaquettaires)*. Manuel d'hémostase. Editions scientifiques et médicales Elsevier. 1995.

33. COPPINGER JA, CAGNEY G, TOOMEY S, KISLINGER T, BELTON O et MCREDMOND JP (2004) Characterization of the proteins released from activated platelets leads to localization of novel platelet proteins in human atherosclerotic lesions. *Blood*, 103(6):2096-2104.
34. SMYTH SS, MCEVER RP, WEYRICH AS, MORRELL CN, HOFFMAN MR et AREPALLY GM (2009) Platelet functions beyond hemostasis. *J. Thromb. Haemost.*, 7(11):1759-1766.
35. SMADJA D, HELLEY D et GAUSSEM P (2010) Angiogenèse, traitement héparinique et pathologies cancéreuses. *Hématologie*, 16(2):129-142.
36. VARKI A (2007) Trousseau's syndrome: multiple definitions and multiple mechanisms. *Blood*, 110(6):1723-1729.
37. GASIC GJ, GASIC TB et STEWART CC (1968) Antimetastatic effects associated with platelet reduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 61(1):6-52.
38. RUGGERI ZM et MENDOLICCHIO GL (2007) Adhesion mechanisms in platelet function. *Circ. Res.*, 100(12):1673-1685.
39. KUNZ D, HÖFFKES H, KUNZ WS et GRESSNER AM (2000) Standardized flow cytometric method for the accurate determination of platelet counts in patients with severe thrombocytopenia. *Cytometry*, 42(5):284-289.
40. WANDT H, FRANK M, EHNINGER G, SCHNEIDER C, BRACK N et DAOUD A (1998) Safety and cost effectiveness of a 10 x 10<sup>9</sup>/L trigger for prophylactic platelet transfusions compared with the traditional 20 x 10<sup>9</sup>/L trigger: a prospective comparative trial in 105 patients with acute myeloid leukemia. *Blood*, 91(10):3601-3606.
41. SEGAL HC, BRIGGS C, KUNKA S, CASBARD A, HARRISON P et MACHIN SJ (2005) Accuracy of platelet counting haematology analysers in severe thrombocytopenia and potential impact on platelet transfusion. *Br. J. Haematol.*, 128(4):520-525.
42. PATEL N (2009) Why is EDTA anticoagulant of choice for hematology use ? *Tech talk (BD Diagnostics)*. 7(1).
43. COHLE SD, SALEEM A et MAKKAOUI DE (1981) Effects of storage of blood on stability of hematologic parameters. *Am. J. Clin. Pathol.*, 76(1):67-69.
44. Has Haute autorité de Santé. *ANAES. Lecture critique de l'hémogramme : valeurs seuils à reconnaître comme probablement pathologiques et principales variations non pathologiques*. 1997.
45. BRUMMITT DR et BARKER HF (2000) The determination of a reference range for new platelet parameters produced by the Bayer ADVIA120 full blood count analyser. *Clin. Lab. Haematol.*, 22(2):103-107.



46. GIACOMINI A, LEGOVINI P, GESSONI G, ANTICO F, VALVERDE S et SALVADEGO MM (2001) Platelet count and parameters determined by the Bayer ADVIA 120 in reference subjects and patients. *Clin. Lab. Haematol.*, 23(3):181-186.
47. BRIGGS C, HARRISON P et MACHIN SJ (2007) Continuing developments with the automated platelet count. *Int. J. Lab. Hematol.*, 29(2):77-91.
48. COULTER W (1956) High speed automatic blood cell counter and cell size analyzer. *Proc. Natl. Electron Conf.*, (12):1034-1042.
49. IMBERT M et JOUAULT H (2004) Hémogramme : réalisation par un automate, *EMC-Biologie médicale*.
50. SANDHAUS LM, OSEI ES, AGRAWAL NN, DILLMAN CA et MEYERSON HJ (2002) Platelet counting by the coulter LH 750, sysmex XE 2100, and advia 120: a comparative analysis using the RBC/platelet ratio reference method. *Am. J. Clin. Pathol.*, 118(2):235-241.
51. ZANDECKI M, GENEVIEVE F, GERARD J et GODON A (2007) Spurious counts and spurious results on haematology analysers: a review. Part I: platelets. *Int. J. Lab. Hematol.*, 29(1):4-20.
52. VAN VLIET HH, KAPPERS-KLUNNE MC et ABELS J (1986) Pseudothrombocytopenia: a cold autoantibody against platelet glycoprotein GP IIb. *Br. J. Haematol.*, 62(3):501-511.
53. GERARD J, GENEVIEVE F, GODON A, LESESVE J-F et ZANDECKI M. *Plaquet'air - Anomalies de la numération plaquettaire et appareils automatisés d'hématologie*. Beckman Coulter, 2006.
54. KUNICKA JE, FISCHER G, MURPHY J et ZELMANOVIC D (2000) Improved platelet counting using two-dimensional laser light scatter. *Am. J. Clin. Pathol.*, 114(2):283-289.
55. HARRISON P, HORTON A, GRANT D, BRIGGS C et MACHIN S (2000) Immunoplatelet counting: a proposed new reference procedure. *Br. J. Haematol.*, 108(2):228-235.
56. BRECHER G, SCHNEIDERMAN M et CRONKITE EP (1953) The reproducibility and constancy of the platelet count. *Am. J. Clin. Pathol.*, 23(1):15-26.
57. JOUAULT H et CARON-SERVAN B (2003) Numération des plaquettes en cellule de Malassez. *EMC-Biologie médicale*.
58. ICSH (1988) Recommended methods for the visual determination of white cell and platelet counts. *WHO LAB*, 88, 3.
59. AULT KA (1996) Platelet counting. Is there room for improvement? *Laboratory Hematology*, 2:139-143.

60. DICKERHOFF R, VON RUECKER A (1995) Enumeration of platelets by multiparameter flow cytometry using platelet-specific antibodies and fluorescent reference particles. *Clin. Lab. Haematol.*, 17(2):163-172.
61. HARRISON P, AULT KA, CHAPMAN S, CHARIE L, DAVIS B et FUJIMOTO K (2001) An interlaboratory study of a candidate reference method for platelet counting. *Am. J. Clin. Pathol.*, 115(3):448-459.
62. ICSH (2001) Platelet counting by the RBC/platelet ratio method: a reference method. *American journal of clinical pathology*, 115:460-464.
63. HARRISON P (2005) Platelet function analysis. *Blood*, 19(2):111-123.
64. LECOMPTE T (1999) Exploration des fonctions plaquettaires en pratique clinique. *Spectra biologie*, 18:21-26.
65. HAS Haute autorité de santé. *Rapport d'évaluation technologique-Biologie des anomalies de l'hémostase*. 2011.
66. Cahier de formation biologie médicale. Hémostase et thrombose n°20. Bioforma. 2000.
67. RINDER HM, MURPHY M, MITCHELL JG, STOCKS J, AULT KA et HILLMAN RS (1991) Progressive platelet activation with storage: evidence for shortened survival of activated platelets after transfusion. *Transfusion*, 31(5):409-414.
68. BALDUINI CL, CATTANEO M, FABRIS F, GRESELE P, IOLASCON A et PULCINELLI FM (2003) Inherited thrombocytopenias: a proposed diagnostic algorithm from the Italian Gruppo di Studio delle Piastrine. *Haematologica*, 88(5):582-592.
69. NISHIBORI M, CHAM B, MCNICOL A, SHALEV A, JAIN N et GERRARD JM (1993) The protein CD63 is in platelet dense granules, is deficient in a patient with Hermansky-Pudlak syndrome, and appears identical to granulophysin. *J. Clin. Invest.*, 91(4):1775-1782.
70. NURDEN P, DREYFUS M, FAVIER R, NEGRIER C, SCHLEGEL N et SIE P (2007) Centre de référence des pathologies plaquettaires. *Archives de Pédiatrie*, 14(6):679-682.
71. CRPP. *Le centre de référence des pathologies plaquettaires explique son rôle et ses missions*. [www.maladies-plaquettes.org/fr/le-crpp-en-quelques-mots.html](http://www.maladies-plaquettes.org/fr/le-crpp-en-quelques-mots.html)
72. LEVY J-P *Hématologie et transfusion*. Issy-les-Moulineaux, Elsevier Masson, 2008.
73. LEVERGER G, PETIT A, FASOLA S, LANDMAN-PARKER J et FAVIER R (2010) Les thrombopénies génétiques. *Archives de pédiatrie*, 17(8):1185-1191.
74. DRACHMAN JG (2004) Inherited thrombocytopenia: when a low platelet count does not mean ITP. *Blood*, 103(2):390-398.
75. GOHDA F, UCHIUMI H, HANDA H, MATSUSHIMA T, TSUKAMOTO N et MORITA K (2007) Identification of inherited macrothrombocytopenias based on mean

- platelet volume among patients diagnosed with idiopathic thrombocytopenia. *Thromb. Res.*, 119(6):741-746.
76. BADER-MEUNIER B, PROULLE V, TRICHET C, DEBRAY D et GABOLDE M, YVART J (2003) Misdiagnosis of chronic thrombocytopenia in childhood. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.*, 25(7):548-552.
  77. NORIS P, KLERSY C, ZECCA M, ARCAINI L, PECCI A et MELAZZINI F (2009) Platelet size distinguishes between inherited macrothrombocytopenias and immune thrombocytopenia. *J. Thromb. Haemost.*, 7(12):2131-2136.
  78. GEDDIS AE et KAUSHANSKY K (2004) Inherited thrombocytopenias: toward a molecular understanding of disorders of platelet production. *Curr. Opin. Pediatr.*, 16(1):15-22.
  79. NORIS P, PECCI A, DI BARI F, DI STAZIO M, DI PUMPO M et CERESA I (2004) Application of a diagnostic algorithm for inherited thrombocytopenias to 46 consecutive patients. *Haematologica*, 89:1219-1225.
  80. LATGER-CANNARD V, PROUST A, DEVIGNES J, SALIGNAC S, BENSOUSSAN D et SALMON A (2008) Syndrome de Wiskott-Aldrich chez un enfant révélé par l'examen morphologique attentif des plaquettes. *Hématologie*, 14(5):387-391.
  81. TRICHET C, BEAUCHAMP-NICOUD A, PROULLE V, BADER-MEUNIER B, TCHERNIA G et DREYFUS M (2003) Les thrombopénies constitutionnelles : de la clinique à la biologie. *Hématologie*, 9(6):439-455.
  82. OCHS H et THRASHER A (2006) The Wiskott-Aldrich syndrome. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 117(4):725-738.
  83. OCHS HD, SLICHTER SJ, HARKER LA, VON BEHRENS WE, CLARK RA et WEDGWOOD RJ (1980) The Wiskott-Aldrich syndrome: studies of lymphocytes, granulocytes, and platelets. *Blood*, 55(2):243-252.
  84. SABRI S, FOUADI A, BOUKOUR S, FRANC B, CHARRIER S et JANDROT-PERRUS M (2006) Deficiency in the Wiskott-Aldrich protein induces premature proplatelet formation and platelet production in the bone marrow compartment. *Blood*, 108(1):134-140.
  85. HADDAD E, CRAMER E, RIVIÈRE C, RAMEAU P, LOUACHE F et GUICHARD J (1999) The thrombocytopenia of Wiskott Aldrich syndrome is not related to a defect in proplatelet formation. *Blood*, 94(2):509-518.
  86. DOWTON SB, BEARDSLEY D, JAMISON D, BLATTNER S et LI FP (1985) Studies of a familial platelet disorder. *Blood*, 65(3):557-563.
  87. HO CY, OTTERUD B, LEGARE RD, VARVIL T, SAXENA R et DEHART DB (1996) Linkage of a familial platelet disorder with a propensity to develop myeloid malignancies to human chromosome 21q22.1-22.2. *Blood*, 87(12):5218-5224.

88. BÉRI-DEXHEIMER M, LATGER-CANNARD V, PHILIPPE C, BONNET C, CHAMBON P et ROTH V (2008) Clinical phenotype of germline RUNX1 haploinsufficiency: from point mutations to large genomic deletions. *Eur. J. Hum. Genet.*, 16(8):1014-1018.
89. BLUTEAU D, GLEMBOTSKY AC, RAIMBAULT A, BALAYN N, GILLES L et RAMEAU P (2012) Dysmegakaryopoiesis of FPD/AML pedigrees with constitutional RUNX1 mutations is linked to myosin II deregulated expression. *Blood*, 120(13):2708-2718.
90. LATGER-CANNARD V, PHILIPPE C, JONVEAUX P, LECOMPTE T et FAVIER R (2011) Dysmegakaryopoiesis, a clue for an early diagnosis of familial platelet disorder with propensity to acute myeloid leukemia in case of unexplained inherited thrombocytopenia associated with normal-sized platelets. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.*, 33(7):264-266.
91. NORIS P, PERROTTA S, SERI M, PECCI A, GNAN C et LOFFREDO G (2011) Mutations in ANKRD26 are responsible for a frequent form of inherited thrombocytopenia: analysis of 78 patients from 21 families. *Blood*, 117(24):6673-6680.
92. PIPPUCCI T, SAVOIA A, PERROTTA S, PUJOL-MOIX N, NORIS P et CASTEGNARO G (2011) Mutations in the 5' UTR of ANKRD26, the ankirin repeat domain 26 gene, cause an autosomal-dominant form of inherited thrombocytopenia, THC2. *Am. J. Hum. Genet.*, 88(1):115-120.
93. SAVOIA A, DUFOUR C, LOCATELLI F, NORIS P, AMBAGLIO C et ROSTI V (2007) Congenital amegakaryocytic thrombocytopenia: clinical and biological consequences of five novel mutations. *Haematologica*, 92(9):1186-1193.
94. NURDEN AT, FRESON K et SELIGSOHN U (2012) Inherited platelet disorders. *Haemophilia*, 18:154-160.
95. ARIAS S, PENCHASZADEH VB, PINTO-CISTERNAS J, LARRAURI S et OPITZ JM (1980) The IVIC syndrome: A new autosomal dominant complex pleiotropic syndrome with radial ray hypoplasia, hearing impairment, external ophthalmoplegia, and thrombocytopenia. *American Journal of Medical Genetics*, 6(1):25-59.
96. PARADISI I et ARIAS S (2007) IVIC syndrome Is caused by a c.2607delA mutation in the SALL4 locus, *American Journal of Medical Genetics Part A*. 143(4):326-332.
97. GIRARD S, PONDARRE C, ANDRE J-M, PAGES M-P et BERTRAND Y (2009) Diagnostic néonatal d'un syndrome de Jacobsen avec thrombopénie «Paris-Trousseau». *Hématologie*, 15(3):240-242.
98. LATGER-CANNARD V, VIGNERON J, FAVIER R, de MAISTRE E, LESESVE J et BUISINE J. Plaquet'air - *Thrombopénie «Paris-Trousseau» et syndrome de Jacobsen*. Beckman Coulter, 2000.
99. FAVIER R, JONDEAU K, BOUTARD P, GROSSFELD P, REINERT P et JONES C (2003) Paris-Trousseau syndrome : clinical, hematological, molecular data of ten new cases. *Thromb. Haemost.*, 90(5):893-897.

100. NICHOLS KE, CRISPINO JD, PONCZ M, WHITE JG, ORKIN SH et MARIS JM (2000) Familial dyserythropoietic anaemia and thrombocytopenia due to an inherited mutation in GATA1. *Nat. Genet.*, 24(3):266-270.
101. SCHIVDASANI R, FUJIWARA Y, MCDEVITT M et ORKIN S (1997) A lineage-selective knockout establishes the critical role of transcription factor GATA-1 in megakaryocyte growth and platelet development. *EMBO J.*, 16:3965-3973.
102. FRESON K, DEVRIENDT K, MATTHIJS G, VAN HOOFF A, DE VOS R et THYS C (2001) Platelet characteristics in patients with X-linked macrothrombocytopenia because of a novel GATA1 mutation. *Blood*, 98(1):85-92.
103. VAN GEET C, DEVRIENDT K, EYSKENS B, VERMYLEN J et HOYLAERTS MF (1998) Velocardiofacial syndrome patients with a heterozygous chromosome 22q11 deletion have giant platelets. *Pediatr. Res.*, 44(4):607-611.
104. LESESVE J, LATGER-CANNARD V, BENBIH M et LECOMPTE T. Plaquet'air - *Pseudo syndrome du pool vide par dégranulation plaquettaire due à l'EDTA*. Beckman Coulter, 2004.
105. RIVIER A, SALIGNAC S, LESESVE J, TOUSSAINT-HACQUARD M, BRIQUEL M et LECOMPTE T. Plaquet'air - *Syndrome des plaquettes grises*. Beckman Coulter, 2006.
106. KAHR WHA, HINCKLEY J, LI L, SCHWERTZ H, CHRISTENSEN H et ROWLEY JW (2011) Mutations in NBEAL2, encoding a BEACH protein, cause gray platelet syndrome. *Nat. Genet.*, 43(8):738-740.
107. BEHRENS WE (1975) Mediterranean macrothrombocytopenia. *Blood*, 46(2):199-208.
108. NURDEN P, DEBILI N, COUPRY I, BRYCKAERT M, YOULYOUZ-MARFAK I et SOLÉ G (2011) Thrombocytopenia resulting from mutations in filamin A can be expressed as an isolated syndrome. *Blood*, 118(22):5928-5937.
109. HAMILTON A, OZELO M, LEGGO J, NOTLEY C, BROWN H et FRONTROTH JP (2011) Frequency of platelet type versus type 2B von Willebrand disease. An international registry-based study. *Thromb. Haemost.*, 105(3):501-508.
110. LANZA F (2006) Bernard-Soulier syndrome (Hemorrhagiparous thrombocytic dystrophy). *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 1(1)46.
111. BALDUINI CL et SAVOIA A (2012) Genetics of familial forms of thrombocytopenia. *Hum. Genet.*
112. SAVOIA A, PASTORE A, DE ROCCO D, CIVASCHI E, DI STAZIO M et BOTTEGA R (2011) Clinical and genetic aspects of Bernard-Soulier syndrome: searching for genotype/phenotype correlations. *Haematologica*, 96(3):417-423.
113. PECCI A, BIINO G, FIERRO T, BOZZI V, MEZZASOMA A et NORIS P (2012) Alteration of liver enzymes is a feature of the MYH9-related disease syndrome. *PLoS One*, 7(4):359-386.

114. LESEVE J, LATGER-CANNARD V, BRIQUEL M, ANDRE E, DE MAISTRE E et LECOMPTE T. Plaquet'air - *Anomalie de May-Hegglin*. Beckman Coulter, 2000.
115. HEATH KE, CAMPOS-BARROS A, TOREN A, ROZENFELD-GRANOT G, CARLSSON LE et SAVIGE J (2001) Nonmuscle myosin heavy chain IIA mutations define a spectrum of autosomal dominant macrothrombocytopenias: May-Hegglin anomaly and Fechtner, Sebastian, Epstein, and Alport-like syndromes. *Am. J. Hum. Genet.*, 69(5):1033-1045.
116. KUNISHIMA S, MATSUSHITA T, SHIRATSUCHI M, IKUTA T, NISHIMURA J et HAMAGUCHI M (2005) Detection of unique neutrophil non-muscle myosin heavy chain-A localization by immunofluorescence analysis in MYH9 disorder presented with macrothrombocytopenia without leukocyte inclusions and deafness. *Eur. J. Haematol.*, 74(1):1-5.
117. The Samuel Bronfman Department of Medicine. *Glanzmann Thrombasthenia Database*. <http://sinaicentral.mssm.edu/intranet/research/glanzmann>
118. NURDEN AT, FIORE M, NURDEN P et PILLOIS X (2011) Glanzmann thrombasthenia: a review of ITGA2B and ITGB3 defects with emphasis on variants, phenotypic variability, and mouse models. *Blood*, 118(23):5996-6005.
119. NURDEN AT (2006) Glanzmann thrombasthenia. *Orphanet Journal of Rare Diseases*:1-10.
120. NURDEN AT, PILLOIS X, FIORE M, HEILIG R et NURDEN P (2011) Glanzmann thrombasthenia-like syndromes associated with Macrothrombocytopenias and mutations in the genes encoding the  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 integrin. *Semin. Thromb. Hemost.*, 37(6):698-706.
121. GHEVAERT C, SALSMANN A, WATKINS NA, SCHAFFNER-RECKINGER E, RANKIN A et GARNER SF (2008) A nonsynonymous SNP in the ITGB3 gene disrupts the conserved membrane-proximal cytoplasmic salt bridge in the  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 integrin and cosegregates dominantly with abnormal proplatelet formation and macrothrombocytopenia. *Blood*, 111(7):3407-3414.
122. MASLIAH-PLANCHON J, FLAUJAC C, TAPON-BRETAUDIÈRE J, CRAMER-BORDE EM et DARNIGE L (2008) Mise au point : la maladie du pool vide plaquettaire. *Annales de Biologie Clinique*, 66(4):365-369.
123. TOPI-ORFANOUDAKIS F, SATTÀ N, FRESSINAUD E, MEYER D, FREYSSINET J (1996) Le syndrome de Scott : un témoin de l'importance des phospholipides dans les réactions de la coagulation et une référence pour une nouvelle approche pharmacologique du risque thrombotique. *Hématologie*, 2(2):111-119.
124. LISMAN T, MOSCHATIS S, ADELMEIJER J, NIEUWENHUIS HK et GROOT PGD (2003) Recombinant factor VIIa enhances deposition of platelets with congenital or acquired  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 deficiency to endothelial cell matrix and collagen under conditions of flow via tissue factor-independent thrombin generation. *Blood*, 101(5):1864-1870.

125. MAURY B, LACHASSINNE E, ECLACHE V, AUROUSSEAU M et GAUDELUS J (2002) Diagnostic d'une thrombopénie néonatale. *Médecine thérapeutique/Pédiatrie*, 5(1):59-64.
126. GEORGE JN et ASTER RH (2009) Drug-induced thrombocytopenia: pathogenesis, evaluation, and management. *Hematology*, 1:153-158.
127. DE MAISTRE E, DESCHASEAUX C, LESESVE J, LATGER-CANNARD V et LECOMPTE T. Plaquet'air - *Thrombopénie imputable au paracétamol*. Beckman Coulter, 2001.
128. OUHSC. *Platelets on the Web*. [www.ouhsc.edu/platelets/](http://www.ouhsc.edu/platelets/).
129. DROUET L (2010) Il existe non pas une, mais plusieurs CIVD. *Sang Thrombose Vaisseaux*, 22(3):6-19.
130. NAJEAN Y et LECOMPTE T (1989) Chronic pure thrombocytopenia in elderly patients. An aspect of the myelodysplastic syndrome. *Cancer*, 64(12):2506-2510.
131. MICHEL M, DOZ M, LECLERC-TEFFAHI S, DETOURNAY B et LÉVY-BACHELOT L (2012) Management of immune thrombocytopenia in France before the era of thrombopoietin receptor agonists. *Rev. Med. Interne*, 33(6):305-310.
132. STASI R, EVANGELISTA ML, STIPA E, BUCCISANO F, VENDITTI A et AMADORI S (2008) Idiopathic thrombocytopenic purpura: current concepts in pathophysiology and management. *Thromb. Haemost.*, 99(1):4-13.
133. BOWLES KM, COOKE LJ, RICHARDS EM et BAGLIN TP (2005) Platelet size has diagnostic predictive value in patients with thrombocytopenia. *Clin. Lab. Haematol.*, 27(6):370-373.
134. KAITO K, OTSUBO H, USUI N, YOSHIDA M, TANNO J et KURIHARA E (2005) Platelet size deviation width, platelet large cell ratio, and mean platelet volume have sufficient sensitivity and specificity in the diagnosis of immune thrombocytopenia. *Br. J. Haematol.*, 128(5):698-702.
135. NTAIOS G, PAPADOPOULOS A, CHATZINIKOLAOU A, SAOULI Z, KARALAZOU P et KAIIFA G (2008) Increased values of mean platelet volume and platelet size deviation width may provide a safe positive diagnosis of idiopathic thrombocytopenic purpura. *Acta Haematol.*, 119(3):173-177.
136. NUMBENJAPON T, MAHAPO N, PORNVIPAVEE R, SRISWASDI C, MONGKONSRI TRAGOON W et LEELASIRI A (2008) A prospective evaluation of normal mean platelet volume in discriminating hyperdestructive thrombocytopenia from hypoproductive thrombocytopenia. *Int. J. Lab. Hematol.*, 30(5):408-414.
137. TYCKO DH, METZ MH, EPSTEIN EA et GRINBAUM A (1985) Flow-cytometric light scattering measurement of red blood cell volume and hemoglobin concentration. *Appl. Opt.*, 24(9):1355.

138. GIACOMINI A, LEGOVINI P, ANTICO F, GESSONI G, VALVERDE S et SALVADEGO MM (2001) Evaluation of platelet analysis on the ADVIA 120 hematology system. *Laboratory Hematology*, 7:180-185.
139. ZELMANOVIC D, COLELLA G, HETHERINGTON E, CHAPMAN E et PASELTINER L *Automated method and device for identifying and quantifying platelets and for determining platelet activation state using whole blood samples*. Brevet US5817519. 1998.
140. YARLIOGLUES M, ARDIC I, DOGDU O, AKPEK M, ZENCIR C et KASAPKARA HA (2012) The acute effects of passive smoking on mean platelet volume in healthy volunteers. *Angiology*, 63(5):353-357.
141. WHITE JG et ESCOLAR G (2000) EDTA-induced changes in platelet structure and function: adhesion and spreading. *Platelets*, 11(1):56-61.
142. WHITE JG, KRUMWIEDE MD et ESCOLAR G (1999) EDTA induced changes in platelet structure and function: influence on particle uptake. *Platelets*, 10(5):327-337.
143. DIAZ-RICART M, BRUNSO L, PINO M, NAVALON F, JOU JM et HERAS M (2010) Preanalytical treatment of EDTA-anticoagulated blood to ensure stabilization of the mean platelet volume and component measured with the ADVIA counters. *Thromb. Res.*, 126(1):30-35.
144. MACEY M, AZAM U, MCCARTHY D, WEBB L, CHAPMAN ES et OKRONGLY D (2002) Evaluation of the anticoagulants EDTA and citrate, theophylline, adenosine, and dipyridamole (CTAD) for assessing platelet activation on the ADVIA 120 hematology system. *Clin. Chem.*, 48(6):891-899.
145. MA Y et WONG K (2007) Reassociation and translocation of glycoprotein IIB-IIIa in EDTA-treated human platelets. *Platelets*, 18(6):451-459.
146. PATTERSON K (1997) Platelet parameters generated by automated blood counters, *CME Bulletin Haematology*, 1:13-16.
147. MACEY MG, CARTY E, WEBB L, CHAPMAN ES, ZELMANOVIC D et OKRONGLY D (1999) Use of mean platelet component to measure platelet activation on the ADVIA 120 haematology system. *Cytometry*, 38(5):250-255.
148. LIPPI G, MESCHI T et BORGHI L (2012), Mean platelet volume increases with aging in a large population study. *Thrombosis Research*, 129(4):159-160.
149. VAN COTT EM, FLETCHER SR et KRATZ A (2005) Effects of the blood-collection tube material and long-term storage on platelet activation parameters on the ADVIA 120/2120 hematology system. *Lab. Hematol.*, 11(1):71-75.
150. HOFFMANN JJ (2012) Reference range of mean platelet volume. *Thromb. Res.*, 129(4):534-535.



151. CHU SG, BECKER RC, BERGER PB, BHATT DL, EIKELBOOM JW et KONKLE B (2010) Mean platelet volume as a predictor of cardiovascular risk : a systematic review and meta-analysis. *J. Thromb. Haemost.*, 8(1):148-156.
152. GERDAY E, BAER VL, LAMBERT DK, PAUL DA, SOLA-VISNER MC et PYSHER TJ2 (2009) Testing platelet mass versus platelet count to guide platelet transfusions in the neonatal intensive care unit. *Transfusion*, 49(10):2034-2039.
153. MUSCARI A, DE PASCALIS S, CENNI A, LUDOVICO C et CASTALDINI N, ANTONELLI S (2008) Determinants of mean platelet volume (MPV) in an elderly population: relevance of body fat, blood glucose and ischaemic electrocardiographic changes. *Thromb. Haemost.*, 99(6):1079-1084.
154. BOOS CJ, BEEVERS GD et LIP GYH (2007) Assessment of platelet activation indices using the ADVIATM 120 amongst « high-risk » patients with hypertension. *Ann. Med.*, 39(1):72-78.
155. KAMATH S, BLANN AD et LIP GY (2001) Platelet activation: assessment and quantification. *Eur. Heart J.*, 22(17):1561-1571.
156. BRAEKKAN SK, MATHIESEN EB, NJØLSTAD I, WILSGAARD T et STØRMER J, HANSEN JB (2010) Mean platelet volume is a risk factor for venous thromboembolism: the Tromsø Study. *J. Thromb. Haemost.*, 8(1):157-162.
157. KAMISLI O, KAMISLI S, KABLAN Y, GONULLU S et OZCAN C (2012) The Prognostic Value of an Increased Mean Platelet Volume and Platelet Distribution Width in the Early Phase of Cerebral Venous Sinus Thrombosis. *Clinical Appl. Thromb. Hemost.*
158. KIM HK, KIM J-E, HAM CK, LEE DS, PARK S et CHO H-I (2008) Prognostic value of platelet indices as determined by ADVIA 120 in patients suspected of having disseminated intravascular coagulation. *International Journal of Laboratory Hematology*, 30(2):117-123.
159. BILICI S, SEKMENLI T, GÖKSU M, MELEK M et AVCI V (2011) Mean platelet volume in diagnosis of acute appendicitis in children. *Afr. Health Sci.*, 11(3):427-432.
160. BROWN AS, HONG Y, DE BELDER A, BEACON H, BEESO J et SHERWOOD R (1997) Megakaryocyte ploidy and platelet changes in human diabetes and atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 17(4):802-807.
161. DANESE S, MOTTE Cd CL et FIOCCHI C (2004) Platelets in inflammatory bowel disease: clinical, pathogenic, and therapeutic implications. *Am. J. Gastroenterol.*, 99(5):938-945.
162. KISACIK B, TUFAN A, KALYONCU U, KARADAG O, AKDOGAN A et OZTURK MA (2008) Mean platelet volume (MPV) as an inflammatory marker in ankylosing spondylitis and rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine*, 75(3):291-294.

163. LIU R, GAO F, HUO J et YI Q (2012) Study on the relationship between mean platelet volume and platelet distribution width with coronary artery lesion in children with Kawasaki disease. *Platelets*, 23(1):11-16.
164. VAGDATLI E, GOUNARI E, LAZARIDOU E, KATSIBOURLIA E, TSIKOPOULOU F et LABRIANOU I (2010) Platelet distribution width: a simple, practical and specific marker of activation of coagulation. *Hippokratia*, 14(1):28-32.
165. AMIN MA, AMIN AP et KULKARNI HR (2004) Platelet distribution width (PDW) is increased in vaso-occlusive crisis in sickle cell disease. *Ann. Hematol.*, 83(6):331-335.
166. OSSELAER JC, JAMART J et SCHEIFF JM (1997) Platelet distribution width for differential diagnosis of thrombocytosis. *Clin. Chem.*, 43(6):1072-1076.
167. SONG YH, PARK SH, KIM JE, AHN JY, SEO YH et PARK PH (2009) Evaluation of platelet indices for differential diagnosis of thrombocytosis by ADVIA 120. *Korean J Lab Med.*, 29(6):505-509.
168. BEARD MJ, JEEWA Z, BASHIR S, CARDIGAN R et THOMAS S (2011) Comparison of platelet activation in platelet concentrates measured by flow cytometry or ADVIA 212. *Vox Sang.*, 101(2):122-130.
169. GIACOMINI A, LEGOVINI P, ANTICO F, VALVERDE S, SALVADEGO MM et MANONI F (2003) Assessment of in vitro platelet activation by Advia 120 platelet parameters. *Lab. Hematol.*, 9(3):132-137.
170. PARK IJ, LIM YA et CHO SR (2010) Usefulness of delta value of platelet parameters on ADVIA 120 for the functional reactivity of stored platelets. *J. Clin. Lab. Anal.*, 24(1):38-43.
171. ARELLANO-RODRIGO E, ALVAREZ-LARRÁN A, REVERTER JC, VILLAMOR N, JOU JM et CERVANTES F (2011) Automated assessment of the neutrophil and platelet activation status in patients with essential thrombocythemia. *Platelets*, 23(5):336-343.
172. BAE SH, LEE J, ROH KH et KIM J (2003) Platelet activation in patients with diabetic retinopathy. *Korean J. Ophthalmol.*, 17(2):140-144.
173. AHNADI CE, BOUGHRASSA FF, CHAPMAN-MONTGOMERY ES, POISSON V, GERVAIS A et OKRONGLY D (2004) Comparison of two methods to assess variability of platelet response to anti-platelet therapies in patients with acute coronary syndrome undergoing angioplasty. *Thromb. Haemost.*, 92(6):1207-1213.
174. LIM YA et HYUN BH (2002) Evaluation of platelet parameters on the ADVIA 120 as the quality indicator for stored platelets. *Clin. Lab. Haematol.*, 24(6):377-384.
175. LATGER-CANNARD V et LECOMPTE T *sous presse* Thrombopénies constitutionnelles : de la bonne utilisation des paramètres plaquettaires de l'hémogramme et de la morphologie pour orienter le diagnostic. *Feuillets de biologie*.

176. PATEL PD, SAMANICH JM, MITCHELL WB et MANWANI D (2011) A unique presentation of Wiskott-Aldrich syndrome in relation to platelet size. *Pediatr Blood Cancer*, 56:1127-1129.
177. BRYANT N et WATTS R (2011) Thrombocytopenic syndromes masquerading as childhood immune thrombocytopenic purpura. *Clin. Pediatr.*, 50(3):225-230.
178. STANWORTH SJ, DENTON K, MONTEATH J et PATTON WN (1999) Automated counting of platelets on the Bayer ADVIA 120 analyser. *Clin. Lab. Haematol.*, 21(2):113-117.
179. PARKER-WILLIAMS J (2003) Immunoplatelet counting: platelet transfusions. *British Journal of Haematology*, 123(4):750-751.

# ANNEXES



## ANNEXE 1: Distribution des paramètres plaquettaires des patients suivis pour un PTI à NANCY

ADULTES										
-	-	NP (G/L)	PCT (%)	VPM (fL)	GP (G/L)	PDW (%)	MPC (g/dL)	PCDW (g/dL)	MPM (pg)	PMDW (pg)
Valeurs de réf.		159-409	0,14-0,38	7,8-10,6	0-16	40,1-64,7	20,0-27,8	4,5-6,5	1,72-2,30	0,62-0,98
Patient 1	PTI aigü	1	0	7,5	0	30,6	17,6	2,6	1,32	0,27
Patient 2	PTI aigü	39	0,05	13	5	67,3	29,3	5,3	2,88	0,95
Patient 3	PTI aigü	5	0	8,2	0	18,2	26,3	5,8	2,08	0,92
Patient 4	PTI aigü	17	0,02	12	2	82,6	25,7	5,9	2,12	1,05
Patient 5	PTI aigü	3	0	8,4	0	17,2	19,2	7,1	1,7	0,86
Patient 6	PTI aigü	4	0	6,3	0	42,4	24	8,4	1,5	0,68
Patient 7	PTI aigü	5	0	7,1	0	19,5	22,8	7,7	1,42	0,63
Patient 8	PTI aigü	19	0,02	12,3	3	64,1	23,2	4,2	2,5	1,11
Patient 9	PTI aigü	22	0,03	14,7	5	63,8	23,6	3,7	2,87	1,06
Patient 10	PTI aigü	106	0,09	8,6	2	43,2	24,6	5,2	2,04	0,76
Patient 11	PTI aigü	58	0,06	9,6	3	51,9	25,8	3,7	2,35	0,89
Patient 12	PTI aigü	46	0,05	10	3	61,9	24,4	4,4	2,23	0,94
Patient 13	PTI aigü	3	0	7,2	0	42,4	24,6	8,3	1,76	0,9
Patient 14	PTI aigü	28	0,03	9,3	1	63,8	23,1	4,9	2	0,9
Patient 15	PTI aigü	3	0	9,6	0	15,6	23,2	9,4	1,74	0,78
-	-	NP (G/L)	PCT (%)	VPM (fL)	GP (G/L)	PDW (%)	MPC (g/dL)	PCDW (g/dL)	MPM (pg)	PMDW (pg)
Patient 1	PTI chrn	3	0	6,9	0	24,1	22,9	8,2	1,53	0,84
Patient 2	PTI chrn	7	0,01	7,7	0	47,7	18,7	5,7	1,41	0,76
Patient 3	PTI chrn	4	0	7,3	0	19,3	23,1	8,4	1,6	0,72
Patient 4	PTI chrn	19	0,03	13,2	3	78,3	26,2	6,6	2,47	1,19
Patient 5	PTI chrn	13	0,01	9,2	0	18,5	24,7	5,5	2,25	1,18
Patient 6	PTI chrn	19	0,02	8,6	1	58,9	27,4	5,5	2,22	1,05
Patient 7	PTI chrn	103	0,09	8,8	3	61,1	29	5	2,29	0,81
Patient 8	PTI chrn	28	0,03	8,9	1	53,5	23,7	5,4	1,94	0,81
Patient 9	PTI chrn	60	0,07	11,8	6	62,1	27,9	4,8	2,64	0,93
Patient 10	PTI chrn	78	0,07	8,5	3	60,6	27,1	5,6	2,06	0,82
Patient 11	PTI chrn	107	0,09	8,8	4	63,6	28,6	5,4	2,2	0,86
Patient 12	PTI chrn	9	0,01	8,3	0	24,6	23,3	8,5	1,9	1,16
Patient 13	PTI chrn	23	0,02	9,3	1	60,5	27	6,1	2,29	1,07
Patient 14	PTI chrn	32	0,04	11,2	3	75,4	26,1	4,6	2,31	0,92
Patient 15	PTI chrn	51	0,06	12,5	6	70,1	25,5	5,6	2,41	0,91
Patient 16	PTI chrn	65	0,07	10,1	3	50,5	22,6	4,9	2,17	0,92
Patient 17	PTI chrn	4	0,01	14,2	1	78,2	24,3	7,1	2,01	0,71
Patient 18	PTI chrn	4	0,01	14,1	1	75,5	25,3	6	2,42	1,06
Patient 19	PTI chrn	14	0,02	12	2	77,3	24,8	6,7	2,2	1,11
Patient 20	PTI chrn	19	0,02	8,2	0	57,3	26,3	8	1,92	0,87
Patient 21	PTI chrn	43	0,04	8,9	1	56,1	24,5	6,2	2,02	0,89
Patient 22	PTI chrn	9	0,01	12,3	1	18	20,4	5,3	2,11	1,19
Patient 23	PTI chrn	5	0	8,5	0	19	20	5,8	1,51	0,87
Patient 24	PTI chrn	13	0,02	13,8	2	84	25,2	4,7	2,33	0,88

Valeur patient < Valeur de réf.
  Valeur patient > Valeur de réf.
 Patient : problème analytique, cas exclus secondairement de la base de données

**ANNEXE 1 suite**: Distribution des paramètres plaquettaires des patients suivis pour un PTI à NANCY

ENFANTS										
-	-	NP (G/L)	PCT (%)	VPM (fL)	GP (G/L)	PDW (%)	MPC (g/dL)	PCDW (g/dL)	MPM (pg)	PMDW (pg)
Valeurs de réf.		159-409	0,14-0,38	7,8-10,6	0-16	40,1-64,7	20,0-27,8	4,5-6,5	1,72-2,30	0,62-0,98
Patient 1	PTI aigü	11	0,01	11,6	1	57,4	26,1	5,0	2,71	1,04
Patient 2	PTI aigü	31	0,04	13,3	5	71,1	25,0	4,9	2,75	1,19
Patient 3	PTI aigü	3	0,00	7,5	0	41,4	18,4	5,3	1,32	0,45
<i>Patient 4</i>	<i>PTI aigü</i>	<i>6</i>	<i>0,00</i>	<i>8,2</i>	<i>0</i>	<i>17,1</i>	<i>22,3</i>	<i>6,4</i>	<i>1,87</i>	<i>0,86</i>
<i>Patient 5</i>	<i>PTI aigü</i>	<i>9</i>	<i>0,01</i>	<i>7,9</i>	<i>0</i>	<i>18,6</i>	<i>22,7</i>	<i>6,8</i>	<i>1,83</i>	<i>0,98</i>
Patient 6	PTI aigü	2	0,00	8,1	0	45,0	20,7	7,3	1,68	0,88
Patient 7	PTI aigü	55	0,05	9,7	3	65,5	30,3	4,8	2,44	0,86
<i>Patient 8</i>	<i>PTI aigü</i>	<i>6</i>	<i>0,00</i>	<i>7,3</i>	<i>0</i>	<i>20,3</i>	<i>22,0</i>	<i>7,0</i>	<i>1,76</i>	<i>0,75</i>
<i>Patient 9</i>	<i>PTI aigü</i>	<i>4</i>	<i>0,00</i>	<i>13,2</i>	<i>0</i>	<i>13,3</i>	<i>21,0</i>	<i>6,5</i>	<i>2,25</i>	<i>1,21</i>
Patient 10	PTI aigü	2	0,00	6,7	0	39,8	24,5	5,8	1,80	1,06
-	-	NP (G/L)	PCT (%)	VPM (fL)	GP (G/L)	PDW (%)	MPC (g/dL)	PCDW (g/dL)	MPM (pg)	PMDW (pg)
Patient 1	PTI chrn	58	0,05	8,5	2	55,1	28,9	5,5	2,18	0,82
<i>Patient 2</i>	<i>PTI chrn</i>	<i>9</i>	<i>0,01</i>	<i>8,5</i>	<i>0</i>	<i>18,7</i>	<i>23,8</i>	<i>7,4</i>	<i>1,83</i>	<i>0,88</i>
Patient 3	PTI chrn	40	0,04	9,2	2	71,7	24,7	6,5	1,94	0,78
<i>Patient 4</i>	<i>PTI chrn</i>	<i>11</i>	<i>0,01</i>	<i>7,7</i>	<i>0</i>	<i>21,3</i>	<i>28,4</i>	<i>6,1</i>	<i>2,15</i>	<i>0,95</i>
Patient 5	PTI chrn	6	0,00	7,1	0	48,9	25,3	7,0	1,80	0,99
Patient 6	PTI chrn	64	0,06	9,8	4	59,3	27,1	4,4	2,28	0,81
<i>Patient 7</i>	<i>PTI chrn</i>	<i>12</i>	<i>0,01</i>	<i>8,4</i>	<i>0</i>	<i>19,7</i>	<i>27,4</i>	<i>6,8</i>	<i>2,21</i>	<i>0,96</i>
Patient 8	PTI chrn	18	0,03	14,4	4	68,0	26,5	4,4	3,16	1,31
Patient 9	PTI chrn	9	0,01	7,6	0	50,5	24,0	7,4	1,79	1,08
<i>Patient 10</i>	<i>PTI chrn</i>	<i>10</i>	<i>0,01</i>	<i>7,5</i>	<i>0</i>	<i>22,5</i>	<i>24,2</i>	<i>5,7</i>	<i>1,89</i>	<i>1,01</i>

Valeur patient < Valeur de réf.
  Valeur patient > Valeur de réf.

*Patient* : problème analytique, cas exclus secondairement de la base de données

**ANNEXE 2** : Distribution des paramètres plaquettaires des patients suivis pour un PTI à MARSEILLE

ENFANTS										
-	-	NP (G/L)	PCT (%)	VPM (fL)	GP (G/L)	PDW (%)	MPC (g/dL)	PCDW (g/dL)	MPM (pg)	PMDW (pg)
<i>Valeurs de réf.</i>		181-392	0,15-0,33	7,2-9,5	0-14	42,4-62,2	24,1-27,9	5,3-6,7	1,74-2,36	0,71-1,00
<i>Patient 1</i>	<i>PTI aigü</i>	8	0,01	8,5	0	18,5	20,9	6,7	1,73	0,85
Patient 2	PTI aigü	19	0,02	13,1	3	76,8	24,2	5,8	2,64	1,41
Patient 3	PTI aigü	4	0,00	8,3	0	52,0	19,9	7,1	1,62	0,91
Patient 4	PTI aigü	46	0,05	11,1	4	80,3	29,5	5,0	2,51	0,92
<i>Patient 5</i>	<i>PTI aigü</i>	9	0,01	7,5	0	21,6	25,2	8,1	1,77	0,97
Patient 6	PTI aigü	4	0,00	7,3	0	41,5	19,1	5,4	1,37	0,68
Patient 7	PTI aigü	5	0,00	7,1	0	56,2	15,4	4,0	1,09	0,73
Patient 8	PTI aigü	12	0,01	9,5	1	70,8	24,8	7,4	1,84	1,06
Patient 9	PTI aigü	15	0,02	16,2	3	77,6	24,6	4,5	3,10	1,43
Patient 10	PTI aigü	5	0,00	9,0	0	61,1	20,2	6,5	1,71	0,99
Patient 11	PTI aigü	3	0,00	7,1	0	37,1	18,0	5,8	1,21	0,40
Patient 12	PTI aigü	34	0,02	6,9	0	38,2	23,1	6,4	1,52	0,60
Patient 13	PTI aigü	2	0,00	11,5	0	47,3	22,0	7,4	2,34	0,95
Patient 14	PTI aigü	4	0,00	9,6	0	45,4	22,7	7,8	2,11	1,16
Patient 15	PTI aigü	1	0,00	6,3	0	64,5	25,1	9,9	1,46	0,77
Patient 16	PTI aigü	29	0,02	8,4	2	80,8	22,8	6,5	1,75	1,05
Patient 17	PTI aigü	40	0,04	9,1	0	37,8	26,4	4,0	2,39	0,94
<i>Patient 18</i>	<i>PTI aigü</i>	18	0,01	7,9	1	19,1	26,5	7,4	2,20	1,01
Patient 19	PTI aigü	5	0,00	8,3	0	49,7	20,3	6,1	1,66	0,93
<i>Patient 20</i>	<i>PTI aigü</i>	6	0,01	12,5	0	13,9	15,4	2,8	1,72	0,80
Patient 21	PTI aigü	4	0,00	11,2	0	43,6	20,9	6,4	2,38	1,17
Patient 22	PTI aigü	26	0,03	10,8	2	69,9	23,7	6,9	2,32	1,22
Patient 23	PTI aigü	5	0,00	6,4	0	43,3	23,0	8,2	1,37	0,63
-	-	NP (G/L)	PCT (%)	VPM (fL)	GP (G/L)	PDW (%)	MPC (g/dL)	PCDW (g/dL)	MPM (pg)	PMDW (pg)
Patient 1	PTI chrn	21	0,02	9,8	2	73,5	23,2	7,2	1,72	0,93
<i>Patient 2</i>	<i>PTI chrn</i>	16	0,01	7,0	0	21,5	25,8	6,2	1,90	0,94
<i>Patient 3</i>	<i>PTI chrn</i>	29	0,02	7,9	0	19,1	29,4	5,6	2,41	0,88
Patient 4	PTI chrn	15	0,02	11,2	2	79,4	25,5	6,1	2,45	1,37
Patient 5	PTI chrn	112	0,13	11,9	12	70,7	29,0	4,2	2,66	0,95
Patient 6	PTI chrn	49	0,06	11,8	5	62,5	27,9	4,5	2,93	1,26
Patient 7	PTI chrn	29	0,03	10,5	3	74,8	27,7	5,2	2,53	1,10
Patient 8	PTI chrn	29	0,03	10,1	3	82,9	27,9	6,0	2,17	0,93
Patient 9	PTI chrn	21	0,02	10,5	2	67,6	26,9	4,1	2,54	1,24
Patient 10	PTI chrn	9	0,01	7,8	0	52,1	24,7	6,0	1,96	1,24



Valeur patient < Valeur de réf.



Valeur patient > Valeur de réf.

*Patient* : problème analytique, cas exclus secondairement de la base de données

**ANNEXE 3** : Thrombopénies associées à des plaquettes de petite taille ou de taille normale (tableau récapitulatif)

	Thrombopénies à plaquettes de petite taille	Thrombopénies à plaquettes de taille normale		Diagnostic différentiel des thrombopénies à plaquettes de taille normale : PTI	
		Wiskott-Aldrich (n=2)	FDP/AML (n=6)	ANKRD26 (n=6)	PTI Nancy (n=55)
NP (G/L)	↘↘	↘ [54-120]	↘ [47-85] <i>sauf 1 cas à 15 G/L</i>	↘↘ [2-62]	↘↘ [2-36]
VPM (fL)	→↘ [7,3-7,6]	N <sup>al</sup> ou ↗	N <sup>al</sup>	N <sup>al</sup> ↘ ↗	N <sup>al</sup> ↘ ↗
PCT (%)	↘↘	↘↘	↘↘	↘↘	↘↘
GP	N <sup>al</sup>	N <sup>al</sup>	N <sup>al</sup>	N <sup>al</sup>	N <sup>al</sup>
PDW (%)		N <sup>al</sup> ou ↗	N <sup>al</sup> ou ↗	N <sup>al</sup>	↘
MPC (g/dL)	↘	N <sup>al</sup> ou ↘	N <sup>al</sup> ou ↗	N <sup>al</sup>	↘
PCDW (g/dL)			N <sup>al</sup> ou ↘	N <sup>al</sup>	N <sup>al</sup>
MPM (pg)	↘	↘	N <sup>al</sup>	N <sup>al</sup>	N <sup>al</sup>
PMDW (pg)	↘		N <sup>al</sup>	N <sup>al</sup>	N <sup>al</sup>



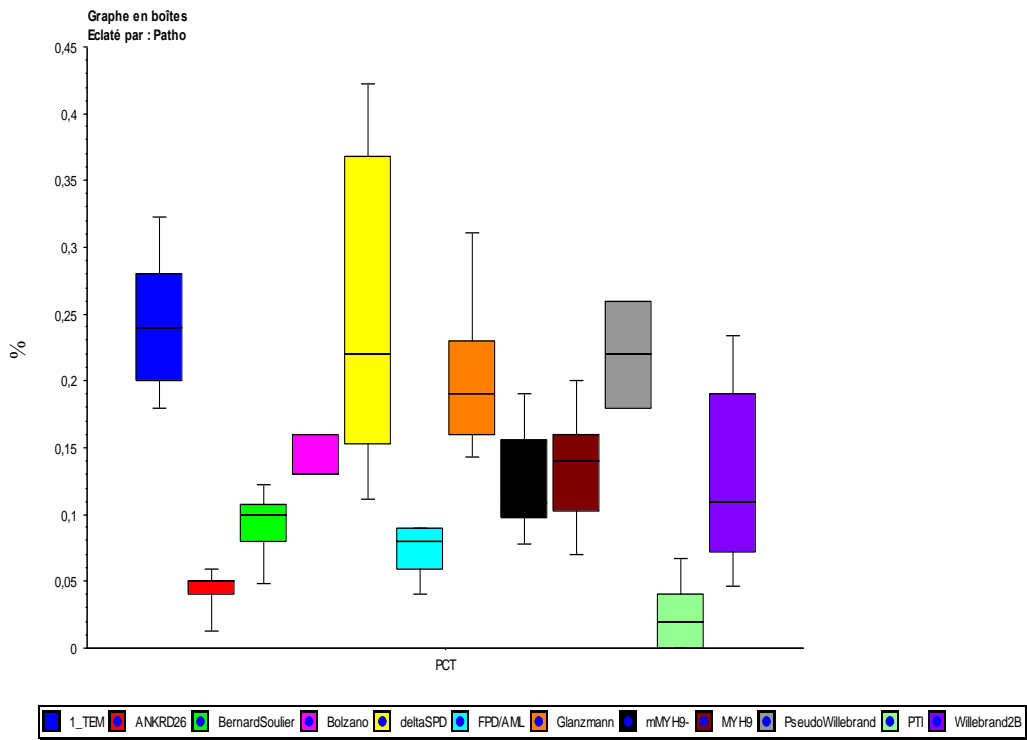
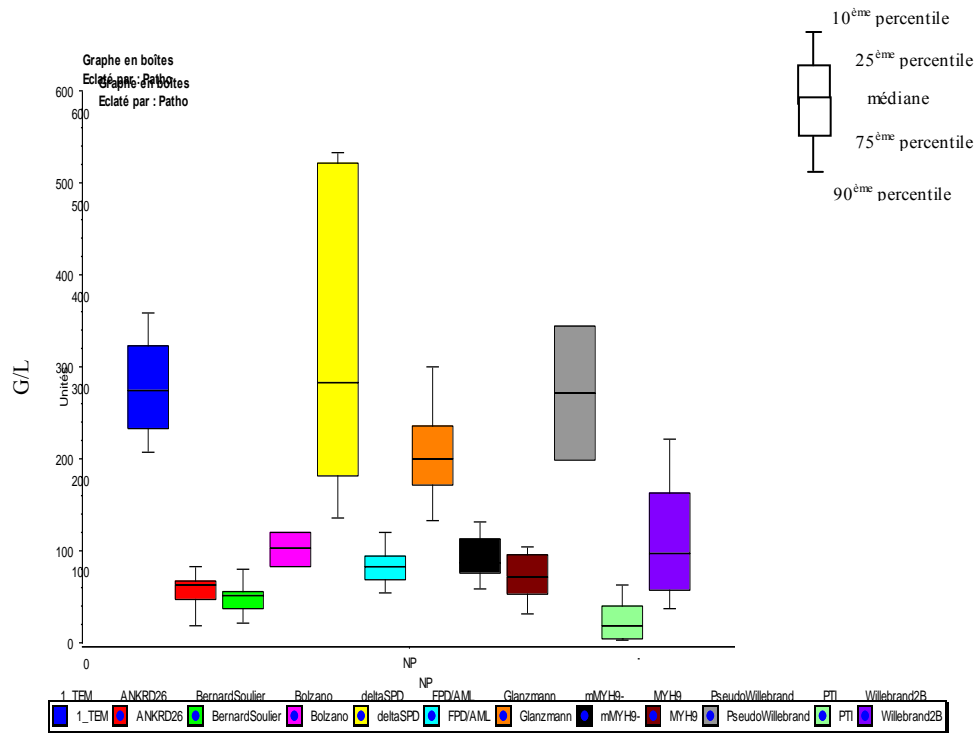
**ANNEXE 4 : Thrombopénies associées à des macroplaquettes (tableau récapitulatif)**

	<b>MYH9- (n=8)</b>	<b>Willebrand 2B (n=7)</b>	<b>Pseudo- Willebrand (n=2)</b>	<b>Bolzano (n=3)</b>
<b>NP (G/L)</b>	↘ [80-130]	hétéro gène [33-230]	N <sup>al</sup>	↘ [76-125]
<b>VPM (fL)</b>	↗ <16,5 [11,2-16,4]	↗ [10,3-13,2]	N <sup>al</sup>	↗ [12,9-16,5]
<b>PCT (%)</b>	N <sup>al</sup> ou ↘	N <sup>al</sup> ou ↘	N <sup>al</sup>	N <sup>al</sup> Ou ↘
<b>GP</b>	N <sup>al</sup> ou ↗	N <sup>al</sup> ou ↗	N <sup>al</sup>	↗
<b>PDW (%)</b>	N <sup>al</sup> ou ↗	N <sup>al</sup>	N <sup>al</sup>	N <sup>al</sup> ou ↗
<b>MPC (g/dL)</b>	N <sup>al</sup> ou ↗	N <sup>al</sup>	N <sup>al</sup>	↗
<b>PCDW (g/dL)</b>	N <sup>al</sup> ou ↘	N <sup>al</sup>	N <sup>al</sup>	↘
<b>MPM (pg)</b>	↗	↗	N <sup>al</sup>	↗
<b>PMDW (pg)</b>	↗ ou N <sup>al</sup>	↗	N <sup>al</sup>	↗ ou N <sup>al</sup> haut

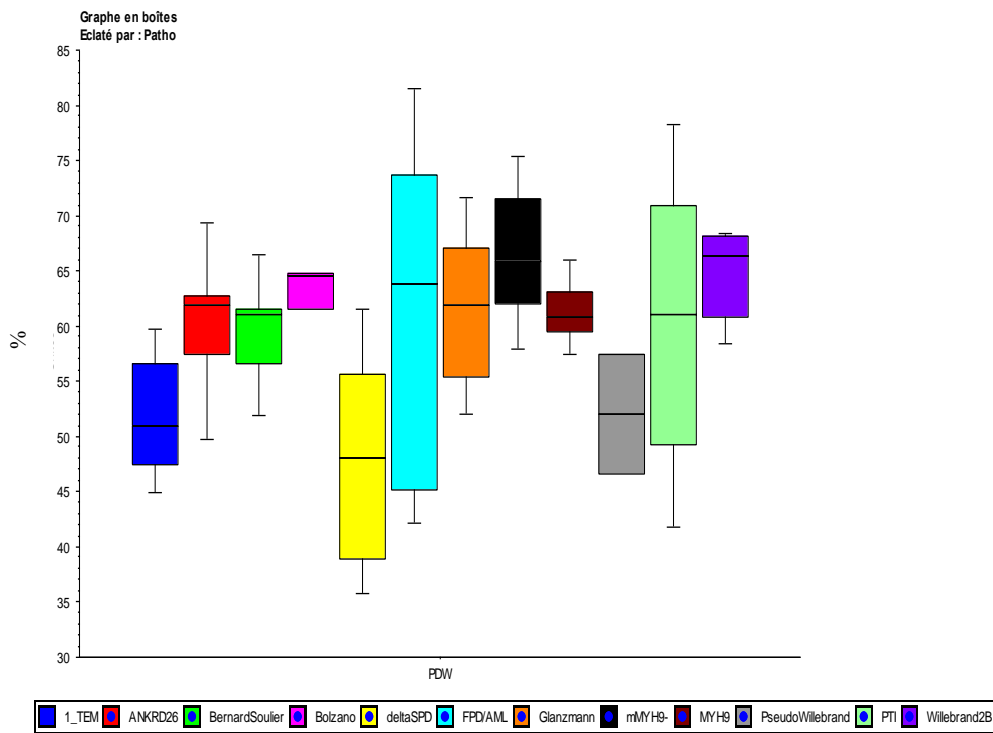
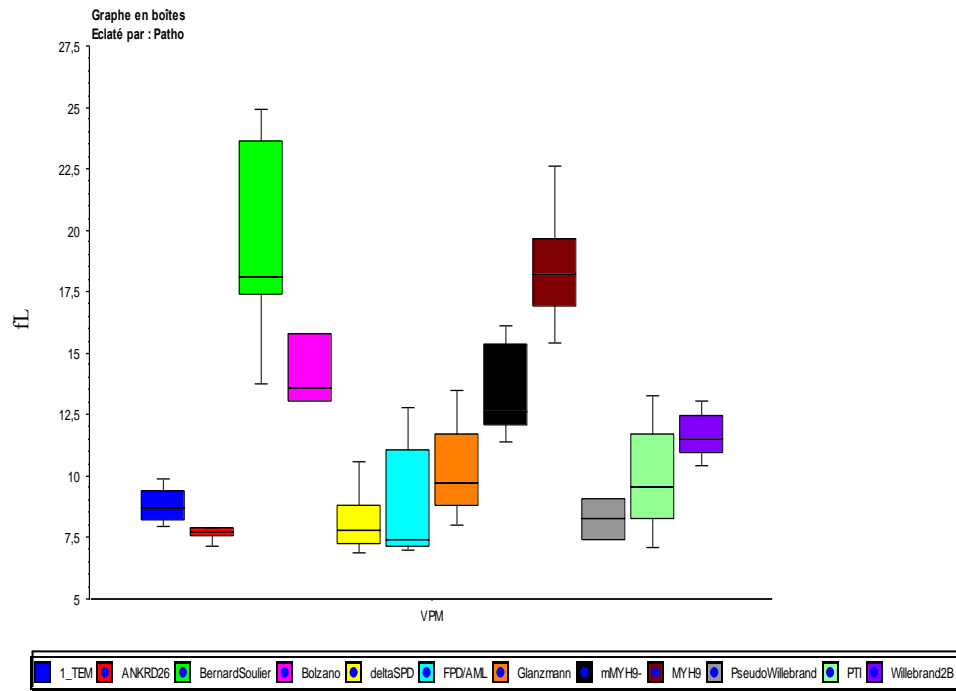
**ANNEXE 5 : Thrombopénies associées à des plaquettes géantes (tableau récapitulatif)**

	<b>Syndrome MYH9 n =15</b>	<b>BSS n =7</b>	<b>Bolzano (BSS hétérozygote, pour comparaison avec SBS) n =3</b>
<b>NP (G/L)</b>	↘ [31-120]	↘ [17-86]	↘ [76-125]
<b>VPM (fL)</b>	↗ ↗ > 15,0 [15,3-28,1]	↗ ↗ > 15,0 [17,3-25,1] <i>(sauf 1 cas, 12,9 fL)</i>	↗ [12,9-16,5]
<b>PCT (%)</b>	Non ↗ Malgré plt géantes	Non ↗ Malgré plt géantes	N <sup>al</sup> Ou ↘
<b>GP (G/L)</b>	↗	↗	↗
<b>PDW (%)</b>	Le plus svt N <sup>al</sup> (ou ↗)	Le plus svt N <sup>al</sup> (ou ↗)	↗
<b>MPC (g/dL)</b>	N <sup>al</sup> ou ↗	N <sup>al</sup> ou ↗	↗
<b>PCDW (g/dL)</b>	↘	↘	↘
<b>MPM (pg)</b>	↗	↗	↗
<b>PMDW (pg)</b>	↗	↗	↗ ou N <sup>al</sup> haut

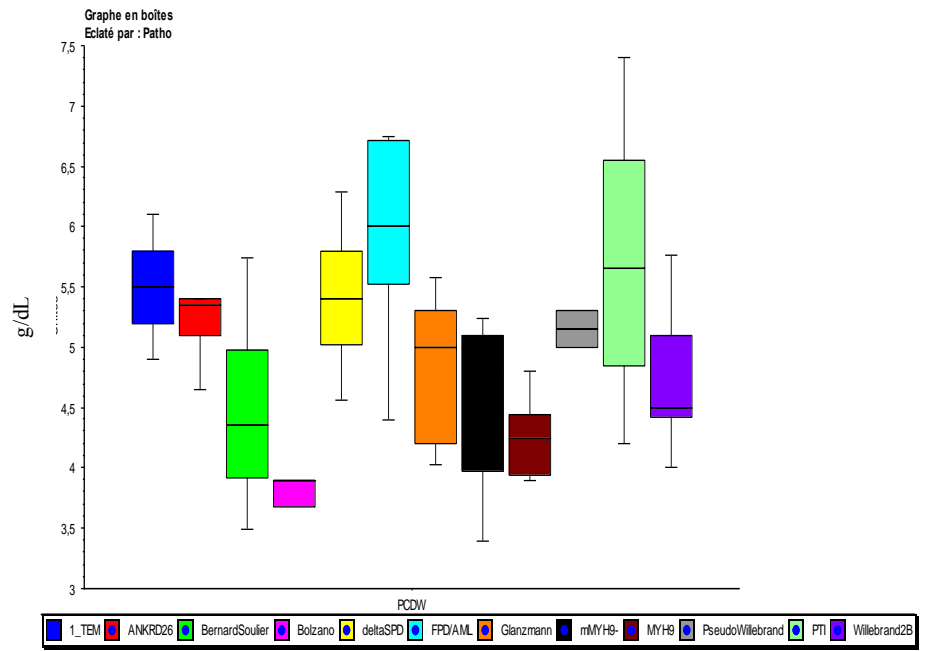
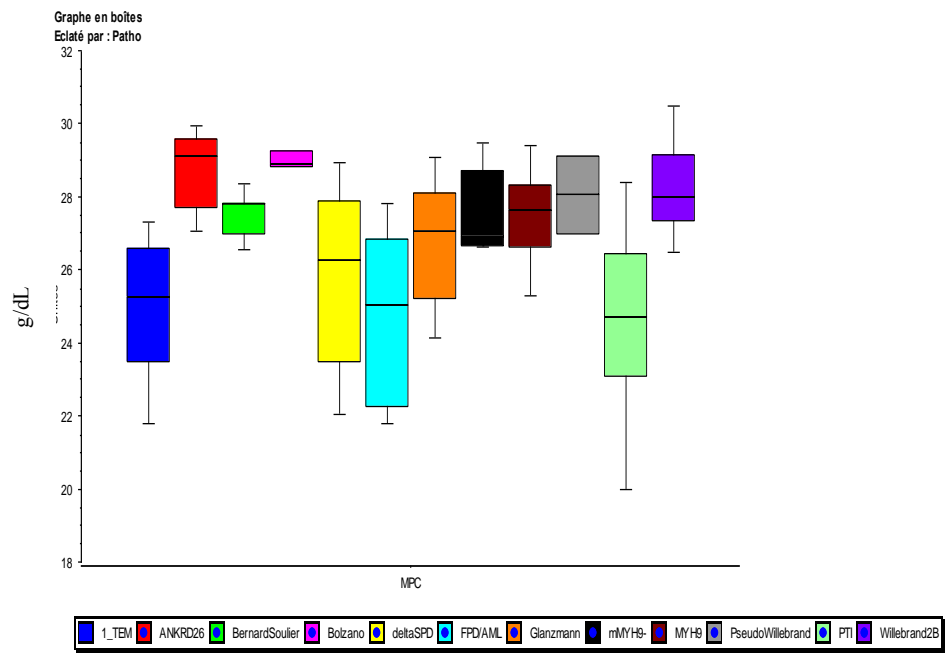
## ANNEXE 6 : Représentation graphique des paramètres plaquettaires



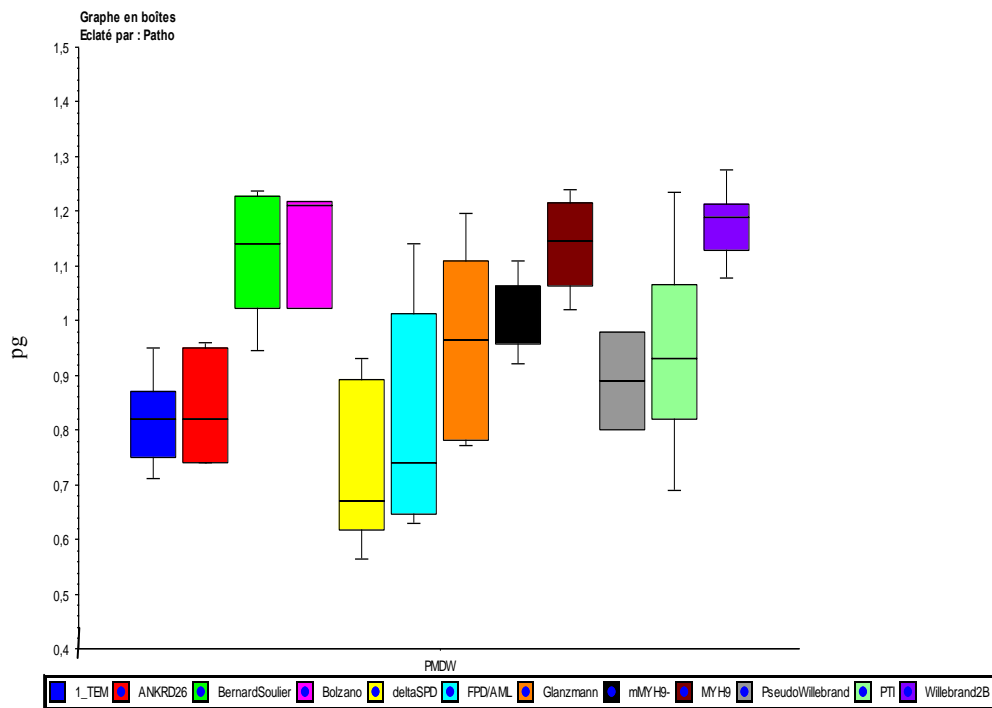
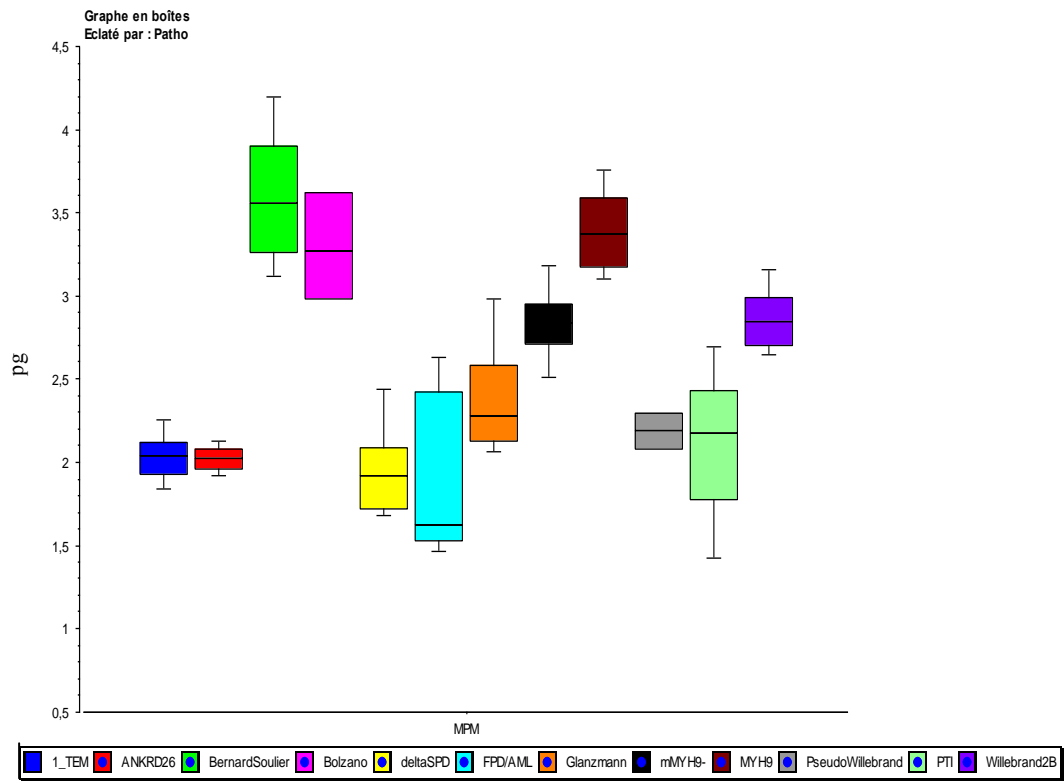
## ANNEXE 6 (suite)



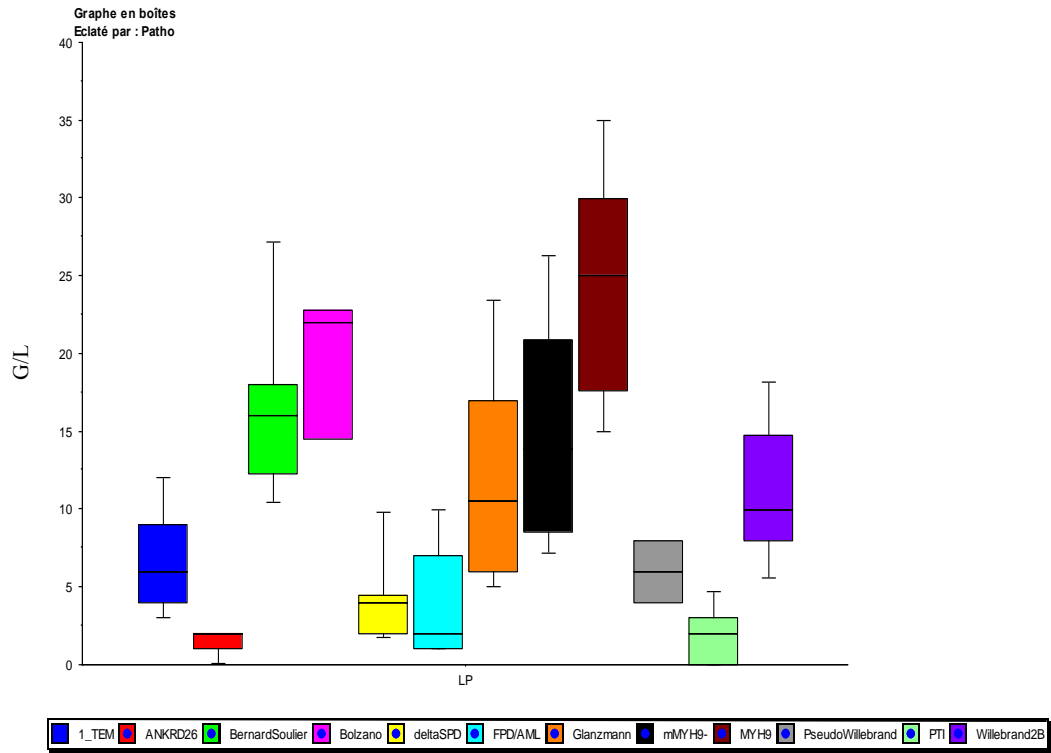
## ANNEXE 6 (suite)



## ANNEXE 6 (suite)



**ANNEXE 6 (suite)**



## DEMANDE D'IMPRIMATUR

Date de soutenance : 16/11/2012

**DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR  
EN PHARMACIE**

présenté par : Amélie POINSARD

Sujet : Utilisation des paramètres plaquettaires de l'ADVIA®2120 (Siemens) pour caractériser les thrombopénies constitutionnelles

Jury :

Président : Pr Béatrice FAIVRE  
 Directeur : Dr Véronique LATGER-CANNARD  
 Juges : Pr Pierre FEUGIER, Pr Thomas LECOMPTE,  
 Dr Véronique BACCINI

Vu,

Nancy, le 11 octobre 2012

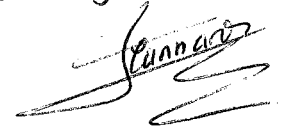
Le Président du Jury

B. FAIVRE .



Directeur de Thèse


Dr Latger-Cannard V



Vu et approuvé,

Nancy, le 16.10.2012

Doyen de la Faculté de Pharmacie  
de l'Université de Lorraine,



Francine PAULUS

Vu,

Nancy, le

15 NOV. 2012

Le Président de l'Université de Lorraine,



Pierre MUTZENHARDT

N° d'enregistrement : 5033



