



HAL
open science

Diagnostic des pathologies plaquettaires : optimisation de l'exploration des granules denses plaquettaires

Huili Cai

► **To cite this version:**

Huili Cai. Diagnostic des pathologies plaquettaires : optimisation de l'exploration des granules denses plaquettaires. Médecine humaine et pathologie. Université de Lorraine, 2015. Français. NNT : 2015LORR0067 . tel-01751698

HAL Id: tel-01751698

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01751698>

Submitted on 29 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-theses-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.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



Ecole Doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement)

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE

Mention : « Sciences de la Vie et de la Santé »

par Huili CAI

Diagnostic des pathologies plaquettaires :

Optimisation de l'exploration des granules denses plaquettaires

Le 6 Juillet 2015

Membres du jury :

Rapporteurs :

Monsieur Philippe NGUYEN (Président)

Professeur, Directeur unité EA3801, Université de Reims et Laboratoire d'Hématologie, CHU Reims, Reims

Monsieur Thomas LECOMPTE

Professeur Ordinaire, Département de médecine interne des spécialités, Service d'Hématologie, Hôpitaux Universitaires de Genève ; Faculté de médecine de l'Université de Genève, Genève

Examineurs :

Madame Véronique LATGER-CANNARD

HDR, Service d'Hématologie Biologique, Hôpital Brabois, CHRU Nancy, directrice de thèse

Monsieur Gilbert FAURE

Professeur, Laboratoire d'Immunologie, Hôpital Brabois, CHRU Nancy, co-directeur de thèse

Membre invité :

Monsieur Pierre FEUGIER

Professeur, Service d'Hématologie et médecine interne, Hôpital Brabois, CHRU Nancy, Nancy

CRAN : Centre de Recherche en Automatique de Nancy

Campus Science, Bld des Aiguillettes-BP 70239, 54506 VANDOEUVRE LES NANCY CEDEX

REMERCIEMENTS

Un grand merci à Monsieur le Professeur Philippe NGUYEN et à Monsieur le Professeur Thomas LECOMPTE de me faire l'honneur de juger ce travail et d'en être les rapporteurs. Merci pour votre disponibilité.

Monsieur le Professeur Thomas LECOMPTE, encore une fois, et Monsieur le Professeur François MULLIER, recevez tous mes remerciements pour le temps passé à corriger mes multiples versions de la publication.

Un grand merci à Monsieur le Professeur Patrick MENU, Directeur de l'Ecole doctorale de l'Université de Lorraine, et à Monsieur le Professeur Jean-François STOLTZ, Professeur honoraire, Faculté de médecine, Université de Lorraine. Je vous exprime toute ma gratitude pour votre soutien et votre aide au cours de la thèse. Soyez assurés de mon profond respect.

Je remercie Monsieur le Professeur Gilbert FAURE de m'avoir accueillie au sein du Laboratoire d'Immunologie pendant mon internat de DFMS en biologie médicale. J'ai beaucoup appris à vos côtés sur le système immunitaire et les maladies autoimmunes, ce qui constituera un grand trésor dans ma carrière professionnelle. En même temps, vous m'avez offert une opportunité précieuse pour m'inscrire en thèse et m'avez facilité tous les processus administratifs. Grâce à vous, j'ai pu apprendre les techniques innovantes sur la plateforme Nancytomique. Je vous suis très reconnaissante également de vos aides à chercher le financement (le Projet *CAI Yuanpei* et la bourse de *China Scholarship Council*) et votre soutien pour l'organisation de la réunion scientifique bihebdomadaire pour nous avoir prêté le projecteur. Veuillez trouver ici le témoignage de mon profond respect.

Je remercie tout particulièrement ma directrice de thèse Madame le Docteur Véronique LATGER-CANNARD. Je vous exprime toute ma gratitude pour avoir dirigé mon travail, m'avoir fait partager vos connaissances et votre expérience, m'avoir prodigué vos conseils tout au long de ce travail, de votre rigueur scientifique et votre patience. Plus particulièrement, je vous suis très reconnaissante de vos encouragements qui m'ont donné toujours plein d'énergie et d'espoir. Merci de m'avoir accueillie au sein du Service d'Hématologie Biologique et de m'avoir formée sur la cytologie

hématologique. Merci de la confiance que vous m'avez accordée. Les communications avec vous sont très agréables comme entre amies. J'ai appris énormément avec vous, dont les qualités scientifiques et personnelles, ce qui m'ont été d'une grande aide, autant pour cette thèse que pour la suite. J'espère qu'on pourra poursuivre cette collaboration dès mon retour en Chine...

Un grand merci à Monsieur le Professeur Marcelo DE CARVALHO BITTENCOURT de m'avoir fait partager vos connaissances et votre expérience sur la cytométrie en flux (NAVIOS[®], KALUZA[®]). Merci également de votre confiance et de m'avoir impliquée dans d'autres projets de recherches.

Un grand merci à mon ami Frédéric Massin, Ingénieur de la plateforme de cytométrie en flux du CHRU de Nancy, pour ton amitié, ton aide, ton soutien et ta grande disponibilité durant ces années à Nancy. Merci pour m'avoir fait partager ton expérience sur de nombreuses techniques et logiciels comme CellSearch, AMNIS, FACSDiva, Infinicyt... Je tiens également à t'exprimer toute ma reconnaissance pour ton intérêt, ton implication ainsi que tes précieux conseils dans mon travail. Je te rendrai le livre « La Grammaire » bientôt...

Un grand merci à Madame Chantal KOLHER, de m'avoir fait partager vos expériences sur la microscopie à fluorescence. Je vous suis très reconnaissante de m'avoir prêté les vêtements de bébé pour ma fille SIMIN lors de sa naissance à Nancy, dont la combinaison de léopard a fait un grand succès de « mode » ... Soyez assurée de mon grand respect.

Merci à Monsieur Jean Devignes, Chef de service, et d'autres biologistes du Service d'Hématologie Biologique (Monsieur Sylvain SALIGNAC, Monsieur Jean-François LESESVE, Julien PERRIN, Julien BROSEUS) pour votre accueil et de m'avoir fait partager vos expériences sur la cytologie hématologique. Je vous en suis très reconnaissante.

Merci aux techniciens et secrétaires du Laboratoire d'Immunologie et du Service d'Hématologie Biologique du CHU Nancy pour leur accueil chaleureux, leur gentillesse, leur disponibilité et leur écoute.

Je tiens à remercier le personnel de l'Etablissement Français du Sang à Nancy pour leur gentillesse et les prélèvements. Je tiens à remercier aussi tous les volontaires qui m'ont donné de leur sang. Sans

vous il n'y aurait pas eu d'expériences.

Merci à tous les amis chinois pour votre soutien et vos aides, particulièrement pendant le premier mois après la naissance de ma fille à Nancy. Je ne peux pas imaginer comment le temps se passerait sans vos précieux coups de mains...Merci d'avoir participé à la réunion bihebdomadaire et de votre partage de connaissances scientifiques.

Merci à l'ensemble de ma famille et ma belle-famille pour votre soutien, votre encouragement et tous les bons moments partagés. Un super grand merci à mon mari Haidan. Je ne serais pas là sans toi. Je te dois trop trop...Merci pour ton amour, ton soutien, ton écoute, ton encouragement, ta confiance, de m'avoir laissé libre de mes choix et pour les efforts que tu as consacrés à toutes les deux familles. Je te rejoindrai bientôt en Chine et je ne veux plus rester si loin de toi... Je dédie cette thèse à toi et à notre fille SIMIN.

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS	i
TABLE DES MATIERES	iv
INDEX DES FIGURES	viii
INDEX DES TABLEAUX.....	ix
ABREVIATIONS.....	x
Résumé.....	xi
Abstract	xiii
PARTIE I : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	1
1. Origine des plaquettes	2
1.1 Mégacaryopoïèse.....	3
1.2 Naissance des plaquettes	4
1.3 Cinétique plaquettaire normale	5
1.4 Séquestration splénique physiologique	5
1.5 Rôle des érythrocytes dans la circulation des plaquettes.....	6
1.6 Mort physiologique des plaquettes.....	6
1.7 Régulation de la mégacaryopoïèse	6
2. Structure et anatomie fonctionnelle des plaquettes	9
2.1 La membrane.....	10
2.1.1 Récepteurs membranaires des plaquettes	10
2.1.2 Les glycoprotéines membranaires	12
2.2 Système canaliculaire	17
2.2.1 Le système canaliculaire ouvert (SCO).....	17
2.2.2 Le système tubulaire dense.....	18
2.3 Le cytosquelette.....	18
2.4 Les organites plaquettaires	19
2.4.1 Granules α	19
2.4.2 Granules denses.....	20
2.4.3 Lysosomes (granules λ).....	21
2.5 D'autres composants de la plaquette	22
3. Fonctions des plaquettes.....	23
3.1 Rôle majeur dans l'hémostase primaire	23
3.1.1 L'adhérence des plaquettes.....	24
3.1.2 L'activation des plaquettes	26
3.1.3 La sécrétion plaquettaire	30
3.1.4 L'agrégation plaquettaire	31
3.1.5 Régulations négatives de l'activation des plaquettes.....	33
3.2 Les plaquettes et la coagulation.....	35
3.3 Les plaquettes et la fibrinolyse.....	36
3.4 Les plaquettes et la thrombose	36
3.5 Diverses fonctions des plaquettes.....	37
4. Exploration biologique des plaquettes	38
4.1 Introduction.....	38

4.2 Démarche initiale	38
4.3 La numération plaquettaire, volume plaquettaire moyen (VPM), plaquettes réticulées.....	39
4.3.1 Principe de la numération plaquettaire	39
4.3.2 Facteurs interférents avec la numération plaquettaire	39
4.3.3 Rôle de la numération plaquettaire.....	40
4.3.4 VPM	40
4.3.5 Les plaquettes réticulées.....	41
4.4 Frottis sanguin	41
4.5 Epreuves globales.....	42
4.5.1 Temps de saignement	42
4.5.2 Temps d'occlusion plaquettaire (TOP).....	43
4.6 Tests d'adhérence des plaquettes	44
4.7 L'étude de l'agrégation plaquettaire	45
4.7.1 Principe.....	46
4.7.2 Agonistes	46
4.8 Tests pour la détection des granules denses.....	49
4.8.1 Dosage d'ATP sécrétée par les plaquettes par luminescence (Test à la luciférase-luciférase)	49
4.8.2 Test à la mépacrine	51
4.8.3 Expression de CD63 par cytométrie en flux après activation des plaquettes	52
4.8.4 Microscopie électronique en transmission (TEM)	52
4.8.5 Tests liés à la sérotonine	53
4.8.6 Détermination des nucléotides adénosines	53
4.9 Tests pour les granules α	54
4.10 Détermination des glycoprotéines membranaires des plaquettes	54
4.11 VASP (<i>Vasodilator Stimulated Phosphoprotein</i>) test ^[195-197]	55
4.12 Tests de l'activité procoagulante plaquettaire (<i>procoagulant activity</i> , PCA)	55
4.12.1 Le test de consommation de la prothrombine (TCP).....	56
4.12.2 Test d'affinité à l'annexine V par cytométrie en flux	56
4.13 La cytométrie en flux dans l'exploration des plaquettes	56
4.14 Autres techniques d'exploration plaquettaire	59
5. Pathologies plaquettares.....	61
5.1 Thrombopénies constitutionnelles.....	62
5.1.1 Classification des thrombopénies constitutionnelles	64
5.1.2 Thrombopénies syndromiques.....	65
5.1.3 Thrombopénie et malformations osseuses.....	67
5.1.4 Autres thrombopénies avec atteintes extra-hématologiques.....	68
5.1.5 Thrombopénies constitutionnelles sans anomalies extra-hématologiques	70
5.2 Thrombopathies.....	73
5.2.1 Anomalies des récepteurs plaquettares pour les protéines adhésives	74
5.2.2 Anomalies des récepteurs plaquettares pour des agonistes solubles	75
5.2.3 Anomalies des granules plaquettares.....	77
5.2.4 Anomalies des voies de signalisation	81
5.2.5 Anomalies des phospholipides membranaires	81

PARTIE II : TRAVAUX DE RECHERCHE	82
Etude 1 : Etat des connaissances sur les pathologies plaquettaires en Chine : Revue de la littérature.....	83
Résumé	83
Introduction	83
Méthodes	84
Résultats	84
Discussion	86
Article : Clinical-biological diagnosis for hereditary thrombocytopenias	89
Etude 2 : Evaluation des performances de la combinaison du test à la mepacrine et l'expression de CD63 par CMF dans le diagnostic des pathologies des granules denses.....	98
Résumé	98
Article : Usefulness of flow cytometric mepacrine uptake/release combined with CD63 assay in diagnosis of patients with suspected platelet dense granule disorder.....	102
Etude 3 : Carence en vitamine C et thrombopathie.....	125
Résumé	125
Introduction	126
Epidémiologie de la carence en vitamine C	126
Métabolisme de la vitamine C.....	126
Rôles physiologiques de la vitamine C	127
Présentation clinique du scorbut.....	127
Carence en vitamine C et fonctions plaquettaires	128
Cas cliniques	129
Discussion	130
Perspectives.....	132
Article : Acquired platelet δ -storage pool disease in scorbutic patients	133
Etude 4 : Détection de la sérotonine dans les granules denses plaquettaires par cytométrie en flux	140
Résumé	140
Introduction	142
Matériels et méthodes.....	144
Donneurs sains et prélèvements	144
Préparation du plasma riche en plaquettes (PRP).....	144
Activation des plaquettes.....	145
Immunomarquage de la sérotonine plaquettaire.....	145
Analyse par cytométrie en flux	146
Résultats	146
Faisabilité de la détection de sérotonine plaquettaire par cytométrie en flux.....	146
Variations des conditions de fixation et de perméabilisation.....	147
Titration des anticorps (A1 et A2).....	148
Résultats de quantification de sérotonine plaquettaire à l'état basal	150
L'évaluation de la capacité de sécrétion plaquettaire	150
La détection de sérotonine sur la surface des plaquettes	152
Discussion	154
Etude 5 : Dosage de la sérotonine plaquettaire totale et sécrétée par HPLC.....	157
Résumé	157

Introduction	158
Matériels et méthodes.....	158
Donneurs sains	158
Patients	158
Prélèvements	159
Préparation du plasma riche en plaquettes (PRP) et du plasma pauvre en plaquette (PPP)	159
Préparation de lysat plaquettaire	159
Préparation de surnageant de sécrétion des plaquettes	160
Détermination quantitative de la sérotonine plaquettaire et sécrétée par les plaquettes activées par HPLC.....	160
Résultats	160
Faisabilité du dosage de la sérotonine plaquettaire totale et de la sérotonine sécrétée par HPLC	160
Dosage de la sérotonine plaquettaire totale et sécrétée chez patients atteints de δ -SPD	161
Discussion	162
CONCLUSION GENERALE	164
AUTRES PUBLICATIONS PENDANT LA THESE	168
BIBLIOGRAPHIE	169

INDEX DES FIGURES

Figure 1. Les étapes essentielles de la mégacaryopoïèse ^[18]	4
Figure 2. L'expression des antigènes au cours de la différenciation mégacaryocytaire ^[20]	4
Figure 3. Morphologie et ultrastructure des plaquettes ^[51] . A. Les caractéristiques ultrastructurales principales schématisées. B. Une coupe de plaquette discoïde au repos examinée en microscopie électronique à transmission.....	9
Figure 4. Les majeurs récepteurs plaquettaires et leurs ligands ^[58]	11
Figure 5. Représentation schématique du complexe GPIb-V-IX ^[64]	14
Figure 6. Structure schématique du complexe GPIIbIIIa ^[66] . A. L'intégrine GPIIbIIIa est composée d'une GPIIb liant les ions calcique divalents associée à une GPIIIa riche en cystéines. Trois sites de liaison pour des peptides du fibrinogène ont été localisés sur le complexe. B. Structure conformationnelle du complexe GPIIbIIIa au repos et activé.....	15
Figure 7. Fonctions des plaquettes ^[1]	23
Figure 8. La représentation schématique de majeures réponses plaquettaires dans l'activation et de certaines thrombopathies constitutionnelles ^[82]	24
Figure 9. Biosynthèse des prostaglandines par la plaquette.....	29
Figure 10. L'agrégation plaquettaire en réponse aux différents agonistes. L'agrégation plaquettaire est amplifiée par la production de TXA2 à partir de phospholipides membranaires et par la sécrétion d'ADP à partir des granules denses ^[92]	32
Figure 11. Antagonisme de la PGI2 et le TXA2 ^[21]	34
Figure 12. Principe de la méthode de mesure de l'ATP plaquettaire ^[165] . La luciférase permet la combinaison réversible de l'ATP, substrat limitant la réaction enzymatique avec la luciférine : la réaction est déplacée par oxydation du complexe formé en présence d'oxygène moléculaire. Le dérivé oxydé instable formé se transforme en un composé stable avec libération d'AMP et émission de photons.....	50
Figure 13. Représentation schématique d'un cytométrie en flux ^[193]	57
Figure 14. Répartition des publications en fonction de la pathologie.....	86
Figure 15. Répartition des publications en fonction de ville.....	87
Figure 16. Courbes d'agrégation plaquettaire d'un patient atteint de scorbut.....	129
Figure 17. La vitamine C participe à la biosynthèse des neuromédiateurs dont la sérotonine par recycler la tétrahydrobioptérine ^[373] . AA : acide ascorbique (vitamine C).....	131
Figure 18. Le schéma des étapes du marquage immunologique.....	146
Figure 19. Histogrammes représentatifs de la détection de sérotonine des plaquettes à l'état basal. Le panel en haut provient du tube contrôle, et celui en bas obtenu du tube test.....	147
Figure 20. Histogrammes représentatifs de la détection de sérotonine des plaquettes activées. Le panel en haut représente le tube contrôle, et celui en bas représente le tube test.....	151
Figure 21. Comparaison des plaquettes perméabilisées (A et B) et non perméabilisées (C et D) sur un donneur.....	153
Figure 22. Chromatogrammes de PPP (A), de lysat plaquettaire (B) et de surnageant de sécrétion plaquettaire après stimulation par le collagène (C) chez un témoin. Pic à gauche : la sérotonine ; pic à droite : l'étalon interne.....	161
Figure 23. Stratégie d'exploration des granules denses plaquettaires.....	166

INDEX DES TABLEAUX

Tableau I. Différentes cytokines impliquées dans la production plaquettaire ^[21]	7
Tableau II. Principales glycoprotéines membranaires des plaquettes.	13
Tableau III. Principaux récepteurs couplés aux protéines G sur la surface des plaquettes ^[51]	17
Tableau IV. Constituants des granules α ^[77]	20
Tableau V. Constituants des granules denses ^[77]	21
Tableau VI. Principaux récepteurs d'adhérence présents à la surface des plaquettes et leurs ligands ^[51]	25
Tableau VII. Conséquences de l'activation plaquettaire ^[21]	27
Tableau VIII. Principales substances sécrétées par les granulations spécifiques et leurs propriétés ^[21]	30
Tableau IX. Comparaison des recommandations sur les agonistes et les concentrations à tester ^[129]	46
Tableau X. Le panel de base et le panel étendu d'agonistes recommandés par Harrison <i>et al</i> ^[123]	47
Tableau XI. Applications de la cytométrie en flux dans l'exploration des fonctions plaquettaires ^[2]	57
Tableau XII. Trousses prêtes à l'emploi pour une exploration plaquettaire par cytométrie en flux ^[193]	59
Tableau XIII. Les principale thrombopénies constitutionnelles avec une étiologie génétique identifiée ^[206]	62
Tableau XIV. Phénotypes cliniques du syndrome MYH9 ^[240]	69
Tableau XV. Les principaux syndromes associés aux anomalies des granules plaquettaires ^[76]	77
Tableau XVI. Les publications des pathologies plaquettaires constitutionnelles de la population Chinoise.....	84
Tableau XVII. Comparaison de la performance de la fixation et de la perméabilisation à concentrations différentes (sur le donneur D1).....	148
Tableau XVIII. Comparaison de la performance de la fixation et de la perméabilisation avec réactifs différents.....	148
Tableaux XIX. Titrage des anticorps.....	149
Tableau XX. Quantification de la sérotonine plaquettaire à l'état basal chez des donneurs sains.....	150
Tableau XXI. Comparaison des résultats à l'état basal et à l'état activé.....	152
Tableau XXII. Détection de la sérotonine sur la surface des plaquettes.....	153
Tableau XXIII. Dosage de la sérotonine plaquettaire totale et sécrétée après stimulation plaquettaire chez quatre témoins par HPLC.....	161
Tableau XXIV. Dosage de la sérotonine plaquettaire totale et sécrétée chez patients atteints de δ -SPD ...	162

ABREVIATIONS

β -TG : beta-thromboglobuline	MYH9 : Myosine Heavy Chain 9
ABP : actin binding protein	NSF : N-ethylmaleimide facteur sensible
ACD : acid citrate dextrose	PAF : paraformaldéhyde
ADP : adenosine diphosphate	PAI-1 : Plasminogen activator inhibitor-1
AMPc : adénosine monophosphate cyclique	PC : phosphatidylcholine
ATP : adenosine triphosphate	PCA : procoagulant activity
BFU-MKs : burst forming unit-megakaryocyte	PDGF : platelet-derived growth factor
BSS : syndrome de Bernard-Soulier	PE : phosphatidyléthanolamine
CAMT : congenital amegakaryocytic thrombocytopenia	PF4 : facteur plaquettaire 4
CFU : colony forming unit	PGE1 : prostaglandine E1
CHS : Chediak–Higashi syndrome	PGI2 : prostaglandines I2
CMF : cytométrie en flux	PI : phosphatidylinositol
COX-1 : cyclo-oxygénase 1	PKC : protein kinase C
CRP : collagen related peptides	PLA : phospholipase A2
CSF : clone stimulating factor	PLC : phospholipase C
CSHs : cellules souches hématopoïétiques	PMA : phorbol 12-myristate 13 acetate
DAG : diacylglycérol	PRP : plasma riche en plaquettes
ECM : matrice extracellulaire	PS : phosphatidylsérine
EDTA : éthylène diamine tétra-acétique	QPD : Quebec platelet disorder
ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay	RGD : Arginine–Glycine–Asparagine
FPD/AML: Familial platelet disorder with predisposition to acute myelogenous leukemia	SCO : système canaliculaire ouvert
GMPC : guanosine monophosphate cyclique	SDS-PAGE : Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
GP : glycoprotéines	SNPs : single nucleotide polymorphisms
GS : Griscelli Syndrome	SPD : storage pool deficiency,
GT : thrombasthénie de Glanzmann	SPG : syndrome des plaquettes grises
GTP : la guanosine triphosphate	TAR : thrombocytopenia with absent radii
HETE : hydroxyeicosatétraénoic acid	TEM : transmission electron microscopy
HPA : human platelet antigen	TOP : temps d'occlusion plaquettaire
HPETE : hydroperoxyeicosatétraénoic acid	TPO : thrombopoïétine
HPLC: high performance liquid chromatography	TRAP : thrombin receptor activating peptides
HPS : Hermansky–Pudlak syndrome	TS : temps de saignement
IMF: intensité médiane de fluorescence	TXA2 : thromboxane A2
IP3 : inositol 1,4,5-triphosphate	VASP : vasodilator stimulated phosphoprotein
ISRS : inhibiteur sélectif de la recapture de la sérotonine	VEGF : vascular endothelial growth factor
LAMP : lysosomal-associated membrane protein	VPM : volume plaquettaire moyen
LTA : light transmission aggregometry	VWD : von Willebrand disease
MGG : May-Grünwald Giemsa	vWF : facteur von Willebrand
MKs : mégacaryocytes	WAS : Wiskott-Aldrich syndrome
	XLT : X-linked thrombocytopenia

RÉSUMÉ

Les pathologies plaquettaires constitutionnelles sont des maladies très hétérogènes, souvent méconnues et sous-estimées. La pathologie des granules denses, l'une des pathologies plaquettaires les plus fréquentes, est également hétérogène tant cliniquement que biologiquement ; elle peut être acquise ou de déterminisme génétique. Cette entité peut être classée en deux sous-types, la maladie du pool vide delta (ou *delta-storage pool disease* (δ -SPD)) et le déficit de sécrétion.

Mon travail de doctorat a eu pour but d'optimiser le diagnostic de la pathologie des granules denses, surtout de développer et d'évaluer de nouvelles approches d'exploration des granules denses plaquettaires.

Nos échanges franco-chinois (Nancy-Wuhan) ont mis en évidence une méconnaissance des pathologies plaquettaires constitutionnelles en Chine. La revue de la littérature écrite par la communauté médicale chinoise décrit essentiellement les pathologies suivantes (thrombasthénie de Glanzmann, Syndrome de Bernard-Soulier, syndrome MYH9), rapportées par des auteurs de villes de Suzhou, Shanghai, Hong Kong et Taipei. Ces observations nous ont permis de conclure que les pathologies plaquettaires constitutionnelles sont méconnues et par conséquent sous diagnostiquées dans la majorité des régions en Chine, ce qui justifie la nécessité de la formation des équipes de soins et la diffusion des informations. Nous avons donc publié un article sur la thématique des thrombopénies constitutionnelles en langue chinoise dans une revue clinique.

La seconde partie de mon mémoire concerne l'évaluation de l'apport de la combinaison du test à la mépacrine et l'expression de CD63 par cytométrie en flux (CMF) dans le diagnostic de la pathologie des granules denses. D'une part, cette méthode par CMF nécessite un volume d'échantillon très faible et est également réalisable en cas de thrombopénie importante ; ce qui représente un avantage important par rapport au test d'agrégation plaquettaire et au test de sécrétion d'ATP. Elle est rapide, ce qui est adapté à la prise en charge d'un saignement en urgence. Enfin, la combinaison du test à la mépacrine et de l'expression de CD63, à l'état basal et après stimulation plaquettaire, permet une approche fonctionnelle différenciant les 2 sous-types de la pathologie des granules denses.

Dans la troisième partie, les auteurs présentent l'intérêt de l'utilisation de ces tests cytométriques dans une situation clinique particulière représentée par le scorbut. En effet, nous avons mis en évidence pour deux patients, une thrombopathie de type delta-SPD. La présence d'une thrombopathie de type

delta-SPD n'a jamais été rapportée dans le scorbut. Il est connu que la vitamine C est impliquée dans la biosynthèse de l'ATP et la sérotonine, deux composants majeurs des granules denses. Ainsi, notre hypothèse est d'impliquer cette carence en vitamine C dans la genèse du delta-SPD par diminution de l'ATP et de la sérotonine plaquettaire. Cette étiologie pourrait contribuer à la diathèse hémorragique du scorbut, qui jusqu'à présent était attribuée à des anomalies des fibres de collagène. Des études complémentaires incluant le dosage de métabolites de la vitamine C (catécholamines, acylcarnitine, phénylalanine) permettront d'avancer dans la compréhension de cette voie.

La quatrième partie de mon mémoire concerne le développement d'une méthode de détection de la sérotonine intra-plaquettaire par CMF. L'utilisation d'une technique d'immunomarquage indirect à base d'un anticorps anti-sérotonine spécifique après perméabilisation et fixation a permis d'obtenir un signal spécifique (tube test) par rapport au contrôle isotypique (tube contrôle) sous forme de ratio. Les auteurs montrent également les essais de dosage de sérotonine après stimulation plaquettaire dans le but de développer un test fonctionnel.

Enfin, nous avons initié un travail de quantification de sérotonine intra-plaquettaire par HPLC, à l'état basal et après stimulation plaquettaire. Nos résultats préliminaires sont présentés.

Mots clés : pathologies plaquettaires, pathologie des granules denses, vitamine C, sérotonine plaquettaire, cytométrie en flux

ABSTRACT

Inherited platelet disorders are considered as a heterogeneous group of diseases that are often unrecognized and misdiagnosed. Dense granule disorder, one of the most common platelet abnormalities, is clinically and biologically heterogeneous, being acquired or hereditary. This entity can be classified into two subtypes, delta-storage pool disease and secretion defect.

Our work was aimed to improve the diagnosis of platelet dense granule disorder, especially to develop and to evaluate novel approaches for investigation of platelet dense granules.

The franco-chinese exchanges (Nancy-Wuhan) suggested that inherited platelet disorders are hardly recognized in China. To know more about the state of knowledge of Chinese doctors on these diseases, we conducted a systematic review of prior reports published by Chinese medical community. The most reported diseases are Glanzmann thrombathenia, Wiskott-Aldrich, MYH9 syndrome and Bernard-Soulier syndrome, mainly published by authors from the cities of Suzhou, Shanghai, Hong Kong and Taipei. These have led us to conclude that inherited platelet disorders are unrecognized and under-diagnosed in most regions in China, which warrants the need of training for health care teams and information dissemination. Therefore we have published an article in Chinese on the topic of hereditary thrombocytopenia in a Chinese clinical journal.

The second part of my work was to evaluate the usefulness of flow cytometric mepacrine assay combined with CD63 expression in the diagnosis of dense granule disorder. The flow cytometric assay requires a minimum sample volume and can be performed in all cases even with severe thrombocytopenia; this represents a considerable advantage in comparison to platelet aggregation test and ATP secretion test. Moreover, its rapidity is appropriate for management of bleeding patients. The tests provide also a functional method to distinguish subtypes of dense granules disorder.

In the third part, we present the utilization of these flow cytometric tests in scurvy, a peculiar clinic situation resulting from severe vitamin C deficiency. The results indicated that both scorbutic patients were associated with dense granule disorder (delta-SPD). In literature, delta-SPD has not been reported in association with vitamin C deficiency. However, it is well known that vitamin C participates in the biosynthesis of ATP and serotonin, two major components of dense granules. Thus, it is supposed that vitamin C deficiency might result in δ -SPD by decreasing the levels of ATP and

serotonin in platelets. The implication of delta-SPD may additionally contribute to the hemorrhagic diathesis in scurvy which is assumed to be primarily related to abnormal collagen structure. Further investigations including metabolism pathway of vitamin C (catecholamines, acylcarnitine and phenylalanine) are necessary to better understand and establish the relationship between delta-SPD and vitamin C deficiency.

The fourth section of thesis is about the development of flow cytometric method for the detection of platelet serotonin. This approach includes platelet fixation, permeabilization, indirect immunostaining with specific antibody anti-serotonin and fluorescent secondary antibody and analysis on a flow cytometer. The content of platelet serotonin is expressed by a ratio of specific fluorescence (test tube) and isotypic control (control tube). The authors have also tried to combine this test with platelet stimulation in order to evaluate platelet secretion function.

Finally we have also initiated the development of a test to determine serotonin in both resting and stimulated platelets by HPLC. Our preliminary results are presented.

Keywords: platelet disorders, dense granule disorder, vitamin C, platelet serotonin, flow cytometry

PARTIE I : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1. ORIGINE DES PLAQUETTES

Les plaquettes humaines sont des fragments cellulaires anucléés qui adhèrent aux vaisseaux sanguins endomagés et effectuent la fonction de l'hémostase primaire. En l'absence d'activation, les plaquettes circulent dans le sang sous forme discoïde de 2 à 4 μm de diamètre et possèdent un volume moyen de 7 à 10 fL^[1, 2]. Lorsqu'elles sont activées, leur morphologie se modifie, elles deviennent sphériques en émettant des pseudopodes.

La numération plaquettaire normale d'un individu se situe entre 150 et 400 x 10⁹/L (en France). Néanmoins, il est à noter que les valeurs de référence sont influencées par de nombreux facteurs. Depuis longtemps, il a été suggéré que la numération plaquettaire varie avec l'âge^[3] et le sexe^[4]. Elle est plus élevée chez les femmes par rapport aux hommes (malgré un niveau de thrombopoïétine moins important chez les femmes^[5]), et chez les jeunes que chez les personnes âgées. Des études récentes incluant de larges cohortes ont confirmé ces observations^[6, 7]. En outre, des différences significatives de la numération plaquettaire ont été signalées en fonction de l'origine ethnique^[8-10]. Par exemple, les valeurs de référence en Chine sont de 100 à 300 x 10⁹/L et une variation du taux des plaquettes a été observée dans les régions différentes^[11, 12]. Cependant, la plupart des laboratoires dans les pays occidentaux utilisent encore la gamme de 150 à 400 ou 450 x 10⁹/L comme intervalle de référence pour toutes les personnes, quel que soit leur âge, le sexe et l'origine ethnique. Récemment, des intervalles de référence qui prennent en compte de l'âge et le genre ont été proposées pour évaluer la numération plaquettaire chez les personnes d'origines différentes dans la population Italienne^[13].

Bien que la gamme « normale » (150-400 x 10⁹/L) soit assez large, la numération plaquettaire d'un individu est maintenue dans une fourchette beaucoup plus étroite^[14, 15]. Cela nécessite un équilibre constant (ou homéostasie) entre la thrombopoïèse, la sénescence et la consommation plaquettaire.

Les plaquettes sont libérées par les mégacaryocytes (MKs) matures dans la moelle. La durée de vie moyenne de plaquettes dans le sang étant de 8 à 10 jours^[16], la lignée mégacaryocytaire doit donc, quotidiennement, remplacer 10 à 12 % de la masse plaquettaire de l'organisme, ce qui équivaut, chez l'adulte, à une production quotidienne de quelques 220 milliards de plaquettes.

A pleine maturité, le mégacaryocyte est une cellule à noyau et à cytoplasme gigantesques. La taille énorme des mégacaryocytes compense leur petit nombre.

Les MKs sont facilement reconnaissables à cause de leur grande taille, 30 à 100 µm sur un frottis de moelle osseuse et de 25 à 30 µm sur une coupe histologique de biopsie ostéoméduillaire. Ils sont représentés en faible quantité dans la moelle osseuse (0.05% des cellules nucléées)^[17]. On distingue, par stade successif de différenciation et maturation, les mégacaryoblastes, les mégacaryocytes basophiles, les mégacaryocytes granuleux, dont le cytoplasme se fragmente en amas de plaquettes. Les mégacaryoblastes hyperploïdes sont reconnaissables morphologiquement lorsqu'ils ont au moins 8 N d'ADN.

1.1 MEGACARYOPOÏÈSE

La mégacaryopoïèse peut être décrite comme des étapes discrètes d'un continuum dans lequel les cellules souches hématopoïétiques deviennent mégacaryocytes thrombocytogènes (plaquetto-gènes)^[18] (Figure 1). Tout d'abord, des cellules souches hématopoïétiques pluripotentes subissent un "engagement" sous l'influence à la fois de cytokines et de facteurs de transcription tels que GATA-1, FOG-1, FLI-1^[19]. En se différenciant, celles-ci se spécialisent progressivement et deviennent des cellules souches unipotentes (BFU-MKs et CFU-MKs, cf. ci-dessous), capables de proliférer sous l'impulsion régulatrice d'interleukine-3 et du CSF-Méga (*Megakaryocyte-Clone Stimulating Factor*). Dans des conditions de cultures appropriées, BFU-MKs (*Burst Forming Unit-Megakaryocyte*, moins mature) et CFU-MKs (*Colony Forming Unit-Megakaryocyte*, plus mature) peuvent donner lieu à de grandes ou petites colonies de MKs, respectivement. Ensuite, les CFU-MKs perdent la capacité d'auto-renouvellement et s'engagent dans un processus d'entomitose sous l'action régulatrice de la thrombopoïétine (TPO). La chromatine nucléaire se multiplie mais sans division cellulaire, conduisant à la polyploïdisation et l'élargissement cellulaire. Enfin, le MK immature (mégacaryoblaste) complète sa différenciation terminale en un MK mature, avec un noyau hyperploïdes (>16N), la taille élargie, le développement des granulations et autres organites plaquettaires, et du réseau des membranes de démarcation.

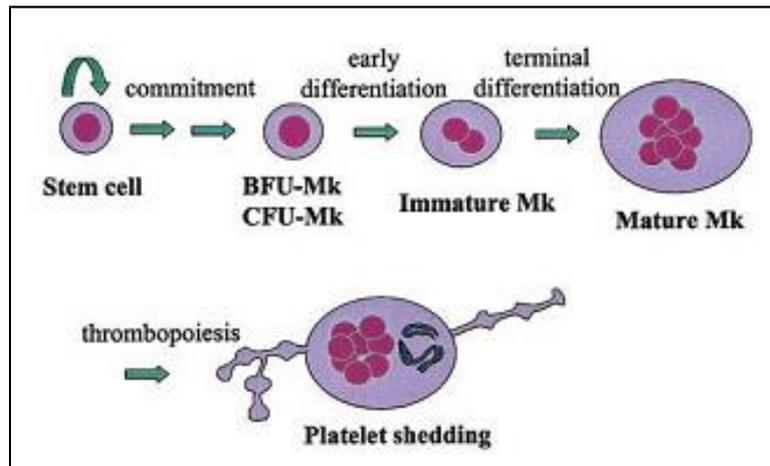


Figure 1. Les étapes essentielles de la mégacaryopoïèse^[18].

Dès le stade mégacaryocytaire, des protéines spécifiquement plaquettaires comme le complexe IIb/IIIa et le facteur plaquettaire-4 (PF4) sont synthétisées et présentées à la surface des MKs (Figure 2). D'autres protéines d'origine plasmatique sont intégrées aux granules par un mécanisme d'endocytose (fibrinogène, thrombospondine) ou de pinocytose (albumine, immunoglobulines IgG)^[16].

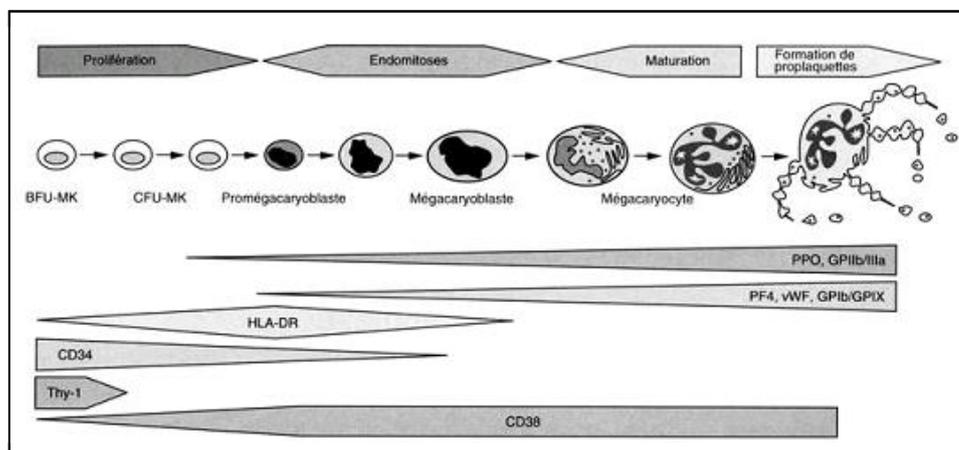


Figure 2. L'expression des antigènes au cours de la différenciation mégacaryocytaire^[20].

1.2 NAISSANCE DES PLAQUETTES

Au terme de ce processus de maturation, le mégacaryocyte mature développe de longs pseudopodes cytoplasmiques, appelés proplaquettes, qui traversent la paroi sinusoidale et pénètrent dans le sinus médullaire. Il s'ensuit une fragmentation progressive du pseudopode dans la lumière de la sinusoidale,

le long de la membrane de démarcation cytoplasmique du pseudopode. Ce mécanisme, modulé par la thrombopoïétine, serait le principal processus de naissance des plaquettes. La fragmentation « au hasard » expliquerait en partie l'hétérogénéité du volume des plaquettes. Le noyau nu du mégakaryocyte est ensuite phagocyté par les macrophages des cordons médullaires^[21]. Le mégakaryocyte donne ainsi naissance à 2000 à 5000 plaquettes environ par cellule^[22].

La formation des plaquettes nécessite une réorganisation dynamique de l'actine, de la myosine, et du cytosquelette microtubulaire ainsi que les emballages et le transport des granules et des organites intracellulaires^[23-25]. Les mégakaryocytes expriment une isoforme de tubuline spécifique, β -tubuline, qui forme la bande marginale et aide à maintenir la forme discoïde des plaquettes au repos^[26]. Multiples protéines y interviennent également, y compris les intégrines, les filamines et la spectrine.

1.3 CINÉTIQUE PLAQUETTAIRE NORMALE

A l'état physiologique, 70% de la masse plaquettaire extramédullaire circulent dans le sang avec une durée de vie moyenne de 8 à 10 jours, ce qui équivaut à un taux de renouvellement d'environ 35 à 45 x 10⁹/L de plaquettes par jour. Des études ont démontré que 5 à 10% des plaquettes sanguines contenaient de l'ARNm. Ces plaquettes réticulées constitueraient une mesure quantitative de la thrombopoïèse.

1.4 SEQUESTRATION SPLENIQUE PHYSIOLOGIQUE

Une rate normale séquestre dans sa pulpe rouge 20 à 30% des plaquettes produites par la moelle, résultant de leur traversée très lente dans la pulpe rouge. Une splénectomie provoque une thrombocytose temporaire (quelques semaines). Par contre, une splénomégalie importante hausse la proportion des plaquettes intraspléniques par rapport à celles du sang : les plaquettes séquestrés peuvent atteindre 90% de la masse plaquettaire extramédullaire mais sans diminuer le temps de survie des plaquettes^[16]. Il en résulte une thrombopénie qui, même lorsque la thrombopoïèse médullaire est normale, peut être aussi prononcée (40 à 50 x10⁹/L).

1.5 ROLE DES ERYTHROCYTES DANS LA CIRCULATION DES PLAQUETTES

Dans la microcirculation, les érythrocytes du sang circulent dans la partie centrale du vaisseau à la manière d'un convoi cellulaire cylindrique, de telle sorte qu'une fraction très importante des plaquettes est repoussée et concentrée dans le plasma périphérique, à proximité de la paroi vasculaire où le taux de cisaillement est maximal. Cette position est éminemment stratégique et optimale pour participer décisivement à l'hémostase et pour surveiller en permanence l'intégrité du système vasculaire^[1]. Cela explique le fait que l'hémostase primaire est déficiente et le temps de saignement est allongé dans l'anémie sévère.

1.6 MORT PHYSIOLOGIQUE DES PLAQUETTES

La majorité des plaquettes meurt par sénescence, une minorité (environ 20%) est détruite au hasard : la plupart de ces dernières seraient consommées sur l'endothélium ou l'intima où elles contribuent grandement au maintien et à la restauration de l'intégrité vasculaire.

Le cimetière naturel des plaquettes est constitué par les phagocytes du système des phagocytes mononucléés : ils éliminent les plaquettes sénescents. La rate est l'organe principal de destruction physiologique des plaquettes, le foie et la moelle osseuse ayant une fonction complémentaire^[27].

1.7 REGULATION DE LA MEGACARYOPOÏESE

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 MKs^[28].

L'interleukine-3 (IL-3) la TPO, le Méga-CSA (activité stimulant la formation de colonies de mégacaryocytes) et le MSF (facteur stimulant les mégacaryocytes) sont les principales cytokines régulatrices, et leurs actions se complètent mutuellement au niveau des progéniteurs et des cellules différenciées de la lignée mégacaryocytaire (Tableau I). La mégacaryopoïèse nécessite également d'autres cytokines et des interactions entre les cellules souches hématopoïétiques et les cellules stromales médullaires. L'IL-6 et l'IL-11 stimulent la prolifération des progéniteurs des MKs. SDF-1

(*Stromal-Derived Factor-1*), produits par les cellules stromales, et PF4 favorisent la migration et les interactions des MKs avec les cellules endothéliales médullaires^[29].

Tableau I. Différentes cytokines impliquées dans la production plaquettaire^[21].

CELLULES	PROCESSUS CELLULAIRES	CYTOKINES RÉGULATRICES
Progéniteurs mégacaryocytaires (CFU-Méga)	Multiplication cellulaire	IL-3, Méga-CSA ¹ et GM-CSF ¹
Mégacaryoblastes	Endomitoses	Thrombopoïétine et MSF ¹
Mégacaryoblastes et mégacaryocytes	Hypertrophie et maturation cytoplasmiques	Thrombopoïétine et MSF

La thrombopoïétine (TPO) constitue la cytokine essentielle régulatrice de la prolifération et de la maturation des progéniteurs de la lignée mégacaryocytaire. 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 »^[30]. Cette glycoprotéine, synthétisée principalement dans le foie à une vitesse constitutive^[31], est le ligand du récepteur c-Mpl.

A la différence de l'érythropoïétine (EPO), qui est régulé positivement en réponse à l'hypoxie, le niveau de la TPO dans le plasma est régulée par adsorption et internalisation par les cellules qui expriment le récepteur de TPO, c-Mpl^[32]. Ainsi, lorsque les plaquettes et MKs sont réduits en nombre, moins de TPO est retiré du plasma et le niveau de la TPO augmente, ce qui se traduit par une augmentation de la production plaquettaire. En revanche, lorsque le nombre de plaquettes et MKs augmente, la TPO diminue dans le plasma. Le niveau de TPO est ainsi inversement corrélé à la numération plaquettaire^[28], comme en témoigne les patients sous chimiothérapie thrombopénisante qui présentent des taux importants de TPO^[33].

Ce récepteur, c-Mpl, 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*)^[16].

Après s'être liée à son récepteur présent à la surface de tous les stades de MKs, la TPO est capable d'induire la dimérisation de ce récepteur et la 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^[28].

Considérée initialement nécessaire pour la production de plaquettes, la TPO est maintenant connue pour avoir un rôle beaucoup plus large dans le maintien et l'expansion des cellules souches hématopoïétiques (CSHs)^[34, 35]. Comme preuve de l'importance de la TPO pour les CSH, des souris transgéniques dépourvues de TPO ou de son récepteur c-Mpl, ont environ 10% du nombre prévu de CSHs et des cellules progénitrices de toutes les lignées, en plus de la thrombopénie^[36, 37]. En particulier, des mutations qui altèrent la fonction de c-Mpl chez les humains provoquent non seulement une thrombopénie, mais aussi l'apparition d'une aplasie médullaire^[38].

La compréhension du rôle primordial de la TPO dans la mégacaryopoïèse a conduit les industries pharmaceutiques à élaborer dans un premier temps des formes recombinantes de la TPO endogène mais qui ont été rapidement limitées par la génération d'anticorps neutralisants ayant une activité croisée avec la TPO endogène. A la suite, des agonistes du récepteur de la TPO (appelés également TPO mimétiques) ont été synthétisés et ont reçu l'autorisation de mise sur le marché dans le traitement des thrombopathies constitutionnelles^[39, 40] et du purpura thrombopénique immunologique réfractaire après splénectomie ou en cas d'impossibilité de l'effectuer (romiplostim et eltrombopag)^[41].

D'autres réseaux de facteurs de transcription interviennent également pour stimuler la mégacaryopoïèse. En particulier, les interactions impliquant cinq facteurs de transcription (GATA1, GATA2, RUNX1, FLI1 et TAL1/SCL) coopèrent pour favoriser l'expression des gènes spécifiques mégacaryocytaires^[42]. Des modèles souris et des études *in vitro* témoignent également de l'importance de ces facteurs pour mégacaryopoïèse^[43-48].

2. STRUCTURE ET ANATOMIE FONCTIONNELLE DES PLAQUETTES

Bien que la présence de petits éléments circulants au niveau des bouchons hémostatiques ait été initialement rapporté en 1882 par Bizzozero et Hayem^[49], c'est l'avènement de la microscopie électronique et le développement des techniques de fixation et de coloration relativement sophistiquées, qui ont permis de définir l'architecture intracellulaire de ces cellules anucléées. Les plaquettes sont des éléments "cellulaires" en forme de disque, ne contenant pas de noyau. Elles sont formées d'une membrane délimitée, d'un cytosquelette constitué majoritairement de microtubules et d'actines, d'un système tubulaire dense, d'un système tubulaire ouvert, de nombreux granules et des organites intracellulaires^[50].

L'analyse par microscopie électronique permet de distinguer trois composants principaux de la plaquette correspondant à des spécialisations fonctionnelles et biochimiques : le système membranaire, le cytosquelette et les organelles. L'ultrastructure de la plaquette au repos est représentée dans la Figure 3.

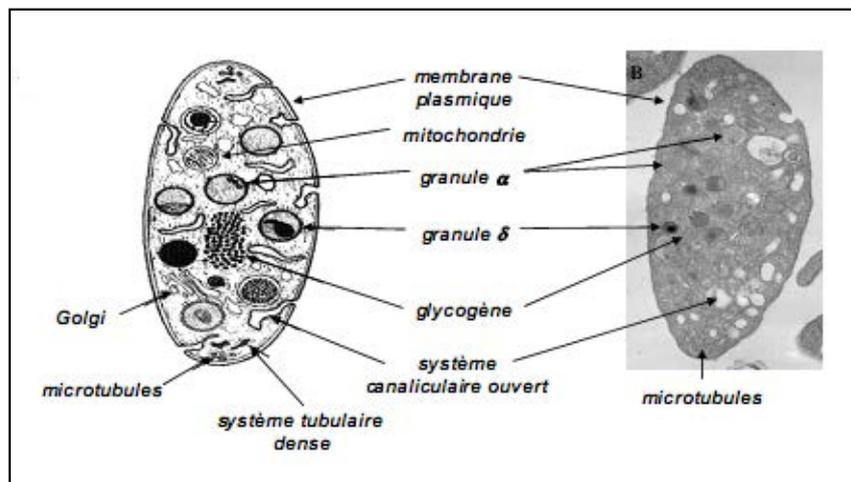


Figure 3. Morphologie et ultrastructure des plaquettes^[51]. A. Les caractéristiques ultrastructurales principales schématisées. B. Une coupe de plaquette discoïde au repos examinée en microscopie électronique à transmission.

2.1 LA MEMBRANE

La membrane plaquettaire présente la structure trilaminaire classique, avec 2 feuillets lipidiques externe et interne de composition différente, maintenant une couche riche en glycoprotéines.

La membrane comprend des protéines (60%) et des lipides (15%). Les lipides membranaires sont constitués essentiellement de phospholipides (80% du total lipidique). Les cinq phospholipides membranaires les plus importants sont : la phosphatidylcholine (PC), la phosphatidyléthanolamine (PE), la sphingosine (S), la phosphatidylsérine (PS) et le phosphatidylinositol (PI). Il existe une asymétrie de distribution des lipides membranaires, les phospholipides de charge négative (la PS et la PE) étant confinés essentiellement dans le feuillet interne, et la PC, la S et le PI prédominant dans le feuillet externe^[52, 53]. A l'état normal la distribution asymétrique de ces molécules est maintenue grâce à des enzymes (flippase, floppase et scramblase) agissant en coopération de manière concertée^[54, 55].

Cette asymétrie peut cependant être perdue lors de certains événements comme l'apoptose ou l'activation plaquettaire. En effet, au cours d'une forte activation plaquettaire, les charges négatives migreront vers le feuillet externe et la PS est ainsi exposée par un mécanisme de « flip-flop » sur le feuillet externe^[56], étape importante qui va promouvoir la coagulation.

La composition en acides gras des phospholipides est particulièrement riche en acide arachidonique : lors de l'activation plaquettaire il sera libéré par la phospholipase A2. Une cyclooxygénase (péroxydase plaquettaire) va induire la formation d'endopéroxydes et une thromboxane synthétase permettra la formation de thromboxane A2 (TXA2). Plusieurs de ces composants sont des messagers intracellulaires et agents agrégants, importants dans le fonctionnement des plaquettes.

On trouve également des lipides neutres, surtout du cholestérol (90% de cholestérol libre). Le cholestérol, molécule rigide et compacte, assure l'homéostasie de la fluidité membranaire (stabilisation de la membrane) et la formation de microdomaines appelés radeaux lipidiques (*rafts*) ayant un rôle important dans la signalisation plaquettaire^[57].

2.1.1 Récepteurs membranaires des plaquettes

Une grande variété de récepteurs membranaires ont été découverts sur la membrane plaquettaire^[58] (Figure 4), dont :

- des intégrines (α IIb β 3, α 2 β 1, α 5 β 1, α 6 β 1, α v β 3) ;
- récepteurs riches en séquences répétées riches en leucine (glycoprotéines [GP] Ib-IX-V, des récepteurs Toll-like) ;
- récepteurs transmembranaires couplés aux protéines G hétérotrimériques (GPCR) (récepteurs de la thrombine PAR-1 et PAR-4, récepteurs de l'ADP P2Y1 et P2Y12, récepteur de TXA2 TP α) ;
- les protéines appartenant à la superfamille des immunoglobulines (GPVI, Fc γ RIIA, PECAM-1) ;
- récepteurs de type lectine (P-sélectine) ;
- des récepteurs activant tyrosine kinase (récepteur de thrombopoïétine c-Mpl, Gas-6, éphrines et kinases Eph) ;
- d'autres types (CD63, CD36, la P-sélectine ligand 1, récepteur de TNF, etc.).

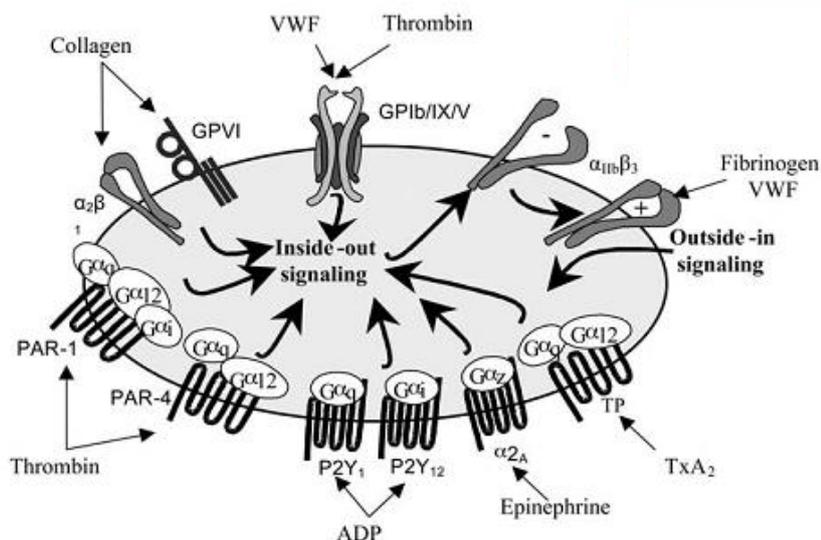


Figure 4. Les majeurs récepteurs plaquettaires et leurs ligands^[58].

Un grand nombre de ces récepteurs sont partagés par d'autres types de cellules, mais une partie sont exprimés uniquement sur les plaquettes. De nos jours, il est bien établi que les récepteurs plaquettaires jouent un rôle important dans la fonction hémostatique des plaquettes, en permettant des interactions spécifiques avec des protéines adhésives et des agonistes plaquettaires solubles (Figure 4). En outre, il est de plus en plus reconnu qu'un éventail de récepteurs sont impliqués dans d'autres fonctions plaquettaires moins bien élucidées, telles que l'inflammation, la croissance et la métastase des tumeurs, ou la défense immunologique de l'hôte^[59].

2.1.2 Les glycoprotéines membranaires

Plus de 40 molécules protéiques ont été identifiées à la surface plaquettaire, dont les glycoprotéines sont les représentants majeurs. Attachées ou ancrées dans la membrane (un à sept domaines transmembranaires hydrophobes), la partie glucidique de ces protéines est orientée vers l'extérieur et interagit avec le contenu plasmatique.

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 la bande des protéines en deux bandes distinctes^[16].

Ils jouent un rôle essentiel dans l'hémostase primaire en se liant spécifiquement à des ligands. L'adhérence des plaquettes à la matrice extracellulaire (sous-endothélium) est médiée par des glycoprotéines spécifiques (GPIb-V-IX, GPIaIIa, GPVI). D'autres GPs interviennent lors de l'activation pour l'agrégation des plaquettes entre elles (GPIIbIIIa)^[60]. Les principales GPs sont regroupées dans le Tableau II (page suivante).

Plusieurs glycoprotéines membranaires sont des protéines intégrales ou intégrines (protéines traversant complètement la membrane phospholipidique). Chaque intégrine est constituée de deux sous-unités (α et β) reliées de manière non covalente. Chacune d'elles comporte un domaine extracellulaire possédant des sites de liaison aux cations divalents, un domaine membranaire et un domaine cytoplasmique connecté au cytosquelette par l'intermédiaire de protéines et de complexes, capable de ce fait de transmettre un signal intervenant dans la médiation de nombreuses interactions cellulaires parmi lesquelles l'adhérence et l'agrégation plaquettaires. Dans la plaquette, on trouve les intégrines α IIb β 3, α 2 β 1, α 5 β 1, α v β 3 et α 6 β 1.

Tableau II. Principales glycoprotéines membranaires des plaquettes.

Récepteurs	Cluster de différenciation	Intégrine	Ligand	Fonction
GPIa(VLA-2)	CD49b	sous-unité $\alpha 2$ de $\alpha 2\beta 1$	Collagène	Adhérence, étalement, activation
GPIb-V-IX	GPIb α :CD42b; GPIb:CD42c; GPV:CD42d; GPIX:CD42a	nonintégrin	Facteur Willebrand	Adhérence, étalement
GPIc(VLA-5)	CD49e	sous-unité $\alpha 5$ de $\alpha 5\beta 1$	Thrombine Fibronectine	Activation Adhérence, étalement
GPIc'(VLA-6)	CD49f	sous-unité $\alpha 6$ de $\alpha 6\beta 1$	Lamine	Adhérence,
GPIIa	CD29	sous-unité $\beta 1$ de $\alpha 2\beta 1, \alpha 5\beta 1, \alpha 6\beta 1$	Fibronectine	Adhérence,
GPIIb/GPIIIa	CD41/CD61	$\alpha IIb\beta 3$	Fibrinogène Fibronectine Vitronectine	Agrégation Agrégation Agrégation
GPIV	CD36	nonintégrin	Facteur Willebrand Thrombospondine	Agrégation Adhérence
GPVI		nonintégrin	Collagène Thrombine	Signalisation, Activation Activation (?)

Le complexe glycoprotéique GPIb-IX-V

Ce complexe glycoprotéique est constitué de quatre sous-unités (GPIb α , GPIb β , GPV, GPIX) codées par des gènes différents (GPIBA : 17p12, GPIBB : 22q12-2, GP5 : 3q29, GP9 : 3q21) et assemblées au stade de MK mature^[40].

Il existe environ 25 000 complexes GPIb-IX-V par plaquette. Le complexe GPIb-IX-V comprend deux molécules GPIb α (CD42b) et deux molécules GPIb β (CD42c) reliées entre elles par des ponts disulfure, puis associées de façon non-covalente à deux molécules GPIX (CD42a) et une molécule GPV (CD42d), chacune caractérisée par des séquences répétées riche en leucine (GPI α : GPIb : GPIX : GPV 2 : 2 : 2 : 1)^[61].

Le domaine globulaire N-terminale de GPIb α (résidus 1-282) est la grande région de liaison de

ligand pour GPIb-IX-V et contient des sites de liaison pour le facteur von Willebrand (vWF), l'intégrine leucocytaire $\alpha M\beta 2$ (Mac-1), la thrombine, et la P-sélectine exprimée sur les plaquettes activées ou des cellules endothéliales activées^[62, 63](Figure 5).

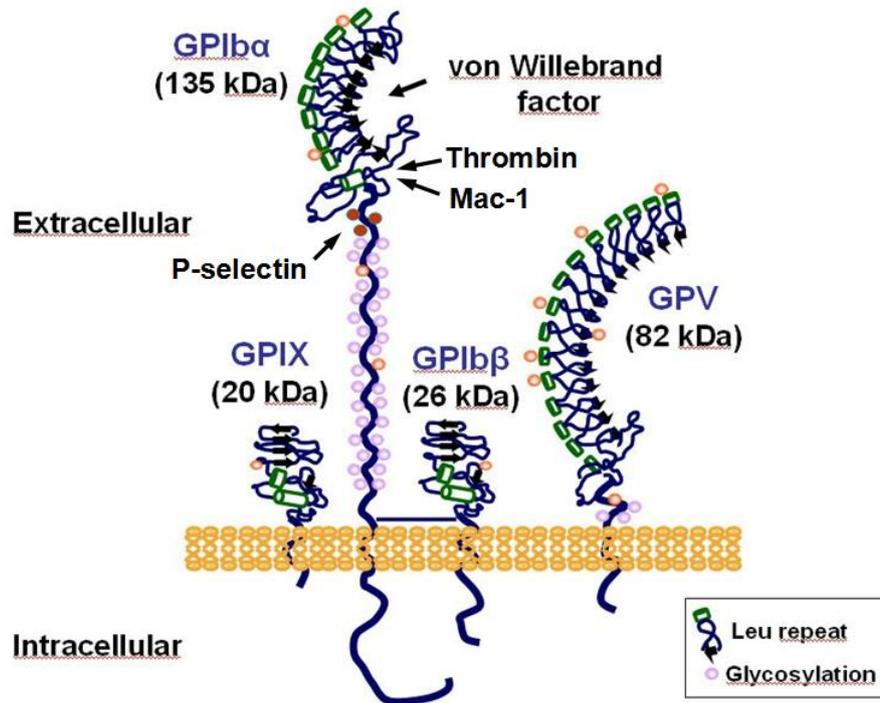


Figure 5. Représentation schématique du complexe GPIb-V-IX^[64].

Le complexe GPIb-IX-V est essentiel pour l'hémostase (surtout la phase d'adhérence plaquettaire), car le domaine extracellulaire de GPIb α se lie au sous-endothélium par l'intermédiaire du vWF et ainsi localise les plaquettes au site de la lésion vasculaire. Le vWF, présent dans le sang sous forme de multimère, se fixe au sous-endothélium et dévoile un site cryptique de fixation à la sous-unité GPIb α 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^[61].

La GPIb est connectée au cytosquelette, donc la formation du complexe GPIb-V-IX-vWF active l'ABP (*Actin Binding Protein*), ce qui débute la polymérisation de l'actine et aboutit au changement de la forme des plaquettes. La GPIIX associée à la sous-unité GPIb β intervient surtout dans l'ancrage du complexe à la membrane plaquettaire. La GPV forme des liaisons non-covalentes avec le complexe GPIb-GPIIX et elle sera ultérieurement clivée par la thrombine après l'activation

plaquettaire.

Le complexe glycoprotéique GPIIb/IIIa

Le complexe GPIIb/IIIa, nommé également α IIb β 3, fait partie de la famille des intégrines et est un hétérodimère calcium-dépendant constitué de deux glycoprotéines : GPIIb (CD41) et GPIIIa (CD61) (Figure 6). La GPIIb est composée de deux chaînes reliées par un pont disulfure, une chaîne lourde extra-cellulaire et une chaîne légère transmembranaire. La GPIIIa est constituée d'une chaîne polypeptidique unique, comportant plusieurs ponts disulfures intracaténaires. Les gènes (ITGA2B et ITGB3) codant pour ces protéines sont situés sur le chromosome 17q21-23^[65].

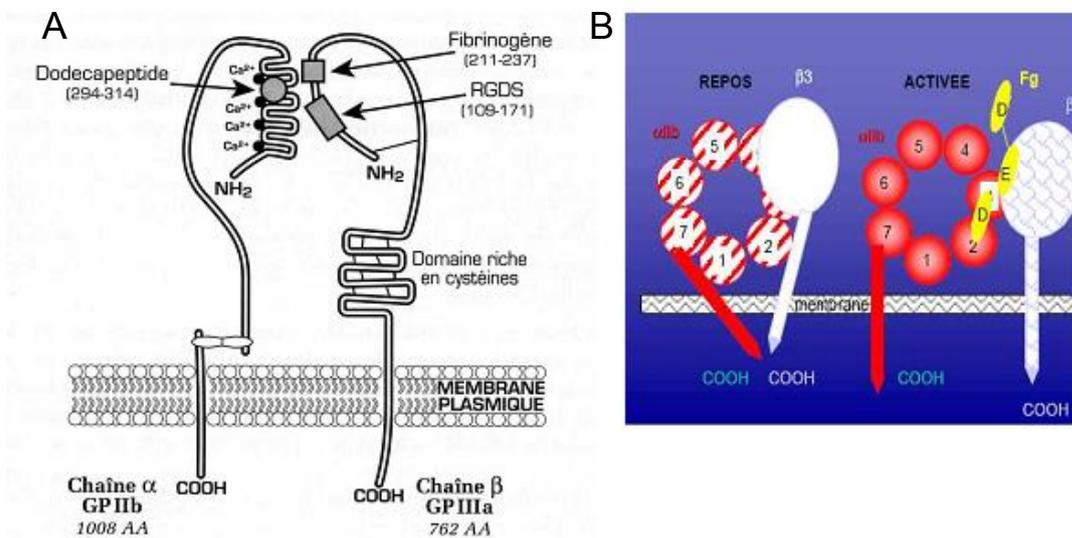


Figure 6. Structure schématique du complexe GPIIb/IIIa^[66]. **A.** L'intégrine GPIIb/IIIa est composée d'une GPIIb liant les ions calcium divalents associée à une GPIIIa riche en cystéines. Trois sites de liaison pour des peptides du fibrinogène ont été localisés sur le complexe. **B.** Structure conformationnelle du complexe GPIIb/IIIa au repos et activé.

Ce complexe est le récepteur le plus abondant, environ 50 000 à la surface de chaque plaquette, auxquelles s'ajoutent environ 30 000 autres molécules distribuées sur le système canaliculaire ouvert et la membrane des granules (qui se retrouvent exposés en surface lors de l'activation plaquettaire). La sous-unité β 3 est également un composant du récepteur de la vitronectine (α v β 3) exprimé sur de nombreux types de cellules, notamment des cellules endothéliales, des ostéoclastes, des fibroblastes, des monocytes et des lymphocytes B activés^[40]. Par conséquent, CD61 ne peut

pas utilisé comme un antigène spécifique des plaquettes.

Le complexe GPIIb/IIIa reconnaissent diverses protéines ayant des séquences d'acides aminés particulières : RGD (Arginine–Glycine–Asparagine, i.e. ARG-GLY-ASP). Ces séquences se retrouvent au niveau de protéines comme le fibrinogène, le vWF, la fibronectine ou la vitronectine. Une fois activé par les agonistes plaquettaires, le complexe peut se lier à ces protéines adhésives. Le CD40L soluble (sCD40L), excrété à partir des plaquettes activées, peut se lier à son récepteur CD40, mais aussi au complexe GPIIb/IIIa par un domaine KGD (ou RGD chez la souris) favorisant la signalisation des intégrines^[58].

Dans les plaquettes activées, le complexe GPIIb/IIIa se liant aux protéines adhésives (le fibrinogène lors de force de cisaillement faible, le VWF lors de force de cisaillement élevée), établit ainsi des ponts entre les plaquettes adjacentes entraînant ainsi leur agrégation. Le complexe GPIIb/IIIa permet également un lien entre la fibrine et les protéines du cytosquelette intracellulaires qui interviennent dans la rétraction du caillot^[67]. A l'état normal la plaquette incorpore divers composants plasmatiques dans ses granulations, et le complexe GPIIb/IIIa participe au transport du fibrinogène vers les granules α . En outre, le complexe GPIIb/IIIa est également le support des antigènes plaquettaires HPA-1, HPA-4 et HPA-3.

La glycoprotéine GPVI

La GPVI appartient à la superfamille des immunoglobulines^[68]. Il existe environ 4 000 copies par plaquette. Elle est le récepteur principal du collagène de type I et III présent dans le sous-endothélium. D'autres ligands existent, y compris le peptide associé au collagène (*Collagen Related Peptides*, CRP), et la protéine de venin de serpent, la convulxine. Des études ont identifié les régions spécifiques impliquées dans la reconnaissance entre la GPVI et ses ligands^[69].

Autres glycoprotéines et récepteurs membranaires

Il existe de nombreuses autres protéines qui constituent des récepteurs d'adhérence, d'activation, d'agrégation et d'inhibition plaquettaire. La GPIa (CD49b) et la GPIIa (CD29) formant le complexe GPIaIIa, qui porte l'alloantigène HPA-5, intervient à la phase initiale de l'adhérence plaquettaire au sous-endothélium en jouant le rôle de récepteur pour le collagène. La GPIIa (CD29) forme avec la GPIc (CD49e) le récepteur de la fibronectine et avec la GPIc' (CD49f) le récepteur de la laminine. La GPIV (CD36), présente également sur la membrane des granules α est le récepteur pour la

thrombospondine et le collagène^[70].

La membrane plasmatique plaquettaire présente également le récepteur de haute affinité à la TPO, c-Mpl, des récepteurs des immunoglobulines (Ig), des récepteurs aux agonistes plaquettaires solubles (TXA₂, ADP, ATP, thrombine) dont la plupart sont couplés à la protéine G (Tableau III) ainsi que d'autres allo-antigènes spécifiquement plaquettaires.

Tableau III. Principaux récepteurs couplés aux protéines G sur la surface des plaquettes^[51].

Ligand	Récepteur	Couplage
<i>ACTIVATION</i>		
Thrombine	PAR1, PAR4	Gq, G ₁₂₋₁₃
ADP	P2Y1	Gq
	P2Y12	Gi
Sérotonine	5-HT _{2A}	Gq
Adrénaline	α _{2A}	Gz
TxA ₂	Tpα, TPβ	Gq, G ₁₂₋₁₃
Vasopressine	V _{1A}	Gq
PGE ₂	EP ₃	Gi
<i>INHIBITION</i>		
Adénosine	A _{2A}	Gs
PGI ₂ /PGE ₁	IP	Gs
PGD ₂	DP	Gs

2.2 SYSTEME CANALICULAIRE

Outre la membrane « externe », il existe un système membranaire intracellulaire : le système canaliculaire ouvert et le système tubulaire dense.

2.2.1 Le système canaliculaire ouvert (SCO).

Le système canaliculaire ouvert est constitué de profondes invaginations de la membrane plaquettaire ouvertes à la surface. Le SCO représente ainsi une source de membranes utilisable lors du changement de forme des plaquettes, par exemple la formation de pseudopodes et lors de l'étalement plaquettaire. Ce « réservoir » de membranes augmente la surface de contact en rendant accessible un plus grand nombre de récepteurs glycoprotéiques. Le SCO permet une

communication rapide entre des éléments extra cellulaires et l'intérieur des plaquettes, en tant que le siège préférentiel de l'endocytose de substances plasmatiques et de l'exocytose du contenu des granules plaquettaires lors de l'activation plaquettaire^[16].

2.2.2 Le système tubulaire dense

Le système tubulaire dense est un système membranaire non connecté à la surface et correspondant à du réticulum endoplasmique lisse résiduel du mégacaryocyte. Il contient des enzymes de la voie de synthèse des prostaglandines.

Un de ses rôles les plus importants est le stockage d'ions calcium puisqu'il intervient dans la régulation de la concentration de Ca^{2+} cytosolique au cours de l'activation plaquettaire^[71].

2.3 LE CYTOSQUELETTE

Le cytosquelette est un réseau constitué de divers composants structuraux de la plaquette^[72, 73] :

- Un anneau microtubulaire circonférenciel (de 8 à 24 microtubules) formé majoritairement de tubuline, présent à la périphérie de la plaquette, chargé de maintenir la forme discoïde des plaquettes au repos (désassemblage lors de l'activation) ;
- Un réseau de microfilaments d'actine partant dans le cytoplasme et un cytosquelette composé de petits filaments d'actine relié à la membrane externe (ils interviennent dans la contraction, la dégranulation, la rétraction du caillot et l'émission de pseudopodes) ;
- Des filaments intermédiaires, et un nombre important de protéines telles que la taline, la profiline, la vinculine, l'ABP (Actin Binding Protein), la gelsoline, la spectrine et la myosine.

Les microfilaments d'actine se présentent sous forme monomère (actine G) ou polymérisée (actine F). A l'état basal, des protéines comme la profiline, la thymosine béta-4 et la gelsoline limitent la polymérisation; l'activation de la plaquette entraîne la polymérisation de l'actine (interviennent également l' ABP et la myosine), ce qui aboutit à : (1) une modification de forme (aspect sphérique, émission de fins filaments appelés filopodes) (2) une redistribution des granulations intra plaquettaires (3) une redistribution de glycoprotéines de la membrane faisant intervenir également la spectrine et l'actinine.

2.4 LES ORGANITES PLAQUETTAIRES

Les plaquettes renferment dans leur cytoplasme des mitochondries, des grains de glycogène et plusieurs types de granules (les granules α , les granules denses et les lysosomes). Les granules α et les granules denses sont spécifiques aux plaquettes et mégacaryocytes, alors que les lysosomes sont omniprésents. Le contenu moléculaire de granules plaquettaire détermine leur morphologie, la densité, la taille et la fonction. Lors d'une activation forte, les granules sécrètent leur contenu par un mécanisme d'exocytose. Leur membrane s'unit à celle de la plaquette (la membrane externe ou celle du système tubulaire ouvert).

2.4.1 Granules α

Parmi les organites plaquettaire, les granules α sont les plus abondants (20 à 200 par cellule, 80 en moyenne), principal réservoir intracellulaire des protéines. Ils sont repérables en microscopie électronique : ovalaires ou arrondis (200-500 nm μ m de grand axe), d'aspect grisé, avec quelques structures tubulaires et une région plus sombre (nucléoïde)^[74, 75].

Les constituants des granules α peuvent être regroupé en fonction de leur source^[76] :

- des protéines synthétisées au niveau des mégacaryocytes dont la β -thromboglobuline, le facteur 4 plaquettaire qui sont spécifiques des plaquettes et le VWF qui est synthétisé également dans les cellules endothéliales.
- des protéines plasmatiques incorporées dans les granules à partir du plasma. L'endocytose peut être passive (cas de l'albumine, d'Ig) ou active, via un récepteur membranaire spécifique (par exemple, le fibrinogène est transporté à l'aide du complexe GPIIbIIIa).

En fonction de leur rôle fonctionnel, les composants sont énumérés dans le Tableau IV (non exhaustif). Les granules α contiennent donc, de façon compartimentée, des protéines qui jouent un rôle important dans la coagulation, l'inflammation, la cicatrisation ou les relations cellule-matrice^[77].

La membrane des granules α contient de nombreuses molécules. Le composant majeur est la P-sélectine (ou GMP 140, CD62P ou PADGEM). On trouve aussi GPIIb-IIIa, GMP-33, CD9, PECAM-1 et CD40 ligand (CD154). La P-sélectine va se transférer à la membrane externe de la plaquette lors de l'activation (la mise en évidence de P-sélectine sur la surface plaquettaire est un

bon témoin de l'activation plaquettaire).

Tableau IV. Constituants des granules α [77].

Adhesion molecules	P-selection, von Willebrand factor (vWF), thrombospondin, fibrinogen, integrin α IIb β 3, integrin α v β 3, fibronectin
Chemokines	Platelet basic protein [platelet factor 4 (PF4) and its variant (CXCL4) and β -thromboglobulin], CCL3 (MIP-1 α), CCL5 (RANTES), CCL7 (MCP-3), CCL17, CXCL1 (growth-regulated oncogene- α), CXCL5 (ENA-78), CXCL8 (IL-8)
Coagulation pathway	Factor V, multimerin, factor VIII, FXI
Fibrinolytic pathway	α 2-Macroglobulin, plasminogen, plasminogen activator inhibitor 1
Growth and angiogenesis	Basic fibroblast growth factor, epidermal growth factor (EGF), hepatocyte growth factor, insulin-like growth factor 1, transforming growth factor β (TGF- β), vascular endothelia growth factor-A, vascular endothelial growth factor-C, platelet-derived growth factor (PDGF)
Immunologic molecules	β 1H Globulin, factor D, cl inhibitor, IgG
Other proteins	Albumin, α ₁ -antitrypsin, Gas6, histidine-rich glycoprotein, high molecular weight kininogen, osteonectin proteases nexin-II (amyloid beta-protein precursor)

2.4.2 Granules denses

Les granules denses sont moins nombreux (3 à 8 par cellule) et de petite taille (0,2–0,3 μ m de diamètre) par rapport aux granules α . Les granules denses sont de forme ovale et possèdent une forte densité aux électrons en microscopie électronique ce qui explique leur nom^[49].

Les granules denses sont légèrement acide avec un pH à 6,1^[49]. Ils renferment de fortes concentrations en ATP et ADP à un ratio 2 : 3, contrastant 8 : 1 dans le plasma^[78]. Les nucléotides

d'adénosine stockés dans ces granules (pool non-métabolique) proviennent du mégacaryocyte et représentent 60 % de la teneur totale de la plaquette, alors que les nucléotides restants (pool métabolique) sont présents soit libre dans le cytoplasme ou liée à l'actine dans les mitochondries. Ces deux pools ne sont pas interchangeables^[49, 79]. La sérotonine, non-synthétisée dans les MKs, est incorporée de façon active à partir du plasma par un transporteur SERT de la membrane plasmique et s'accumule dans les granules denses via un autre transporteur VMAT 2 (*Vesicular monoamine transporter 2*, ou SLC18A)^[78]. Ces granules contiennent également une grande quantité de calcium. Ces constituants (Tableau V), fortement reliés par des forces inter-moléculaires, sont sécrétés lors de l'activation plaquettaire pour renforcer l'hémostase.

Au niveau de leur membrane, les granules denses contiennent de petites protéines : CD63, LAMP-2 (CD107b), P-sélectine (CD62P), la tyrosine kinase Src, ainsi que d'autres récepteurs tels que GPIIb et GPIIbIIIa^[78]. Le CD63 (nommé également la granulophysin, LAMP-3, LIMP-CD63, et PTLGP40), un élément de la superfamille des tétraspanines, est présent sur la membrane des granules denses et des lysosomes des plaquettes au repos. Lors de l'activation plaquettaire, le CD63 est transféré vers la membrane plasmique.

Tableau V. Constituants des granules denses^[77].

Ions	Ca ²⁺ , Mg ²⁺ , P, pyrophosphate
Nucléotides	ATP, GTP, ADP, GDP
Membrane proteins	CD63 (granulophysin), LAMP2
Transmitters	Serotonin

2.4.3 Lysosomes (*granules λ*)

De forme arrondie de 0,2 µm de diamètre, les lysosomes contiennent en particulier des hydrolases acides (e.g., la phosphatase-acide et la β-glucuronidase), de la cathepsine, une collagénase et une proélastase^[80]. Ces enzymes ne sont sécrétées qu'en cas de stimulation maximale des plaquettes et leur rôle est plus important dans l'initiation de la lyse des thrombi que dans l'hémostase^[66]. Les protéines majoritaires de leur membrane sont LAMP-1, LAMP-2, and CD63.

2.5 D'AUTRES COMPOSANTS DE LA PLAQUETTE

D'autres organelles sont communes à toute cellule. Un petit nombre de mitochondries qui contribuent au métabolisme énergétique sont présents. Les grains de glycogène en quantité importante sont souvent regroupés en amas, le réticulum est lisse ou granuleux, les ribosomes sont peu abondants mais non-absents. Des microperoxysomes (catalase) sont aussi présents.

Des études de biologie moléculaire ont montré l'existence en quantités très faibles d'acide ribonucléique (ARN) messenger. Bien qu'il s'agisse d'une cellule anucléée, la plaquette est donc encore capable de quelques synthèses protéiques^[81].

3. FONCTIONS DES PLAQUETTES

Les plaquettes, cellules sanguines les plus petites, sont multifonctionnelles et sont impliquées dans de nombreux processus physiopathologiques comme l'hémostase primaire, la coagulation, la fibrinolyse, la thrombose, la réparation des vaisseaux sanguins, l'inflammation et même la croissance et les métastases de tumeurs^[1, 2] (Figure 7).

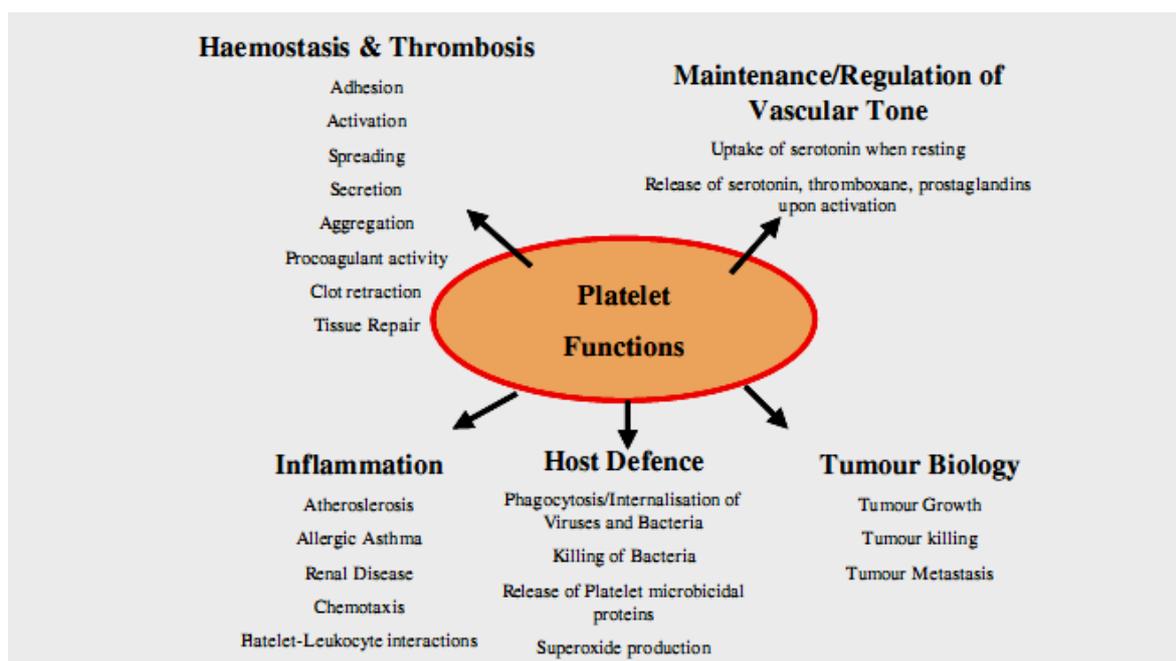


Figure 7. Fonctions des plaquettes^[1].

3.1 ROLE MAJEUR DANS L'HEMOSTASE PRIMAIRE

Les plaquettes ont pour fonction principale de construire des bouchons plaquettaires hémostatiques oblitérant les brèches vasculaires (l'hémostase primaire). L'hémostase primaire trouve son efficacité physiologique maximale dans les très petits vaisseaux (artérioles, veinules et capillaires) où les forces de cisaillement sont élevées favorisant le fonctionnement des plaquettes.

A l'état normal, le revêtement endothélial intact est remarquablement efficace pour empêcher le déclenchement des réactions d'hémostase, en produisant de puissants inhibiteurs de plaquettes tels que le monoxyde d'azote (NO), la prostacycline et ADPase naturelle (CD39). Tout au contraire, le sous-endothélium est très thrombogène et ainsi le vaisseau lésé peut à la fois, induire la formation

du clou plaquettaire instable et déclencher aussi la coagulation qui le transformera en bouchon hémostatique stable. Les interactions entre la paroi vasculaire lésée et plaquettes, plaquette-plaquette, puis plaquettes et facteurs de coagulation mettent en jeu les divers composants de la plaquette (Figure 8). La formation de thrombus est un processus cyclique dynamique et bien régulée, comportant séquentiellement ou simultanément l'adhérence, l'activation, la sécrétion et l'agrégation des plaquettes^[2].

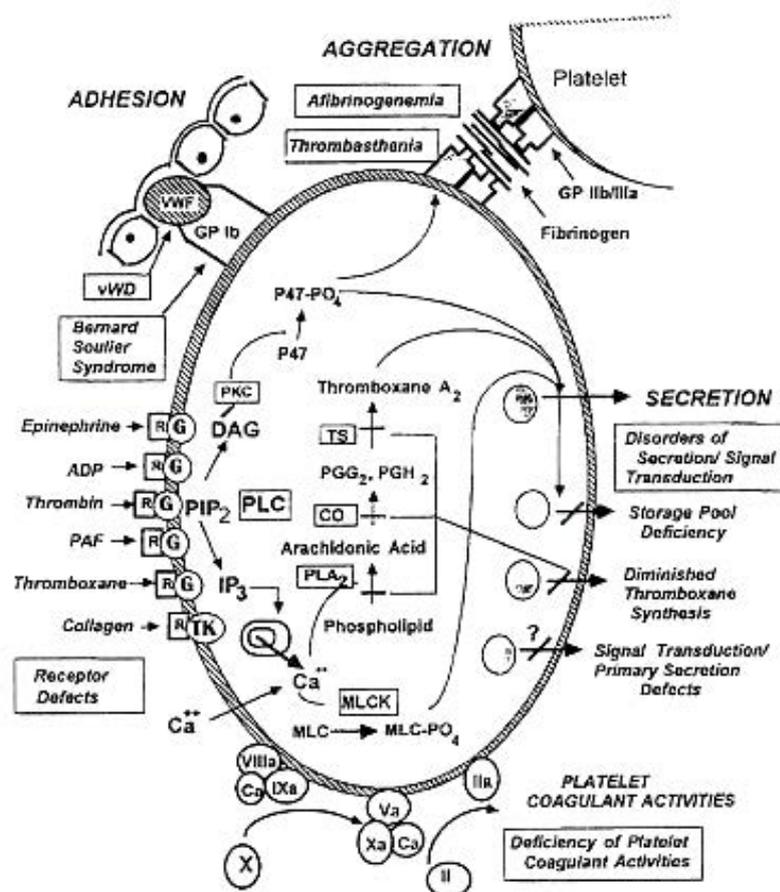


Figure 8. La représentation schématique de majeures réponses plaquettaires dans l'activation et de certaines thrombopathies constitutionnelles^[82].

3.1.1 L'adhérence des plaquettes

La matrice sous-endothéliale immédiatement sous-jacente à l'endothélium contient un grand nombre de protéines adhésives, et la plaquette possède de nombreux récepteurs pour ces protéines^[83]. Lors d'une brèche vasculaire, les plaquettes vont ralentir et adhérer au sous-endothélium exposé en liant des constituants de la matrice comme le collagène et le vWF par

l'intermédiaire des récepteurs membranaires.

Le vWF et le collagène sont indispensables au recrutement des plaquettes au niveau de la brèche vasculaire. Le complexe GPIb-V-IX en liant le domaine A1 du vWF, qui est immobilisé au collagène, joue un rôle prédominant dans l'adhérence plaquettaire. Mais sont également impliqués GPIIb/IIIa ($\alpha_2\beta_1$) se liant au collagène et d'autres récepteurs plaquettaires dont les principaux sont énumérés dans le Tableau VI.

Tableau VI. Principaux récepteurs d'adhérence présents à la surface des plaquettes et leurs ligands^[51].

Récepteur plaquettaire	Ligand
Complexe GPIb-V-IX	FW, Thrombine, P-Selectine, FXII, KH, Mac-1
Intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$	Fibrinogène, FW, Fibronectine, Vitronectine
Intégrine $\alpha_2\beta_1$	Collagène
Intégrine $\alpha_5\beta_1$	Fibronectine
Intégrine $\alpha_v\beta_3$	Vitronectine, FW
Intégrine $\alpha_6\beta_1$	Laminine
PECAM-1	Collagène, PECAM-1, Glycosaminoglycanes
ICAM-2	LFA-1
Fc γ RIIA	IgG
P-Selectine	PSGL-1, GPIIb/IIIa
GPVI	Collagène, Thrombospondine

Le taux de cisaillement affecte de façon différentielle l'adhérence des plaquettes aux surfaces. Le vWF est essentiel à une adhérence efficace dans les vaisseaux de petit calibre où l'on observe des forces de cisaillement élevées, probablement parce que cette condition hémorrhéologique provoque des changements conformationnels dans le vWF et/ou la GPIb plaquettaire^[84, 85]. Dans ces conditions, l'attachement des plaquettes nécessite le vWF déjà immobilisé ou capturé par le domaine A3 du collagène sous-endothélial, ce qui entraîne également un changement de conformation du vWF avec une augmentation de l'affinité pour la GPIb. Tel n'est cependant pas le cas de la fibronectine dont l'efficacité est indépendante des forces de cisaillement^[21]. En outre, les forces de cisaillement très élevées ont pour conséquences : la formation du convoi érythrocytaire central qui libère des couches

périphériques de plasma près de l'endothélium pour les plaquettes, et une augmentation du taux de collisions des plaquettes avec le sous-endothélium et entre elles. Directement ou indirectement, la dynamique hémorrhéologique potentialise l'adhérence et l'agrégation plaquettaires.

Trois sources différentes de vWF peuvent contribuer au vWF sous-endothélial : la synthèse par les cellules endothéliales, les dépôts à partir de plasma ou une libération à partir des granules α plaquettaires^[83]. Le vWF sous-endothélial semble associé au collagène de type VI, mais il peut également se lier à plusieurs types de collagène.

L'interaction entre la GPIb α et le vWF ne provoque pas en elle-même une adhérence ferme; elle présente plutôt une constante de dissociation élevée ne permettant qu'un attachement transitoire et une translocation lente^[85]. L'adhérence initiée par interaction GPIb α -vWF est stabilisée par multiples liens entre la plaquette et les autres substances adhésives de la paroi vasculaire^[86]. Une fois ralenties, les plaquettes vont pouvoir lier le vWF *via* l'intégrine α Iib β 3 et s'associer au collagène grâce à la glycoprotéine GPVI et à l'intégrine α 2 β 1. Ces liaisons vont assurer l'adhérence stable et irréversible ainsi que l'activation complète des plaquettes ce qui conduit à leur agrégation^[87, 88].

Le complexe GPIIbIIIa (ou α Iib β 3) peut fonctionner comme un récepteur d'adhérence pour le fibrinogène immobilisé même en l'absence d'activation plaquettaire, mais l'activation plaquettaire est nécessaire pour l'adhérence médiée par l'interaction entre le complexe GPIIbIIIa et le vWF ou la fibronectine^[89].

Les plaquettes peuvent interagir directement avec le collagène exposé *via* GPIaIIa (α 2 β 1), tandis que l'interaction entre les plaquettes et le collagène implique d'autres récepteurs, tels que GPIV, GPVI et p65^[90]. De plus, le fibrinogène, la fibronectine et vWF, que ce soit libéré à partir des plaquettes ou circulant dans le plasma, peuvent également se lier au collagène. À leur tour, ces protéines peuvent alors interagir avec des récepteurs des plaquettes comme GPIIbIIIa, GPIc'IIa (α 5 β 1), et/ou GPIbIX, complétant un mécanisme sandwich initiée par exposition du collagène^[90, 91].

3.1.2 L'activation des plaquettes

Une première couche monocellulaire de plaquettes se constitue ainsi par l'adhérence à la paroi vasculaire lésée. Les plaquettes adhérentes s'activent et recrutent d'autres plaquettes circulantes. Grâce à l'étalement, le collagène excite un nombre croissant de récepteurs plaquettaires ; l'activation externe est transmise dans la plaquette par des médiateurs biochimiques (messagers

intracellulaires) et amplifient l'activation des plaquettes. La phase d'activation plaquettaire consécutive à leur adhérence comprend de multiples réactions morphologiques et biochimiques. Il en résulte le changement de forme des plaquettes en passant d'une forme discoïde à ronde avec émission de filopodes suite au remaniement de leur cytosquelette, la génération de thromboxane A2 (TXA2) à partir des lipides membranaires, la sécrétion du contenu de leurs granules, le changement conformationnel du complexe GPIIb/IIIa (état activé avec une affinité haute pour ses ligands). Par ailleurs, les plaquettes activées exposent une surface procoagulante favorisant la formation de thrombine, qui va aboutir à la production d'un réseau de fibrine consolidant le clou plaquettaire^[1,2, 58, 82]. Ces conséquences sont résumées dans le Tableau VII.

Tableau VII. Conséquences de l'activation plaquettaire ^[21].

REACTIONS	CONSEQUENCES
1. Changement de forme Disque → sphère avec pseudopodes	Propriétés d'adhérence et d'agrégation accrues
2. Formation du récepteur membranaire du fibrinogène par l'union des glycoprotéines GPIIb et GPIIIa	Agrégation
3. Sécrétion A. Métabolites de lipides membranaires (ex. thromboxane A2, endoperoxydes cyclique, PAF) B. Contenu des granules spécifiques (ex. ADP, sérotonine ; fibrinogène ; facteur Willebrand)	Amplification de l'activation Agrégation et amplification de l'adhérence et de l'activation
4. Surfaces plaquettaires procoagulantes résultant du remaniement des phospholipides membranaires	Accélération de la coagulation et localisation de celle-ci sur les membranes cellulaires

Les récepteurs impliqués dans l'activation plaquettaire

Différents agonistes se fixent à leur récepteur spécifique et amplifient les phases d'adhérence et d'activation plaquettaires initiales en recrutant des plaquettes supplémentaires. Certains agonistes sont considérés pour entraîner une activation « forte » (la thrombine, le collagène et le TXA2) et d'autres

« faible » (l'épinéphrine, l'ADP et la sérotonine)^[92]. La plupart de ces activateurs sont libérés ou synthétisés au niveau du site de lésion vasculaire, ce qui entraîne une réponse avec restriction géographique (locale) et temporelle. Ces agonistes peuvent initier l'agrégation tout seul ou en combinaison avec un ou plusieurs autres agonistes.

In vivo, ils agissent très probablement en combinaison. En fait, le mélange des agonistes présents dans un bouchon hémostatique est susceptible de changer à mesure que le processus se déroule, avec peut-être le rôle du collagène plus important au début, celui de la thrombine prédominant plus tard, et avec les autres agonistes de concentration variée. L'activation plaquettaire induite par multiples agonistes n'est pas simplement additive alors que les interactions synergiques sont bien documentées^[93, 94]. Contrairement à d'autres agonistes, l'épinéphrine est considéré comme un agoniste faible incapable d'activer directement phospholipase C (PLC) ou provoquer le changement de forme. Cependant, son action synergique avec de nombreux autres agonistes à faibles concentrations renforce de façon significative leur effet activateur. Cet effet de potentialisation de l'épinéphrine est dû à sa capacité à inhiber la formation d'AMPc par la liaison de son récepteur adrénergique α_2A à la protéine Gz, un membre de la famille Gi α ^[58, 95].

Conséquences de l'activation plaquettaire

L'action d'agonistes sur des récepteurs membranaires des plaquettes a pour conséquence la production ou la libération de plusieurs molécules de messenger intracellulaire, y compris des ions Ca^{2+} , du diacylglycérol (DAG), de l'inositol 1,4,5-triphosphate (IP3), du TXA2, et les nucléotides cycliques (AMPc, GMPc)^[82]. Ceux-ci induisent ou modulent diverses réponses plaquettaires : la mobilisation de Ca^{2+} , la phosphorylation des protéines, l'agrégation, la sécrétion, et la libération de l'acide arachidonique^[2, 58]. Les interactions entre les récepteurs d'agonistes et les principaux effecteurs intracellulaires, des enzymes (par exemple, la phospholipase A2 [PLA2], la PLC, adénylyl cyclase) sont médiées par un groupe de protéines G qui sont modulées par la guanosine triphosphate (GTP)^[82]. Lors de l'activation plaquettaire, l'acide arachidonique est libéré des phospholipides membranaires par deux voies enzymatiques différentes : soit hydrolyse directe par la PLA2 ou séquentielle par la PLC puis la diacylglycérolipase. Dans les plaquettes l'acide arachidonique subit l'action de la cyclo-oxygénase 1 (COX-1) et de la lipooxygénase^[82] (Figure 9). La lipooxygénase produit des leucotriènes, tels l'HPETE (*Hydroperoxyeicosatetraenoic acid*) et l'HETE

(*Hydroxyeicosatetraenoic acid*). La cyclooxygénase prodomine normalement : elle transforme l'acide arachidonique en deux endoperoxydes cycliques, les prostaglandines PGG₂ et PGH₂. A leur tour, celles-ci donneront naissance à d'autres prostaglandines (PGI₂, PGD₂, PGE₁). La PGH₂, sous l'action de la thromboxane synthase, est transformée en thromboxane A₂ (TXA₂). Le TXA₂ inhibe l'activité de l'adénylate cyclase membranaire induisant une diminution du taux d'AMPc intraplaquettaire et la libération de calcium^[21]. Le TXA₂ est un puissant agent inducteur de l'agrégation et de la sécrétion des plaquettes favorisant le recrutement de plaquettes en circulation. De plus, c'est un puissant vasoconstricteur.

La cyclooxygénase plaquettaire est inhibée irréversiblement par l'aspirine. L'aspirine bloque définitivement la synthèse de prostaglandines et de thromboxane A₂ par les plaquettes, et cette synthèse plaquettaire ne recommencera qu'avec l'arrivée dans la circulation de jeunes plaquettes produites après l'administration de l'aspirine. Cette propriété pharmacologique de l'aspirine est le fondement de son utilisation comme médicament antithrombotique^[21].

La biosynthèse des prostaglandines plaquettaires et endothéliales est identique jusqu'à l'étape de la production de la PGH₂. Mais l'étape finale donne naissance à des produits de propriétés radicalement différentes : le TXA₂ et la PGI₂. Ces deux substances ont des propriétés mutuellement antagonistes sur la plaquette et sur la cellule musculaire lisse de la paroi vasculaire. Le rapport de forces qui s'établit entre la prostacycline et le thromboxane A₂ est considéré décisif pour la modulation des réactions plaquettaires (voir plus loin).

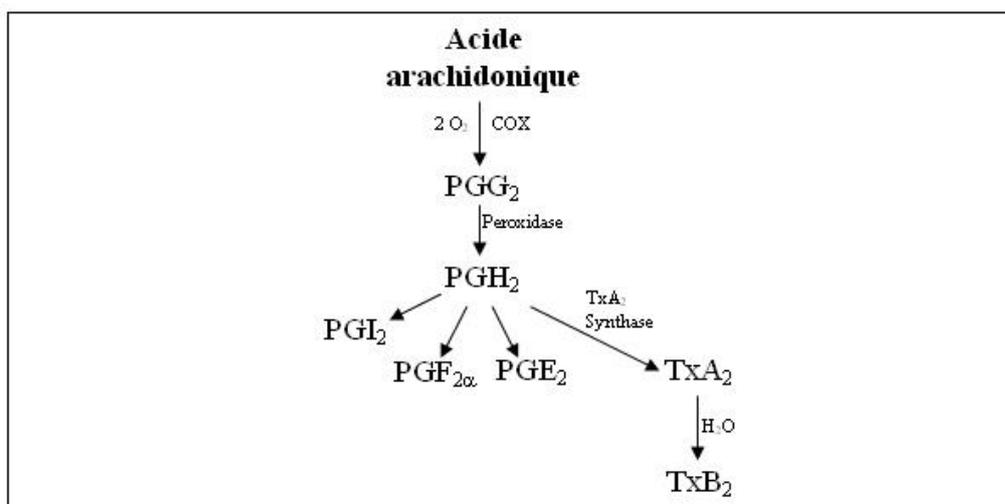


Figure 9. Biosynthèse des prostaglandines par la plaquette.

Les agonistes activent également la PLC. Celle-ci transforme le phosphatidylinositol en deux seconds messagers très actifs : IP3 et DAG. L'IP3 active alors une ATPase calcium-dépendante qui permet de mobiliser le calcium à partir du système tubulaire dense. Quant au DAG, il active la protéine kinase C (PKC) à l'origine de la phosphorylation d'un grand nombre de protéines.

L'activation de la PKC est considérée importante dans la sécrétion plaquettaire et l'activation de GPIIbIIIa^[82]. L'IP3 et le DAG sont ensuite recyclés et réincorporés à la membrane sous forme de PI. Un certain nombre d'autres différents mécanismes de signalisation ont été définis dans l'activation des plaquettes, par exemples, des agonistes agissent sur des récepteurs activant une cascade de phosphorylation sur des tyrosines^[82].

3.1.3 La sécrétion plaquettaire

L'activation plaquettaire entraîne la contraction des plaquettes, une centralisation des granules ainsi que la sécrétion de leur contenu à l'extérieur de la plaquette par fusion avec la membrane plasmique ou le système tubulaire ouvert^[80].

Cette fonction correspond à la libération dans le milieu, par exocytose, des molécules stockées au sein des granules plaquettaires (granules α , granules denses et lysosomes). Les substances libérées sont biologiquement actives et constituent une rétrorégulation positive pour renforcer l'adhérence, l'agrégation et la sécrétion des plaquettes. Certaines molécules peuvent influencer la coagulation (facteur V, fibrinogène, vWF) et modifier la perméabilité vasculaire (VEGF) et le tonus vasculaire (sérotonine). Les principales substances et leurs fonctions sont énumérées dans le Tableau VIII.

Tableau VIII. Principales substances sécrétées par les granulations spécifiques et leurs propriétés^[21].

ORGANITES	SUBSTANCES	PROPRIETES
Granules denses	ADP	Agrégation
	Sérotonine	Agrégation, vasoconstriction
	Calcium, ionisé	Cofacteur de l'adhérence et de l'agrégation
Granules alpha	Facteur von Willebrand plaquettaire	Adhérence et agrégation
	Fibrinogène	Agrégation
	Facteur V plaquettaire	Coagulation
	Facteur de croissance cellulaire	Prolifération des fibroblastes et des myocytes (guérison du vaisseau)

De plus, les membranes des plaquettes activées captent de façon sélective plusieurs des substances sécrétées par les plaquettes dans le milieu ambiant, notamment l'ADP, la sérotonine, le facteur V, le fibrinogène, le facteur Willebrand et la fibronectine.

L'exocytose plaquettaire se produit à travers des mécanismes qui sont homologues à ceux utilisés par d'autres cellules sécrétrices spécialisées telles que les neurones. L'exocytose implique la réorganisation de structure de l'actine, le mouvement des granules vers la membrane plasmique adjacente, la fusion de membranes des granules et de la plaquette, et la libération du contenu intracellulaire^[96, 97]. La sécrétion plaquettaire se fait par un mécanisme SNARE (*Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor Attachment Receptor*) dépendant. Les protéines SNARE sont un groupe de molécules structurellement reliées provenant de trois superfamilles de gènes (avec plus de 30 membres) qui comprennent les syntaxins, VAMP, et gènes SNAP-25-associés^[98]. Chaque protéine SNARE contient une région bispiralée (ou SNARE-domaine) avec environ 60 acides aminés. Grâce à ce domaine, les protéines SNARE de différentes membranes forment des complexes oligomères serrés et stables qui ont été démontrés suffisants pour catalyser la fusion membranaire^[99]. Le NSF (N-ethylmaleimide facteur sensible), une ATPase Mg²⁺-dépendante, dissocie les complexes SNARE, ce qui est nécessaire pour l'exocytose^[100, 101]. L'interaction des SNAREs est également réglée par un certain nombre de protéines différentes, y compris les protéines Sec1/Munc18. Les protéines Rab (GTPase) sont également impliquées dans le processus de sécrétion par médiation de l'amarrage (docking) des granules^[102].

3.1.4 L'agrégation plaquettaire

Récepteurs et ligands

L'agrégation plaquettaire se produit lorsque les glycoprotéines adhésives (essentiellement fibrinogène et le vWF) se lient à la fois sur GPIIb/IIIa de deux plaquettes différentes. Le complexe GPIIb/IIIa, 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 des séquences d'acides aminés particulières : RGD. Le vWF, la fibronectine et la vitronectine, qui possèdent également la séquence peptidique, peuvent se substituer ou agir en concertation avec le fibrinogène et provoquer l'agrégation. Lorsque les forces de cisaillement sont élevées, le vWF est considéré comme le plus important en initiant les

contacts plaquette-plaquette^[86, 103]. La liaison du complexe GPIIb/IIIa à ces ligands nécessite une modification conformationnelle consécutivement à l'activation plaquettaire. Les récepteurs GPIIb/IIIa activés sur les plaquettes adhérentes peuvent alors se lier vWF et/ou fibrinogène et attendre l'interaction avec d'autres plaquettes, qui elles-mêmes peuvent subir une activation de ses récepteurs GPIIb/IIIa en tant que résultat de l'exposition à l'ADP et au TXA2 libérés. Ce processus de la liaison récepteur-ligand se répète, ce qui entraîne le recrutement des couches supplémentaires de plaquettes et finalement, la formation d'un bouchon hémostatique.

Rôle des agonistes dans l'agrégation

La réponse de l'agrégation des plaquettes à un agoniste est amplifiée par la production de TXA2 à partir de phospholipides membranaires et par la sécrétion de l'ADP des granules denses : le TXA2 et l'ADP sont des agents agrégants et peuvent amplifier la réponse d'agrégation des plaquettes par l'interaction avec leurs récepteurs spécifiques.

Les agonistes forts provoquent directement l'agrégation plaquettaire, la synthèse de TXA2, et la sécrétion granulaire, alors que les agonistes faibles induisent directement l'agrégation plaquettaire sans déclencher la sécrétion même quand ils sont utilisés à des concentrations extrêmement élevées (Figure 10). Toutefois, la sécrétion plaquettaire peut parfois suivre l'agrégation induite par un agoniste faible lorsque la synthèse de TXA2 endogène est déclenchée par le contact étroit des plaquettes qui se produit au cours de l'agrégation plaquettaire^[92].

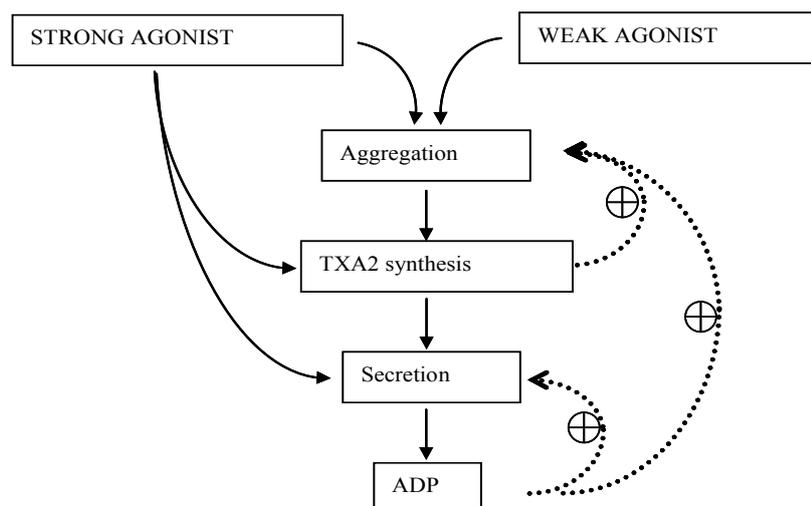


Figure 10. L'agrégation plaquettaire en réponse aux différents agonistes. L'agrégation plaquettaire est amplifiée par la production de TXA2 à partir de phospholipides membranaires et par la sécrétion d'ADP à partir des granules denses^[92].

L'agrégation des plaquettes est généralement étudiée par un agrégomètre à partir d'une suspension plaquettaire mise en contact avec des agonistes. Cet appareil mesure les changements de densité optique d'un plasma riche en plaquettes pendant les diverses étapes de leur activation.

Lorsque l'agrégation plaquettaire est stimulée par un agoniste faible à des concentrations critiques, la courbe d'agrégation a un aspect biphasique : une première vague d'agrégation (agrégation primaire réversible), suivie d'une agrégation secondaire, qui est généralement irréversible. Alternativement, l'agrégation primaire peut désagrèger si la sécrétion plaquettaire n'a pas été déclenchée entre-temps et l'agrégation secondaire ne se produit pas. À plus fortes concentrations pour des agonistes faibles, les deux vagues d'agrégation fusionnent en une vague unique et irréversible. L'agrégation plaquettaire induite par l'épinéphrine représente une exception à cette règle, étant donné que les deux vagues de l'agrégation plaquettaire (avec les plaquettes normales), ne fusionnent jamais en une seule vague, même lorsque l'épinéphrine est utilisée à très forte concentration.

La liaison du complexe GPIIb/IIIa au fibrinogène et les contacts entre plaquettes qui se produisent pendant la phase initiale de l'agrégation déclenchent des événements de signalisation spécifiques, résultant en des boucles d'amplification qui favorisent l'agrégation irréversible, la sécrétion, la rétraction du caillot^[104].

3.1.5 Régulations négatives de l'activation des plaquettes

Cette réaction hémostatique peut être intense et avoir des effets à distance de la brèche vasculaire. Plusieurs facteurs inhibiteurs servent à équilibrer l'activation des plaquettes et à empêcher le dépôt excessif de plaquettes. L'effet de dilution des substances activées thrombogènes par le flux sanguin est probablement le plus important. En outre, les cellules endothéliales synthétisent deux puissants inhibiteurs de l'activation plaquettaire, la prostacycline (PGI₂) et le monoxyde d'azote (NO).

La prostacycline

La prostacycline (également appelée prostaglandine I₂ ou PGI₂) est un membre de la famille des lipides appelée les eicosanoïdes. La principale action de la prostacycline est d'empêcher l'activation des plaquettes. C'est également un vasodilatateur efficace. La prostacycline a des effets opposés au TXA₂, ce qui suggère un mécanisme homéostatique entre ces deux hormones en réponse à une lésion de l'endothélium d'un vaisseau sanguin. Comme le montre la Figure 11, la PGI₂ et le TXA₂ ont des

propriétés mutuellement antagonistes sur la plaquette et sur la cellule musculaire lisse de la paroi vasculaire.

L'inhibition est initiée par la liaison de la PGI₂ à son récepteur spécifique couplé à la protéine G. Cette interaction entraîne l'activation de l'adénylate cyclase, qui à son tour catalyse la production d'AMPc à partir d'ATP. L'effecteur principal en aval de l'AMPc est la PKA, dont les fonctions sont de phosphoryler un grand nombre de protéines sur leurs résidus sérine ou thréonine et ainsi de réguler négativement diverses fonctions plaquettaires^[105].

Un taux augmenté en nucléotides cycliques est capable d'inhiber l'élévation du taux de Ca²⁺ intracellulaire à partir des stocks internes, d'une part en empêchant la resynthèse du substrat de la PLC, le PI(3,4)P₂ et d'autre part en permettant la phosphorylation des récepteurs à l'IP₃ inhibant la libération de calcium à partir du système tubulaire dense^[106, 107].

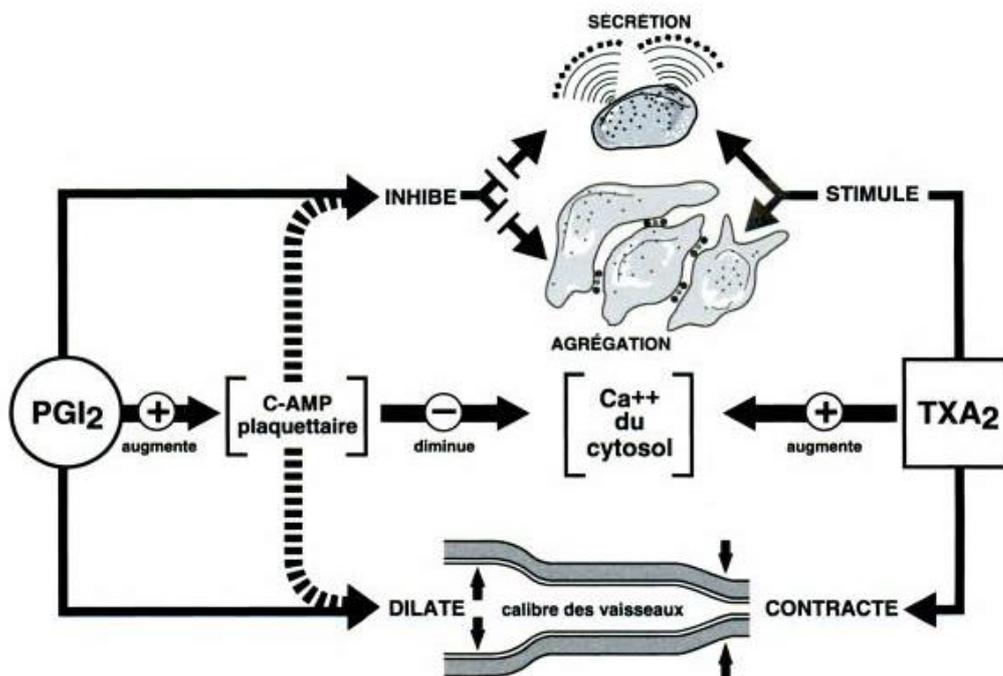


Figure 11. Antagonisme de la PGI₂ et le TXA₂^[21].

Le niveau basal de la prostacycline est probablement trop faible pour influencer la formation d'agrégats plaquettaires, mais les cellules endothéliales activées produisent beaucoup plus de prostacycline. Les plaquettes activées peuvent aussi faciliter la synthèse de prostacycline par

production et libération des endoperoxydes intermédiaires (PGG₂, PGH₂), qui peuvent être capturés par les cellules endothéliales. L'endothélium transforme les PGG₂ et PGH₂ de provenance plaquettaire en PGI₂ et sécrète celle-ci dans le plasma ambiant. En outre, les plaquettes activées peuvent libérer des microparticules qui transfèrent l'acide arachidonique vers les cellules endothéliales^[108]. Ainsi, la prostacycline peut contribuer de manière significative à l'inhibition plaquettaire aux sites de lésion^[109].

En plus de la PGI₂, d'autres prostaglandines (PGE₁ et PGE₂) ont également un rôle inhibiteur pour l'activation des plaquettes et leur mode d'action est similaire à celle de la PGI₂^[110].

Le monoxyde d'azote (formule NO)

Le monoxyde d'azote est synthétisé par les cellules endothéliales, les plaquettes et d'autres cellules. La formation de NO est augmentée sous l'action des agonistes plaquettaires et il diffuse facilement dans les plaquettes^[111]. De même que la PGI₂ ou la PGE₂, NO inhibe l'activation des plaquettes et l'agrégation plaquettaire. Toutefois, NO active la guanylate cyclase et donc augmente le GMPc au lieu de l'AMPc^[112]. Il en résulte alors le maintien d'une concentration cytoplasmique basse en Ca²⁺ et une diminution consécutive de l'activité de la PLC qui intervient dans le métabolisme des phospholipides. NO et PGI₂ agissent en synergie pour inhiber l'activation plaquettaire^[109].

3.2 LES PLAQUETTES ET LA COAGULATION

Les plaquettes jouent un rôle crucial dans l'activation et la régulation de la coagulation par plusieurs mécanismes, dont l'exposition de surface procoagulante, la formation des microparticules et la sécrétion de facteurs de coagulation.

Par ses surfaces phospholipidiques procoagulantes, la plaquette participe à la formation des puissants complexes enzymatiques coagulants. La double valence de Ca²⁺ lui permet de lier les charges négatives des aminophospholipides membranaires aux charges négatives de facteurs de coagulation, en particulier, les quatre protéines de coagulation vitamine K-dépendantes (facteurs II, VII, IX et X). Ainsi, ces ponts calciques fixent les enzymes et pro-enzymes plasmatiques à la surface plaquettaire dans une position stratégique, ce qui accélère la génération de thrombine^[113]. La thrombine ainsi générée va activer davantage les plaquettes, conduisant à plus de dégranulation.

La surface plaquettaire empêche l'antithrombine III de neutraliser les enzymes IXa, Xa, et IIa.

Les plaquettes sécrètent certains facteurs de coagulation stockés dans leurs granules alpha, notamment le facteur V et le fibrinogène. Le FV libéré par les plaquettes contribue à 20% du total plasmatique, et le FV est relativement protégé de l'inactivation par la protéine C activée lorsqu'il est liée à la membrane des plaquettes^[114].

Capturé par les récepteurs GPIIbIIIa de la surface plaquettaire, le fibrinogène provoque l'agrégation plaquettaire et est ensuite transformé en fibrine qui renforcent le clou plaquettaire et contribue également à la rétraction du caillot plaquettaire. Le vWF protège et transporte le facteur VIII; il facilite son activation et la localisation stratégique du facteur VIIIa au niveau du foyer d'hémostase primaire^[21]. Le fibrinogène et le complexe vWF-FVIII créent ainsi des points de jonction entre l'hémostase primaire et la coagulation.

3.3 LES PLAQUETTES ET LA FIBRINOLYSE

Le rôle des plaquettes dans la fibrinolyse reste encore à élucider. La plaquette contient certaines protéines dont leur fonction est liée à la fibrinolyse. PAI-1, α 2-antiplasmine et FXIII sont antifibrinolytiques, tandis que plasminogène est fibrinolytique^[115].

Néanmoins, la séquence temporelle et l'équilibre final de ces fonctions plaquettaires sont actuellement inconnus.

3.4 LES PLAQUETTES ET LA THROMBOSE

Il est de plus en plus reconnu que les plaquettes sont au moins partiellement responsable pour le développement pathologique de l'athérombose^[116].

La stimulation des plaquettes par des agents thrombolytiques peut prolonger le temps nécessaire pour la reperfusion et peut contribuer à une réocclusion après reperfusion obtenue^[117]. En fait, antiagrégants plaquettaires puissants peuvent accélèrent la reperfusion, prévenir la réocclusion, et diminuer la surface de l'infarctus du myocarde^[118].

La contribution des plaquettes à la formation du thrombus est fortement dépendante de la location. La thrombose veineuse est largement due aux changements dans la composition de la coagulation, tandis que dans les plaquettes jouent un rôle essentiel dans l'établissement des thrombi dans les petits artérioles où le débit élevé se oppose à l'accumulation de facteurs de coagulation activés limitant ainsi la formation de fibrine^[119]. La compréhension du rôle complexe des plaquettes dans la

formation de thrombus aidera à la conception de médicaments antithrombotiques plus efficaces et spécifiques^[120].

3.5 DIVERSES FONCTIONS DES PLAQUETTES

Les plaquettes sont également impliquées dans de nombreux processus physiopathologiques :

- Inflammation

Les plaquettes peuvent majorer la réaction inflammatoire par par sécrétion de facteurs pro-inflammatoires et l'interaction avec les leukocytes via P-sélectine et par la synthèse des prostaglandines.

- Immunologique

Les plaquettes ont à leur surface un récepteur pour les IgE. Elles peuvent être activées par les complexes Ag/Ac.

- Métastase des cancers

Les plaquettes forment des microthrombi autour des cellules malignes, favorisant à la fois leur immobilisation et leur pénétration dans les tissus. Les cellules tumorales sécrètent des facteurs stimulant l'angiogenèse.

- Action sur la paroi vasculaire

Les plaquettes sécrètent le PDGF, stimulant de la prolifération des fibres musculaires lisses.

4. EXPLORATION BIOLOGIQUE DES PLAQUETTES

4.1 INTRODUCTION

Les plaquettes jouent un rôle pivot dans l'hémostase primaire ce qui nécessite l'intégralité de leurs fonctions. L'existence d'anomalies quantitatives ou qualitatives des plaquettes, qu'elles soient constitutionnelles ou acquises, peut être à l'origine d'un risque hémorragique augmenté ou à l'inverse de manifestations thrombotiques. L'exploration biologique des plaquettes a pour objectif principal en pratique clinique^[1, 2] :

- d'identifier les causes potentielles des syndromes hémorragiques (thrombopénie ou thrombopathie) ;
- de surveiller le traitement hémostatique dans le cadre d'une chirurgie ;
- d'évaluer biologiquement l'efficacité d'un traitement anti-plaquettaire ;
- de rechercher une hyperréactivité plaquettaire chez des malades à risque de thrombose ;
- de contrôler la qualité des concentrés plaquettaires.

Dans ce chapitre, nous présentons essentiellement des tests permettant d'identifier les fonctions plaquettaires altérées définissant la thrombopathie.

4.2 DEMARCHE INITIALE

Avant de mettre en route une exploration biologique des plaquettes, il est important de faire un interrogatoire et une observation clinique, car ils permettent une première orientation diagnostique. C'est une étape cruciale. Bien menée, elle peut être considérée comme un des meilleurs « tests » de dépistage du risque hémorragique^[121].

L'interrogatoire et l'observation clinique permettent de mettre en évidence :

- les antécédents hémorragiques personnels du patient, une notion de maladie héréditaire, les caractéristiques du syndrom hémorragique (conditions d'apparition, fréquence, type cutanéomuqueux, gravité, intervention),
- les symptômes dysmorphiques associés qui évoquent des syndromes congénitaux,
- le contexte médical général du patient ou toute pathologie susceptible d'entraîner une anomalie

de l'hémostase primaire (malnutrition, maladie hématologique, insuffisance hépatique, insuffisance rénale...),

- la prise récente des médicaments qui interfèrent avec les fonctions plaquettaires, par exemple, des inhibiteurs plaquettaires (l'aspirine, tirofiban, abciximab...), des antidépresseurs de type inhibiteur sélectif de la recapture de la sérotonine (ISRS), des antibiotiques (céphalosporines), etc.

4.3 LA NUMERATION PLAQUETTAIRE, VOLUME

PLAQUETTAIRE MOYEN (VPM), PLAQUETTES RETICULEES

4.3.1 Principe de la numération plaquettaire

La numération plaquettaire est aujourd'hui largement automatisée, réalisée à l'aide d'analyseurs cellulaires. Le sang est habituellement recueilli dans des tubes contenant un anticoagulant recommandé, éthylène diamine tétra-acétique (EDTA)^[122]. Un autre anticoagulant, le citrate, peut également être utilisé, notamment indiqué lors d'une pseudothrombopénie induite par l'EDTA. Les analyseurs utilisent différentes méthodologies, soit par impédance (e.g., K-1000, XE 2100 et XN, Sysmex; LH750, Beckman Coulter), par analyse optique (Advia 120 et ADVIA 2120, Bayer; Cell-Dyn 4000, Abbott) ou par détection immunologique (e.g., Cell-Dyn 4000, Abbott)^[2, 123, 124].

Les limites de la méthode par impédancemétrie sont bien connues, notamment sa difficulté à compter les plaquettes de taille augmentée et à les distinguer des microcytes^[125]. La méthode optique permet de prendre en compte les grandes plaquettes et de rendre une numération plus précise en cas de macrothrombocytémie^[126]. Le comptage par méthode immunologique a été limité en raison de son coût élevé lié à l'utilisation des anticorps spécifiques, bien qu'il soit la méthode de référence. Toutefois, il devrait être utilisé lorsqu'un comptage précis est nécessaire (e.g., macrothrombocytémie, décision d'une transfusion)^[126].

4.3.2 Facteurs interférents avec la numération plaquettaire

Plusieurs facteurs étant susceptibles d'interférer avec les plaquettes, la validation biologique d'une numération plaquettaire, notamment d'une thrombopénie, nécessite une attention particulière à toutes les étapes du processus analytique^[127].

En présence d'une thrombopénie, il faut d'abord écarter tout artefact technique lié à une

agglutination ou un phénomène de satellitisme des plaquettes en présence d'EDTA^[128]. Ceci doit être exclu par examen microscopique d'un frottis sanguin. En pratique, il est souvent possible d'obtenir la numération plaquettaire en utilisant d'autres anticoagulants tout en tenant compte des dilutions : citrate trisodique, ACD, oxalate de potassium ou héparine. En outre, les plaquettes géantes ne sont pas comptabilisées car faussement considérées comme des globules rouges par des automates, ce qui entraîne une sous-estimation de la numération plaquettaire. A l'inverse, la numération des plaquettes peut être surestimée en cas de schistocytose ou en présence de cryoglobuline.

4.3.3 Rôle de la numération plaquettaire

La détermination de la numération plaquettaire constitue une étape importante de l'exploration biologique des patients avec hémorragies excessives. Un résultat normal élimine la possibilité de thrombopénie comme cause de saignement et permet d'assurer que les tests fonctionnels plaquettaires ultérieurs ne vont pas être affectés par une thrombopénie. En effet, une faible numération plaquettaire affecte un grand nombre de tests fonctionnels des plaquettes discutés ci-dessous sauf la cytométrie en flux^[123, 129].

4.3.4 VPM

Outre la numération plaquettaire, l'automate mesure également le volume plaquettaire moyen (VPM) ; ce paramètre est déduit de la courbe de répartition de la taille des plaquettes.

Les valeurs du VPM sont affectées par des facteurs pré-analytiques (anticoagulant, délai d'analyse) et des facteurs analytiques impliquant essentiellement le principe de fonctionnement des automates^[130]. Il est à noter que chaque constructeur d'automate limite le calcul du volume des plaquettes à celles qui sont comprises dans leur zone d'analyse, ce qui peut expliquer des variations de mesure de VPM en fonction des hématimètres^[130, 131]. De plus, la présence des microagrégats plaquettaires majore artificiellement le VPM. Pour les automates de principe impédancemétrie, la présence de plaquettes géantes entraîne une absence de répartition logarithmique avec soit l'arrêt brut de la courbe sans possibilité de lissage (LH750), soit l'absence de retour de la courbe à la ligne de base (XE2100, XE2000i). Dans ces situations des alarmes de type « grandes plaquettes » ou « agrégats plaquettaires » sont associées. La valeur du VPM est alors soit non rendue, soit rendue et fausse^[131].

4.3.5 Les plaquettes réticulées

De nos jours, seuls quelques analyseurs d'hématologie (e.g. XE 2100, XN Sysmex) peuvent détecter les plaquettes réticulées. Ce sont des plaquettes circulantes contenant de l'ARN, que l'on met en évidence par la coloration avec le thiazole orange ou d'autres colorants pour les acides nucléiques et la mesure par cytomètre en flux. Il s'agit des plaquettes jeunes, équivalentes aux réticulocytes pour les hématies, représentant un paramètre pour l'estimation de la capacité de régénération des plaquettes.

4.4 FROTTIS SANGUIN

L'examen morphologique des plaquettes constitue une étape importante dans la validation biologique d'une thrombopénie avec ou sans anomalie de la courbe de répartition de taille des plaquettes^[123].

En pratique quotidienne, le frottis sanguin se fait à partir d'un tube de sang prélevé en présence d'EDTA et coloré au May-Grünwald Giemsa (MGG), Wright ou Wright-Giemsa. Les frottis doivent être réalisés le plus rapidement possible après le prélèvement. En effet il est connu que le contact de plaquettes en présence d'EDTA est susceptible d'entraîner un gonflement des plaquettes temps-dépendant^[132]. La morphologie plaquettaire doit être appréciée attentivement au microscope optique sur frottis sanguin qui permet également de rechercher les anomalies morphologiques des autres lignées hématopoïétiques^[133].

Sur l'étalement sanguin, les plaquettes sont des cellules anucléées, hétérogènes en taille et forme, souvent arrondis ou ovalaires, de 2-3 μm de diamètre. Cette anisocytose est physiologique. Le cytoplasme renferme des granulations azurophiles ou pourpres (seuls les granules α sont colorés au MGG) disposées régulièrement ou regroupées en position centrale (granulomère), et un liseré clair périphérique agranulaire (hyalomère). 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. En fonction de leur taille, les plaquettes sont classées en plusieurs types : plaquettes normales, plaquettes de petite taille (nommées également microplaquettes), plaquettes de grande taille (macroplaquettes), et plaquettes géantes (de taille supérieure à celle des hématies).

L'examen du frottis sanguin en hémostase a trois objectifs principaux :

1. de confirmer ou non la numération plaquettaire obtenue par analyseur d'hématologie ;
2. de rechercher un biais d'analyse plaquettaire : agglutinats plaquettaires, phénomène de satellisation des plaquettes autour des neutrophiles, plaquettes de très grande taille, etc ;
3. d'observer des anomalies morphologiques pouvant orienter vers une thrombopathie, par exemple, absence des granules alpha dans le syndrome des plaquettes grises, macroplaquettes et plaquettes géantes associées à des inclusions leucocytaires dans les syndromes MYH9, un granule α géant unique dans le syndrome Paris-Trousseau, ou bien la présence de nombreux schizocytes associés à une thrombopénie suggérant une anémie hémolytique avec microangiopathie.

4.5 EPREUVES GLOBALES

Comme certains déficits de la voie de coagulation et du vWF peuvent interférer les fonctions plaquettaires, il est recommandé que les tests globaux des fonctions plaquettaires soient effectués en même temps que des analyses globales de la coagulation et du vWF^[2, 123]. Les recommandations pour l'exploration de la maladie de Willebrand et des facteurs de coagulation ont été publiées^[134, 135] et ces tests ne seront pas discutés ici.

Les tests les plus pratiqués pour le dépistage des thrombopathies sont le temps de saignement et le temps d'occlusion de PFA-100[®] (*Platelet Function Analyser*; Siemens Diagnostics)^[123].

4.5.1 Temps de saignement

Le temps de saignement constitue un test global *in vivo* de l'hémostase primaire. Historiquement, le temps de saignement (TS) a été décrit par Milian en 1901. Une première standardisation a été faite par Ivy « Ivy trois points » puis une variante « Ivy incision » a été proposée : elle constitue la méthode de référence de TS^[136].

Cette méthode consiste à pratiquer une incision sur la face antérieure de l'avant-bras, standardisée par l'emploi de dispositifs à usage unique (Simpletate[®], Surgicut[®]) et par le maintien d'une pression constante de 40 mmHg au niveau du bras pendant 60 secondes. Après incision, l'écoulement sanguin est absorbé par un papier buvard toutes les trente secondes, sans toucher la plaie. Le TS exprimé en minutes est défini par le temps nécessaire à l'arrêt de l'hémorragie. Ce paramètre peut être considéré comme normal jusqu'à 10 minutes^[2].

Malgré des efforts faits sur la standardisation, le temps de saignement est opérateur dépendant, influencé par des variables du patient et peu reproductible^[121, 136]. Le temps de saignement est normal dans un pourcentage appréciable de déficits légers de l'hémostase primaire. Il a été montré qu'il n'y a pas de corrélation entre le TS et le nombre plaquettaire et surtout, ce paramètre n'est pas prédictif du risque hémorragique. En fait, le TS se révèle moins performant qu'un interrogatoire détaillé dans la prédiction d'un risque hémorragique. Le TS n'est pas non plus fiable pour détecter une prise d'aspirine (ou assimilés) ou une thrombopathie d'origine iatrogène^[121]. De plus, le test est invasif. Compte tenu de ces considérations, il n'est plus conseillé dans les recommandations nationales^[137] ou internationales^[123, 138]. En pratique, le temps de saignement est de plus en plus remplacé par d'autres tests plaquettaires.

4.5.2 Temps d'occlusion plaquettaire (TOP)

Un analyseur (PFA-100[®]) permettrait de mesurer « un temps de saignement *in vitro* ». Il a été décrit en 1995^[139] et depuis, les divers aspects du test ont été étudiés^[140-142]. Les recommandations sur la pratique et l'utilité du PFA-100[®] dans le diagnostic des pathologies plaquettaires ont été publiées par de diverses organisations internationales^[143, 144].

D'un point de vue technique, du sang total prélevé sur tube citraté est aspiré dans des conditions rhéologiques standardisées à travers un capillaire qui débouche sur une membrane recouverte de collagène ainsi que d'un activateur plaquettaire : l'épinéphrine ou l'ADP. Il existe donc deux TOP en fonction des agonistes utilisés : CEPI (collagène/épinéphrine) et CADP (collagène/ADP). La membrane est pourvue d'un orifice et le sang ainsi aspiré est soumis à des taux de cisaillement élevés. Ces agonistes déclenchent l'adhérence, l'activation et l'agrégation plaquettaires, conduisant à une occlusion rapide de l'ouverture et à la cessation de flux de sang. L'ensemble propose donc de reproduire *in vitro* le comportement du sang dans un vaisseau de petit diamètre lésé, la membrane faisant office de matrice extracellulaire. La fonctionnalité de ces plaquettes est appréciée en fonction du temps d'occlusion.

La connaissance de la numération formule sanguine est essentielle pour l'interprétation des résultats du PFA-100. La thrombopénie ($< 100 \times 10^9/L$) et l'anémie (hématocrite $< 20\%$) se traduisent souvent le prolongement de TOP^[139, 140]. Le TOP est également corrélé inversement proportionnelle à l'activité de VWF plasmatique chez les sujets normaux et peut donc être plus longue chez les

patients du groupe sanguin O^[145].

Cette technique a été validée dans différentes indications, notamment le dépistage de la maladie de Willebrand. Le TOP est un paramètre très sensible au facteur Willebrand puisqu'il est allongé dans presque la totalité des cas de maladies de Willebrand, exception faite du type 2N^[146].

Concernant les plaquettes, le TOP est sensible aux thrombopénies inférieures à 80 G/L, mais il ne semble pas exister de corrélation entre le chiffre plaquettaire et l'allongement du paramètre. Des anomalies de TOP sont facilement observées dans des déficits plaquettaires importants tels que la thrombasthénie de Glanzmann, le syndrome de Bernard-Soulier et la maladie de von Willebrand de type plaquettaire^[140]. Dans de nombreuses thrombopathies moins graves, le TOP peut être soit normal ou légèrement prolongé. Il n'est pas possible actuellement de déterminer avec précision la sensibilité de PFA-100[®] pour la plupart des thrombopathies, parce que la majorité des études rapportées ont inclus un petit nombre de patients, avec des pathologies plaquettaires différentes^[1]. Le PFA-100[®] consiste un test de dépistage relativement optimal, mais les résultats doivent être interprétés avec prudence et dans le contexte clinique, car le test n'est spécifique ni sensible pour les thrombopathies modérées^[123].

4.6 TESTS D'ADHERENCE DES PLAQUETTES

In vivo, les plaquettes adhèrent à la matrice extracellulaire en présence d'autres cellules sanguines et dans des conditions de cisaillement élevées. Par conséquent, un test d'adhérence optimal devrait comprendre l'interaction de sang total avec des composants adhésifs en phase solide dans des conditions hémorrhéologiques physiologiques. Plusieurs systèmes d'adhérence en flux ont été développés^[147-150]. Un test simple pour évaluer l'adhérence plaquettaire est de compter les plaquettes avant et après le passage du sang hépariné à travers une colonne remplie de billes de verre. Cependant, la plupart des tests ne peuvent pas simuler les conditions physiologiques de l'adhésion plaquettaire *in vivo*, donc ils sont mal corrélés avec l'activité hémostatique *in vivo*^[151].

Savion *et al.*^[152, 153] ont développé un automate CPA (cone and plate(let) analyzer) pour mesurer l'adhérence et l'agrégation plaquettaires en présence de composés de la matrice extracellulaire (ECM), en utilisant le sang total exposé à des conditions de cisaillement élevé. Récemment, le CPA a été développée en un instrument commercial automatisé appelé IMPACT (Diamed, Suisse) et utilise maintenant des plaques de polystyrène au lieu de l'ECM.

Une petite quantité de sang total citraté (120-200 μL) est ajoutée dans un puits en polystyrène. Les protéines plasmatiques comme le vWF ou le fibrinogène adhèrent à la surface. Par la suite, une rotation de cône Teflon induit un flux laminaire (1800-2000 s^{-1}) pendant 2 minutes pour fournir un cisaillement uniforme conduisant à l'adhérence et à l'agrégation des plaquettes. Et puis, les puits sont colorés (généralement avec une solution de May-Grünwald) et observés au microscope optique. L'analyse par caméra couplée à l'ordinateur, permet la quantification de l'adhérence ainsi qu'une étude morphométrique des plaquettes et des agrégats. En moins de dix minutes, l'analyse détermine plusieurs paramètres : (1) le pourcentage de la surface du puits recouvert par les agrégats plaquettaires, (2) la taille moyenne des agrégats en μm^2 , et (3) un histogramme de distribution de plaquettes adhérentes. Aucune adhérence plaquettaire se produit dans des échantillons provenant de patients atteints de thrombasthénie de Glanzmann ou d'afibrinogénémie. Pour l'instant, le système n'est pas encore largement disponible et son utilité clinique reste à évaluer^[2, 115].

4.7 L'ETUDE DE L'AGREGATION PLAQUETTAIRE

L'agrégométrie spectrophotométrique (Light Transmission Aggregometry, LTA), inventée par Born^[154] et O'Brien^[155], reste l'un des tests diagnostiques les plus importants pour les thrombopathies^[123, 129]. Malgré son utilisation répandue, le test est mal standardisé et il existe de grandes variations des pratiques entre laboratoires^[156]. Les recommandations pour l'étude de l'agrégation plaquettaire ont récemment été publiées^[138, 157]. Tous les aspects techniques de ce test ont été discutés de façon précise avec des informations bien détaillées, y compris les intérêts cliniques, les facteurs de variation préanalytiques, la préparation des échantillons, la diversité des équipements et réactifs, les concentrations et les types d'agonistes, le processus de réalisation, et l'interprétation des résultats, entre autres. A noter qu'il existe certaine variation entre les recommandations provenant de différentes organisations^[129], par exemple, une différence sur les concentrations d'agonistes (Tableau IX).

Tableau IX. Comparaison des recommandations sur les agonistes et les concentrations à tester^[129].

Clinical laboratory practice ³⁸	Final concentration for LTA—Median (range)	Recommended final concentration by guideline	
		North American ³⁷	CLSI ⁴⁰
ADP (100%)	5.0 (0.2–200) μ M	2–10 μ M	0.5–10 μ M, typically 5 to start
Collagen			
Type I (78%)	2.0 (0.08–100) μ g/mL type I	Low concentration that detects impaired platelet function from aspirin and other cyclooxygenase-1 inhibitors	1–5 μ g/mL type I, typically 2 μ g/mL to start
Bovine (16%)	190 (50–200) μ g/mL bovine		
Ristocetin			
Low concentration (80%)	0.5 (0.25–2.5) mg/mL	0.5–0.6 mg/mL	\leq 0.6 mg/mL
High concentration (82%)	1.5 (0.6–5.0) mg/mL	1.2–1.5 mg/mL	0.8–1.5 mg/mL
Arachidonic acid (82%)	1.36 (0.125–16) mM	0.5–1.64 mM	Single concentration between 0.5 and 1.6 mM
Epinephrine (72%)	7 (0.1–1500) μ M	5–10 μ M	0.5–10 μ M, typically 5 μ M to start
Thromboxane analogue U46619 (15%)	1.0 (0.05–40) μ M	1.0 μ M (QMPLS)	1–2 μ M

QMPLS indicates a specific recommendation of the Quality Management Program Laboratory Systems in Ontario.³⁷

4.7.1 Principe

L'étude *in vitro* de l'agrégation plaquettaire est réalisée à 37 °C dans un agrégomètre. Les plaquettes en suspension dans le plasma (plasma riche en plaquettes, PRP) sont agitées par un barreau magnétique qui virevolte sur lui-même à vitesse de 1100 rpm, et mises en contact avec un agoniste (ou agglutinant la ristocétine). L'agrégomètre mesure le changement de densité optique du PRP pendant les diverses étapes de l'activation plaquettaire. Lors de l'addition d'un agoniste, les plaquettes sont activées et subissent un changement de forme de discoïde à sphérique avec de nombreux pseudopodes, ce qui est associé à une augmentation transitoire de la densité optique et mise en évidence par une déviation négative de la courbe. Le tracé d'agrégation est calibré entre 0% et 100%, 0% correspondant à la PRP et 100% pour le PPP. Le tracé d'agrégation devrait être enregistré pendant au moins 5 minutes, mais de préférence 10 min. L'interprétation de ces courbes tient en compte de plusieurs paramètres : la phase de latence, changement de forme plaquettaire, la vitesse ou pente d'agrégation, l'agrégation primaire et secondaire, la réversibilité et l'amplitude maximale de l'agrégation^[2, 157].

4.7.2 Agonistes

Les différents activateurs utilisés visent à explorer les différentes voies d'activation des plaquettes. L'ADP, l'adrénaline, le collagène, l'acide arachidonique et la ristocétine sont le panel d'agonistes traditionnels pour l'agrégation plaquettaire^[123]. Un panel étendu d'agonistes peut inclure la thrombine, le TRAP (*Thrombin Receptor Activating Peptides*), le CRP (*Collagen Related Peptides*), l'endoperoxyde analogue (ou thromboxane A2 analogue)-U46619, et l'ionophore de calcium A23187, qui peuvent être utiles lorsque une enquête plus approfondie de la nature exacte du déficit

est requise^[123]. Le Tableau X illustre les panels d'agonistes recommandés ainsi que leurs récepteurs. D'autres concentrations et/ou agonistes peuvent être trouvées dans les références de recommandations citées précédemment.

Tableau X. Le panel de base et le panel étendu d'agonistes recommandés par Harrison *et al*^[123].

Agonist	Recommended starting concentrations in PRP	Range of final concentrations in PRP	Receptor targets
Baseline panel			
ADP	2.5 µmol/l	0.5–2.0 µmol/l	P2Y ₁ and P2Y ₁₂
Epinephrine	5 µmol/l	0.5–1.0 µmol/l	Adrenoreceptors
Arachidonic acid	1 mmol/l	0.5–1.0 mmol/l (single dose)	Testing Thromboxane generation and TX receptor
Collagen (type I tendon)	1.25 µg/ml	1.0–5.0 µg/ml	GpVI and GpIa/IIa receptors
Ristocetin	1.2–1.5 mg/ml	1.2–1.5 and 0.5–0.7 mg/ml (single doses)	GpIb/VWF axis
Extended panel			
Gamma-thrombin		50–200 ng/ml	Thrombin receptors but without clotting
U-46619		1.0 µmol/l single dose	Thromboxane receptor (TPα)
Collagen-related peptide Convulxin		10–1000 ng/ml 1–1000 ng/ml	GpVI stimulation
TRAP peptides		SFLLRN (PAR-1) 10–100 µmol/l AYPGKF (PAR-4) 100–500 µmol/l	PAR-1 and PAR-4
Calcium ionophore – A23187		1.25–10 µmol/l	Calcium mobilization and procoagulant function
Phorbol 12-myristate 13 acetate		30 nmol/l	Protein kinase C

Comme mentionné précédemment dans le chapitre « Fonctions des plaquettes », les agonistes peuvent être subdivisés en deux groupes en fonction de leur capacité à induire directement la production de TXA₂ et la sécrétion d'ADP^[92] : agonistes forts et faibles. TXA₂ et ADP sont des agents agrégants et peuvent amplifier la réponse d'agrégation des plaquettes par interaction avec leurs récepteurs spécifiques. Ainsi, il existe en fonction des agonistes et de la concentration utilisée, des profils d'agrégation typiques^[138].

Collagène

Le tracé induit avec le collagène est caractérisé par une phase prolongée de latence (jusqu'à 1 min) suivie d'un changement de forme (déviations légèrement négatives) puis suivie d'une agrégation rapide et irréversible. Une faible concentration de collagène est utilisée pour détecter la fonction plaquettaire altérée à cause des inhibiteurs de la cyclooxygénase-1 (COX-1).

ADP

ADP est un agoniste faible par rapport au collagène ou à la thrombine. Mais à des concentrations de supérieure à 1-3 μM , l'ADP provoque un changement de forme initiale et une agrégation irréversible suivie par une phase secondaire. Cette agrégation biphasique dépend de la formation suffisamment de TXA2 et ensuite de la libération d'ADP plaquettaire. Des doses plus faibles peuvent être utilisées pour déterminer le seuil pour l'agrégation secondaire.

Epinéphrine

Épinéphrine entraîne une réponse biphasique classique (agrégation primaire et secondaire), sans changement de forme. Il est à noter qu'une proportion significative d'échantillons normaux ne peuvent pas donner toujours une réponse d'agrégation complète à l'épinéphrine (en raison de variations naturelles du nombre de récepteurs adrénergiques) et n'ont aucun défaut plaquettaire associé.

Acide arachidonique

L'acide arachidonique agit comme un agoniste après la conversion en TXA2. La réponse d'agrégation à l'acide arachidonique consiste en un changement de forme suivi par une agrégation complète. Si l'agrégation à l'acide arachidonique est anormale, un test supplémentaire doit être effectué avec TXA2 analogue-U46619 pour détecter des anomalies du récepteur de TXA2.

Ristocétine

La ristocétine ne devrait pas être considéré comme un agoniste, car elle induit l'agglutination des plaquettes, un processus passif au cours duquel les plaquettes forment des amas par interactions GPIb-vWF sans être activées, ce qui explique l'absence de changement de forme précédant l'augmentation de la transmission lumineuse induite par la ristocétine. Lorsque l'agglutination des plaquettes atteint un niveau critique, les plaquettes synthétisent et libèrent le TXA2, ce qui induit la sécrétion et amplie l'agrégation plaquettaire. Cependant, il faut noter que la synthèse de TXA2 n'est pas déclenchée par la ristocétine directement, mais par le contact plaquette-plaquette étroit qui est provoqué par agglutination des plaquettes. Le phénomène est également observé avec les agonistes « faibles » ou agonistes « forts » à des concentrations critiques. Seulement les fortes concentrations de ristocétine provoquent une réponse d'agglutination complète chez les sujets sains. La ristocétine est utile pour diagnostiquer le syndrome de Bernard-Soulier (BSS) et certaines formes de maladie de Willebrand (VWD).

Un panel élargi d'agonistes, qui ne sont généralement disponibles que dans les centres plus spécialisés, pourraient également être envisagés, y compris la gamma-thrombine (qui ne provoque pas de coagulation), TRAPs (SFLLRN pour récepteur PAR-1 et AYPGKF pour PAR-4 si la réponse anormal à la gamma-thrombine), le CRP, l'ionophore de calcium et le PMA (phorbol 12-myristate 13 acetate) lorsque sont suspectés respectivement des anomalies sur les récepteurs de la thrombine, la GPVI, la mobilisation du calcium et la PKC (*protein kinase C*). Les profils typiques d'agrégation plaquettaire pour certaines thrombopathies ont été publiés^[2, 123].

Outre l'étude des fonctions plaquettaires, l'agrégométrie est également utilisée pour l'exploration du facteur Willebrand et pour le diagnostic biologique des thrombopénies induites par l'héparine.

Des méthodes alternatives pour mesurer l'agrégation plaquettaire dans le PRP ou le sang total ont été développées, par exemple agrégométrie par impédance, agrégométrie en plaque de 96 puits, agrégométrie par cytométrie en flux^[158-161]

4.8 TESTS POUR LA DETECTION DES GRANULES DENSES

Les tests qui quantifient les granules denses plaquettaires (par exemple examen par microscopie électronique), leur contenu (par exemple, les essais de nucléotides et sérotonine) ou leur libération (par exemple, les dosages de l'adénosine triphosphate sécrétée ou la libération de sérotonine radioactive) permettent de détecter différents aspects de la fonction plaquettaire^[115, 162].

4.8.1 Dosage d'ATP sécrétée par les plaquettes par luminescence (Test à la luciférine-luciférase)

Le test le plus simple et le plus utilisé pour l'évaluation de nucléotides sécrétés par les plaquettes est le dosage d'ATP sécrétée par luminescence (lumi-agrégomètre).

La méthode a été introduite par Feinman^[163] et Ingerman^[164]. Les différents aspects de la technique ont été rapportés dans plusieurs études^[165-167].

Principe

Cet appareil (Lumi-agrégomètre, Chrono-Log Corporation) permet de mesurer la sécrétion plaquettaire en parallèle avec l'agrégation plaquettaire. La méthode est basée sur la détermination bioluminescente de l'ATP qui est libérée à partir de granules denses des plaquettes activées par un agoniste. L'ATP réagit avec la luciférine sous l'action catalytique de la luciférase; la réaction est

suivie par une decarboxylation oxydative de la luciférine, résultant en l'émission de lumière (Figure 12). Pour la mesure de l'agrégation, l'appareil utilise une diode émettant de la lumière (LED) dans la gamme infrarouge, qui est détectée par un photodétecteur, alors que, pour la mesure de luminescence résultant de l'ATP sécrétion, il utilise un PMT (tube photomultiplicateur) situé à 90 degrés par rapport au chemin de la lumière LED. La quantité de l'ATP libéré est facilement déterminée par l'adjonction d'un étalon interne d'ATP en fin de réaction dans le même canal de l'agrégomètre^[123, 163] ou par comparaison à une courbe d'étalonnage^[165]. La mesure de l'ATP en utilisant la réaction de luciférine-luciférase peut également effectuée avec un autre agrégomètre (*whole blood aggregometry*)^[168]. A noter que seule l'ATP dans le pool intragranulaire est sécrétée et mesurée, le pool métabolique reste dans le cytoplasme. En outre, cette méthode ne permet toutefois pas la mesure des autres adénylates phosphates plaquettaires, ADP et AMP, libérés au cours de la phase sécrétoire. L'adjonction d'enzymes de conversion appropriées, pyruvate et adénylate kinase, pourrait permettre cette évaluation^[165], ce qui n'est pas habituellement réalisé.

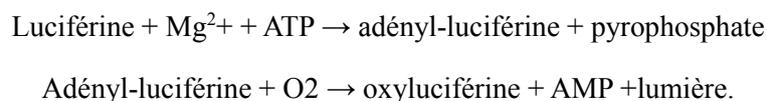


Figure 12. Principe de la méthode de mesure de l'ATP plaquettaire^[165]. La luciférase permet la combinaison réversible de l'ATP, substrat limitant la réaction enzymatique avec la luciférine : la réaction est déplacée par oxydation du complexe formé en présence d'oxygène moléculaire. Le dérivé oxydé instable formé se transforme en un composé stable avec libération d'AMP et émission de photons.

Un grand avantage de la technique est de permettre de suivre en parallèle l'agrégation et la sécrétion surtout la cinétique de la sécrétion, en présence des agonistes à différentes concentrations. Ceci permet de mieux caractériser la réponse des plaquettes aux agonistes. Selon l'agoniste testé, différents types d'inter-relations de l'agrégation et la sécrétion d'ATP sont obtenus. Ici, on présente quelques exemples typiques :

- en présence d'ADP. La sécrétion ne débute qu'après une phase de latence. La réaction de libération est secondaire au phénomène d'agrégation et jamais de manière simultanée. Ce délai correspond au temps d'activation palquettaire, de margination des granules de stockage, de la

fusion de la membrane granulaire partielle ou totale, puis de la libération. Aucune sécrétion plaquettaire n'est mesurable aux faibles concentrations d'ADP (< 1-3 μM).

- l'induction au collagène met en évidence une voie différente de sécrétion, indépendante dans un premier temps de l'agrégation plaquettaire. La sécrétion d'ATP, qui débute dès l'adhérence des plaquettes aux fibrilles de collagène, précède l'agrégation.
- en présence d'acide arachidonique. L'agrégation plaquettaire et la sécrétion débutent après une courte phase de latence, pour atteindre simultanément leur valeur maximale. Les deux fonctions plaquettaires apparaissent donc étroitement dépendantes l'une de l'autre.

Les résultats de sécrétion d'ATP varient en fonction de l'agoniste utilisé. Les TRAPs et le collagène provoquent une sécrétion maximale d'ATP au plus grand niveau par rapport à d'autres agonistes, confirmant leurs propriétés d'agonistes « forts »^[165, 169]. La cinétique de libération en réponse à l'acide arachidonique est comparable à celle du collagène, mais les quantités d'ATP libérée en présence d'acide arachidonique sont en moyenne 30% plus faibles^[165]. A noter que le niveau de sécrétion est dépendant de la numération plaquettaire, donc il est raisonnable de normaliser les résultats d'ATP au taux des plaquettes^[169, 169]. Un majeur inconvénient de ce test est qu'il n'est pas réalisable en cas de thrombopénie sévère ou de faible quantité de sang (en particulier prélèvement pédiatrique).

4.8.2 Test à la mépacrine

La mépacrine (quinacrine) est un dérivé d'acridine orange fluorescent qui a une forte affinité pour l'ATP et l'ADP et qui lui permet donc de s'accumuler de façon rapide et sélective dans les granules denses des plaquettes^[171-173]. La mépacrine a été utilisée pour déterminer le nombre des granules denses plaquettaires par microscopie à fluorescence^[174]. La cytométrie en flux permet d'étudier les granules denses d'une manière efficace et rapide en quantifiant la fluorescence de la mépacrine. Associé à l'activation plaquettaire, le test à mépacrine est capable de différencier le défaut des granules denses et le déficit de sécrétion. Dans ce test, la mépacrine est capturée par les plaquettes au repos qui l'internalisent dans les granules denses (phase de capture). En incubant avec un agoniste, les plaquettes sont activées et libèrent le contenu des granules denses et ainsi la mépacrine dans le milieu extracellulaire (phase de sécrétion). Le défaut des granules denses est caractérisé par

une diminution de capture et de sécrétion, tandis que le déficit de sécrétion présente une sécrétion de mépacrine réduite mais associé à une capture normale. Le test de capture et sécrétion à la mépacrine par cytométrie en flux a été rapporté par Wall^[175] et Ramström^[176]. Nous avons optimisé cette technique et l'avons employée dans notre laboratoire pour explorer des patients avec suspicion de pathologie de granules denses, ce qui sera présenté en détail dans le chapitre « Evaluation des performance de la combinaison du test à mépacrine et de l'expression CD63 par CMF dans le diagnostic des pathologies des granules denses ».

4.8.3 Expression de CD63 par cytométrie en flux après activation des plaquettes

Le CD63, ou la granulophysine, est une protéine transmembranaire présente sur la membrane des granules denses et des lysosomes^[177]. Lors de l'activation plaquettaire, cette molécule est déplacée sur la membrane « externe » des plaquettes. C'est donc un marqueur des granules denses et de l'activation plaquettaire. On observe sur les plaquettes des patients ayant un déficit en granules denses, après stimulation par le TRAP, une faible expression de CD63 par rapport à des plaquettes normales^[177]. Ce test a été évalué par cytométrie en flux dans notre équipe et sera présenté en détail dans le chapitre « Evaluation des performance de la combinaison du test à mépacrine et de l'expression CD63 par CMF dans le diagnostic des pathologies des granules denses ».

4.8.4 Microscopie électronique en transmission (TEM)

Il s'agit du test de référence pour visualiser de façon effective l'ultrastructure plaquettaire. En TEM, les granules denses sont caractérisés par la présence d'un noyau dense (ou corps dense) intensément opaque entouré par un espace clair et une seule membrane. Le noyau dense peut remplir complètement ou partiellement le granule en fonction de la section de la grille de microscope électronique. De même, il peut être sphérique, allongé ou même avec une tête ronde et une queue comme un têtard.

Il existe différentes techniques pour quantifier les granules denses en utilisant TEM, soit sur préparation de plaquettes entières non colorées où l'opacité naturelle des granules denses permet leur quantification directe^[178, 179], soit par des techniques cytochimiques^[180, 181] qui permettent de visualiser les granules denses des plaquettes en renforçant leur opacité naturelle aux électrons.

La technique de Richards et Da Prada^[181] repose sur la mise en évidence des adénine-nucléotides dans les plaquettes par la réaction uraffine; dans cette réaction, des ions uranyle réagissent avec les

groupes phosphate des adénine-nucléotides lors de l'incubation prolongée. La technique de White^[180] repose sur la capacité qu'a la sérotonine d'être naturellement dense aux électrons. La sérotonine est également le principal facteur responsable pour la propriété osmiophile de granules denses, ce qui leur permet aussi une distinction claire des autres organelles en TEM. Une étude récente par le groupe NASCOLA a démontré qu'il existait un bon accord entre les laboratoires sur les conclusions de l'évaluation des granules denses par microscopie électronique^[156].

4.8.5 Tests liés à la sérotonine

La sérotonine (5-hydroxytryptamine, 5-HT) est activement incorporée et stockée dans les granules denses plaquettaires, donc il est possible de mesurer la capture et la libération de sérotonine radiomarquée des plaquettes^[182, 183]. Dans le test de sécrétion de la sérotonine (*serotonin release assay, SRA*), les plaquettes sont incubées avec la ¹⁴C 5-HT et puis activées par un agoniste fort comme le collagène ou le TRAP. La sécrétion des granules denses plaquettaires est ainsi évaluée par le pourcentage de la ¹⁴C 5-HT sécrétée dans la ¹⁴C 5-HT incorporée totale. A noter que les médicaments de type inhibiteur sélectif de la recapture de la sérotonine (ISRS), pouvant inhiber l'incorporation de la sérotonine par les plaquettes^[184], n'affectent pas le résultat de ce test car le résultat est exprimé en pourcentage. Considéré encore comme méthode de référence pour l'évaluation de sécrétion des granules denses plaquettaires, cependant, ce test radioactif n'est réalisé que dans très peu de laboratoires spécialisés et est progressivement remplacé par d'autres méthodes non-radioactives, par exemple, la sérotonine plaquettaire totale ou sécrétée peut être dosée par HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*)^[185] ou ELISA^[186]. Récemment, une méthode par cytométrie en flux a été développée pour détecter la sérotonine dans les plaquettes avec des anticorps spécifiques^[187, 188]. Nous présenterons nos travaux pour optimiser ce test par CMF dans le chapitre « Détection de la sérotonine plaquettaire par cytométrie en flux ».

4.8.6 Détermination des nucléotides adénosines

Certains laboratoires font le dosage de l'ADP et l'ATP avec des préparations de plaquettes lysées (à partir de plaquettes au nombre standardisé) et parfois après une étape pour induire la libération des granules denses. Les nucléotides adénosines sont mesurés dans les lysats de plaquettes soit par luminométrie^[189, 190] ou soit par HPLC^[191], avec la conversion de l'ADP en ATP (en utilisant la pyruvate kinase). Ces essais ont pour avantage que les échantillons peuvent être congelés et

expédiés à des laboratoires spécialisés qui effectuent régulièrement des mesures de nucleotides.

4.9 TESTS POUR LES GRANULES α

La microscopie électronique s'est également avérée très utile pour examiner l'ultrastructure des granules α ^[192]. Des protéines spécifiques aux granules α plaquettaires telles que le facteur plaquettaire-4 (PF4) et la beta-thromboglobuline (β -TG), peuvent être mesurées par ELISA, dosage radio-immunologique ou Western blot^[2, 123]. La P-sélectine (CD62P) est présente majoritairement sur la membrane des granules α dans les plaquettes au repos et cette glycoprotéine est exprimée sur la surface des plaquettes lors de l'activation par les TRAPs. Ainsi, CD62P peut servir comme un marqueur de l'activation plaquettaire et de bonne fonctionnalité des granules α ^[80].

4.10 DETERMINATION DES GLYCOPROTEINES MEMBRANAIRES DES PLAQUETTES

Plusieurs méthodes biochimiques sont possibles, par exemple, électrophorèse uni- ou bidimensionnelle ou croisée, techniques immunochimiques, techniques ELISA, Western blot, mais elles sont souvent très lourdes à mettre en oeuvre. Le développement de la cytométrie en flux rend plus facile et rapide la quantification de la densité des glycoprotéines membranaires des plaquettes en utilisant une série d'anticorps monoclonaux spécifiques conjugués à différents fluorochromes^[70]. Actuellement, plusieurs trousse commerciales sont disponibles, tels que Platelet GP/Receptors (BioCytex; Diagnostica Stago), ADIAflo™ Platelet GP (American Diagnostica), ADIAflo™ GP-TRIO (American Diagnostica), permettant la quantification des glycoprotéines majeures présentes sur la membrane plaquettaire (GPIIb/IIIa, GPIb, GPIa/IIa)^[193]. La cytométrie en flux peut être complétée par l'étude des glycoprotéines par une séparation électrophorétique en gels de polyacrylamide (SDS-PAGE) suivie du transfert sur une membrane de nitrocellulose et de l'identification avec des anticorps spécifiques (Western blot) dans certaines circonstances (protéines tronquées ou protéines dégradées lors du diagnostic de thrombopathies constitutionnelles)^[194].

4.11 VASP (*VASODILATOR STIMULATED PHOSPHOPROTEIN*)

TEST^[195-197]

Ce test mesure la réactivité du récepteur à l'ADP de type P2Y12 par l'état de phosphorylation de VASP. VASP est une protéine intraplaquettaire qui n'est pas phosphorylée dans les conditions normales et la phosphorylation de cette molécule est régulée par la l'AMPC. La prostaglandine E1 (PGE1) active AMPc, alors que l'ADP inhibe la phosphorylation de VASP via le récepteur P2Y12 en inhibant AMPc. En conséquence, la phosphorylation de VASP (VASP-P) est corrélée avec l'inhibition du récepteur P2Y12 et ainsi l'effet thérapeutique de la thiénoxyridine (antagoniste de P2Y12). A noter que le test VASP est spécifique pour le récepteur P2Y12 et ne permet pas d'évaluer la contribution du récepteur P2Y1. Actuellement, une trousse commerciale est disponible, Platelet VASP (développé par BioCytex et distribué également par Diagnostica Stago).

Dans le test, le sang est incubé en présence de prostaglandine E1 (PGE1) seule et en présence de PGE1+ADP. Après une perméabilisation cellulaire, la molécule VASP sous forme phosphorylée (VASP-P) est marquée par un anticorps spécifique anti-VASP-P en immunofluorescence indirecte sans lavage. L'analyse par cytométrie en flux permet de comparer les deux conditions testées et d'évaluer pour l'échantillon analysé la capacité de l'ADP à inhiber cette phosphorylation.

Ce test est utilisé soit pour la recherche d'une anomalie qualitative ou quantitative des récepteurs P2Y12 soit pour évaluer l'efficacité biologique d'un traitement antiagrégant plaquettaire par thiénoxyridine (clopidogrel, ticlopidine, prasugrel).

4.12 TESTS DE L'ACTIVITE PROCOAGULANTE PLAQUETTAIRE

(*PROCOAGULANT ACTIVITY, PCA*)

L'activité procoagulante plaquettaire peut être évaluée par le test de consommation de la prothrombine ou par le test d'affinité à l'annexine V par cytométrie en flux^[194, 198].

Le syndrome de Scott est une thrombopathie caractérisée de façon isolée par une anomalie de l'activité procoagulante plaquettaire (une anomalie d'exposition des phospholipides de charge négative à la surface plaquettaire). Toutefois, une étude a rapporté qu'un déficit isolé de PCA a été observé dans une grande proportion de patients présentant un syndrome hémorragique^[199], ce qui

reste à confirmer.

4.12.1 Le test de consommation de la prothrombine (TCP)

Le test consiste à mesurer le taux de facteur II dans le sérum obtenu après coagulation à 37 degrés du sang prélevé dans un tube sec. Normalement, la coagulation entraîne une consommation du facteur II dont le taux résiduel est inférieur à 10 %. Le TCP a donc l'avantage de prendre en compte le rôle de la membrane plaquettaire dans la coagulation. En effet, celle-ci tient lieu de support pour la formation des complexes enzymatiques. Le test est donc perturbé en cas de thrombopénie, de déficit en facteurs de coagulation ou d'une anomalie d'exposition des phospholipides à la surface plaquettaire.

4.12.2 Test d'affinité à l'annexine V par cytométrie en flux

Lors de l'activation plaquettaire, la phosphatidylsérine (PS) est exposée à la surface des plaquettes après l'activation en exposant une surface procoagulante qui accélère la génération de thrombine. La protéine placentaire, l'annexine-V, se liant spécifiquement à la PS, est utilisée pour détecter la PS à la surface des plaquettes par cytométrie en flux.

4.13 LA CYTOMETRIE EN FLUX DANS L'EXPLORATION DES PLAQUETTES

De nos jours, la cytométrie en flux est une technique largement disponible dans la majorité des laboratoires d'hématologie. Un cytomètre en flux est un appareil relativement complexe et sophistiqué ; qui fait appel à la fois à des principes de fluidique, d'optique et d'électronique (Figure 13, page suivante). La cytométrie en flux exploite l'aptitude d'une cellule qui a incorporé un fluorochrome, à émettre un signal de fluorescence lors de son passage devant un faisceau laser. Le plus souvent, les fluorochromes sont couplés à des anticorps, plus rarement à des protéines (par exemple l'annexine V), ou encore sont incorporés directement par la cellule (mépacrine, thiazole orange) ^[193].

La cytométrie en flux permet d'étudier rapidement quelques caractéristiques d'un grand nombre de cellules. Il est donc possible d'en tirer des statistiques fiables. Actuellement, elle représente un outil important dans l'exploration biologique des plaquettes, pour laquelle de nombreuses applications de la cytométrie en flux ont été développées pour l'exploration des fonctions plaquettaires (Tableau XI) ^[70, 200, 201].

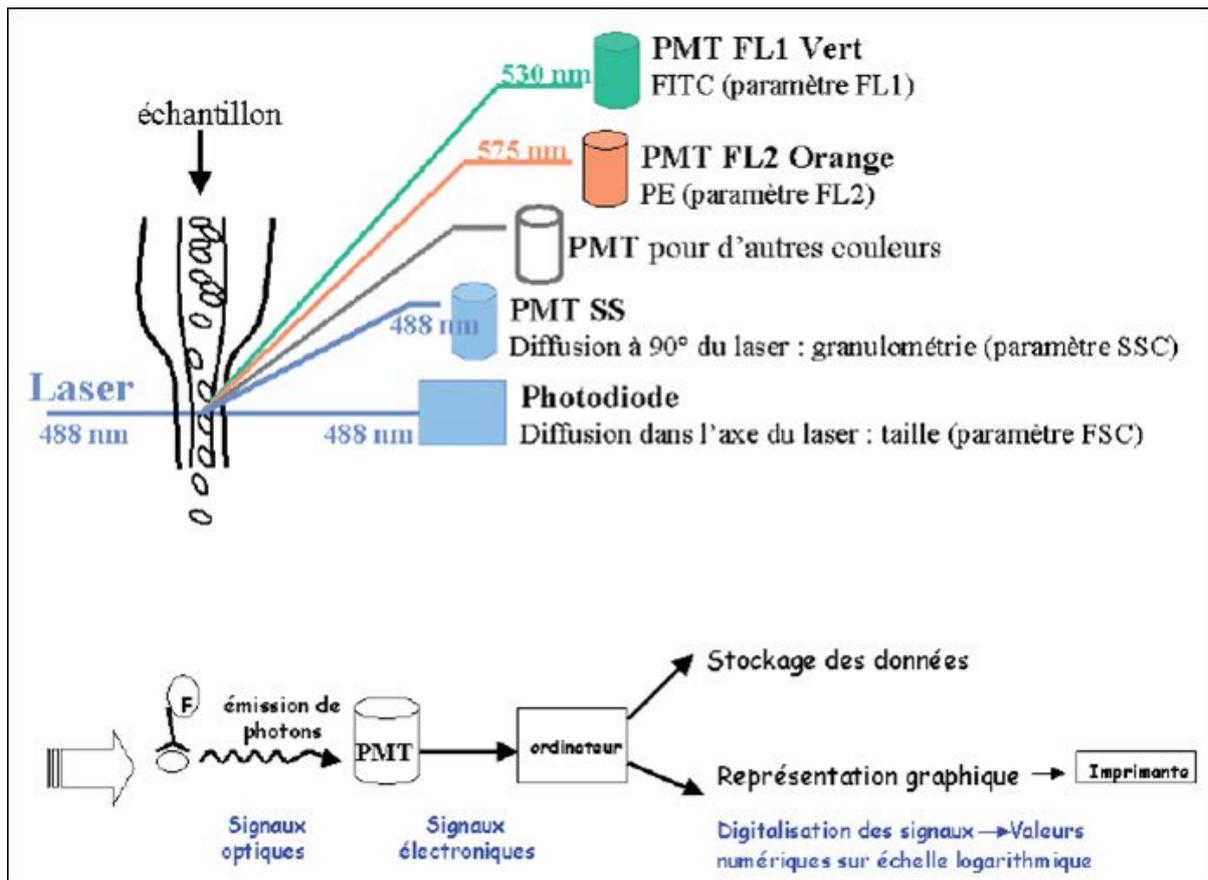


Figure 13. Représentation schématique d'un cytométrie en flux^[193].

Tableau XI. Applications de la cytométrie en flux dans l'exploration des fonctions plaquettaires^[2].

Flow cytometric PLT function test	
Diagnosis of PLT disorders	Glanzmann's thrombasthenia, Bernard-Soulier syndrome, storage pool disease, HIT, Scott syndrome
Quantification of receptor density	PLT receptor defects or polymorphisms
Detection of activated PLTs	CD62P, CD63, CD40L, GP IIb-IIIa conformation (PACI), PS exposure, microparticles, PLT-PLT or PLT-WBC aggregates
Monitoring PLT responses to agonists	Usage of classical agonists in combination with PLT activation markers
Monitoring of PLT apoptosis	PS exposure, microparticles, transmembrane mitochondrial potential $\Delta\psi$, caspases
Monitoring anti-PLT drugs	Aspirin, clopidogrel (ADP receptor inhibitor), abciximab (GP IIb-IIIa receptor inhibitor)
PLT production in thrombocytopenia	Reticulated PLTs through e.g., thiazole orange
PLT associated IgG	Detection of allo-/autoantibodies (immune thrombocytopenia ITP)
PLT survival	Biotinylation studies or fluorescent dyes to label PLTs
Signal transduction	Calcium measurement, intracellular phosphorylation (VASP)

PLTs, platelets; GP, glycoprotein receptor; PS, phosphatidylserine; WBC, white blood cell; and IgG, immune globuline G.

L'analyse plaquettaire par cytométrie en flux peut notamment s'appliquer :

-au diagnostic de thrombopathies constitutionnelles par quantification de glycoprotéines membranaires plaquettaires : GPIIb-IIIa (déficitaire dans la thrombasthénie de Glanzmann), GP Ib-V-IX (déficitaire dans le syndrome de Bernard-Soulier) ;

- au diagnostic des anomalies des granules denses par test de capture et sécrétion à la mépacrine et par l'expression de CD63;

-à la détection de plaquettes activées *in vivo*, grâce à l'utilisation d'anticorps spécifiques d'antigènes d'activation plaquettaire (P-sélectine, complexe GP IIb-IIIa activé ou fibrinogène fixé à ce complexe)^[202] ;

-à la mise en évidence d'une hyperactivité plaquettaire par analyse quantitative des variations dans l'expression membranaire de différentes glycoprotéines après stimulation des plaquettes *in vitro* par l'ADP, le TXA2, ou la thrombine^[203] ;

-à un monitoring biologique des traitements antiplaquettaires, avec l'avantage comparativement à l'agrégométrie d'être spécifique d'une molécule (anti-GPIIbIIIa ou thiénoxyridine), alors même que les patients sont traités par des associations d'antiplaquettaires ;

-à d'autres applications, dont l'immunologie plaquettaire, l'étude des plaquettes réticulées, la quantification et le phénotypage des microparticules plaquettaires, le diagnostic des thrombopénies induites par l'héparine, l'étude des voies de signalisation (ceci n'est pas exhaustif).

Actuellement, des trousse commerciale prêtes à l'emploi sont disponibles, comme énumérées dans le Tableau XII.

Tableau XII. Trousses prêtes à l'emploi pour une exploration plaquettaire par cytométrie en flux^[193].

Tableau I / Trousses prêtes à l'emploi pour une exploration plaquettaire en cytométrie en flux.					
Nom du produit	Indications (telles que mentionnées par le fabricant)	Cibles plaquettares étudiées	Enregistrement CE	A usage diagnostique	Fournisseur
Platelet GP/Receptors	Diagnostic des anomalies quantitatives des glycoprotéines plaquettares	<ul style="list-style-type: none"> • GPIIb (CD41) • GPIb (CD42b) • P-sélectine (CD62P) • Etat basal/activé (TRAP) 	oui	Oui	BioCytex Diagnostica Stago
ADIAflo™ Platelet GP	Quantification des glycoprotéines plaquettares	<ul style="list-style-type: none"> • GPIIbIIIa (CD41a) • GPIIb (CD41) • GPIb (CD42b) • P-sélectine (CD62P) • Etat basal/activé (TRAP) 		Limité à usage de recherche aux Etats-Unis	American Diagnostica
ADIAflo™ GP-TRIO	Quantification des glycoprotéines plaquettares	<ul style="list-style-type: none"> • GPIIb (CD42) • GPIIX (CD42a) • GPV (CD42d) • Etat basal 		Limité à usage de recherche aux Etats-Unis	American Diagnostica
Platelet GPIIbIIIa Occupancy	Etude des anti-agrégants plaquettares de type anti-GPIIbIIIa	• Nombre de sites GPIIbIIIa occupés par l'antiplaquettaire	non	A usage de recherche uniquement	BioCytex Diagnostica Stago
ADIAflo™ GPIIbIIIa	Quantification des sites GPIIbIIIa occupés	• Nombre de sites GPIIbIIIa occupés par l'antiplaquettaire		Limité à usage de recherche aux Etats-Unis	American Diagnostica
Platelet Fibrinogen	Détection des plaquettes activées	<ul style="list-style-type: none"> • Liaison du fibrinogène aux plaquettes (AC anti-fibrinogène humain) • Etat basal/activé (activateurs non fournis) 	non	A usage de recherche uniquement	Diagnostica Stago
Platelet VASP	Mesure de la réactivité des récepteurs plaquettares à l'ADP par l'état de phosphorylation de la protéine VASP	<ul style="list-style-type: none"> • Phosphorylation de VASP sur le site sérine 239 • En réponse à l'ADP et à PGE1 	oui	A usage de recherche uniquement	BioCytex Diagnostica Stago
Platelet HPA-1	Détermination du polymorphisme plaquettaire HPA-1	• Polymorphisme HPA-1 (GPIIIa)	oui	Oui	BioCytex
ADIAflo™ Platelet HPA-1	Détermination du polymorphisme P1 ^{A1} /P1 ^{A2}	• Polymorphisme P1 ^{A1} /P1 ^{A2} (GPIIIa)		Limité à usage de recherche aux Etats-Unis	American Diagnostica
Platelet PAIg	Trousse de quantification des immunoglobulines associées aux plaquettes	• AC associés aux plaquettes (sans spécifier l'isotype)	non	A usage de recherche uniquement	BioCytex

4.14 AUTRES TECHNIQUES D'EXPLORATION PLAQUETTAIRE

Réservées à des laboratoires spécialisés, elles concernent :

- l'étude du métabolisme plaquettaire :

a. mesure des flux calciques à l'aide de fluorophores sensibles au Ca²⁺ ;

b. exploration du métabolisme de l'acide arachidonique (voie de la cyclo-oxygénase) : mesure de la synthèse du thromboxane B2 par radiochromatographie ;

c. étude des phosphorylations des protéines plaquettares après activation.

- les dosages de la thrombopoïétine (TPO) et de la glyocalycine (GC). Le niveau de la TPO est inversement proportionnel au nombre de mégacaryocytes et plaquettes. La GC est la partie plasmatique soluble de la glycoprotéine GPIIb. Son taux est proportionnel au taux de renouvellement plaquettaire.

- la culture de progéniteurs médullaires en présence de différents facteurs de croissance permettant d'orienter certains diagnostics mais aussi de définir les particularités de la mégacaryocytopoïèse au cours de ces différentes pathologies.
- l'étude du caryotype systématique pour toute thrombopénie constitutionnelle de découverte néonatale avec une recherche attentive de délétions intéressant les régions 11q 23-24 et 22q 11-2 qui sont responsables respectivement du syndrome de Jacobsen et du syndrome de DiGeorge/vélo-cardio-facial.
- l'analyse de l'ADN à l'aide de sondes moléculaires spécifiques pour les gènes mutants. Cette méthode est plus spécifique et plus sensible. Elle est également plus concluante lorsque le gène anormal est identifiable, ce qui n'est pas toujours possible cependant.
- les nouvelles technologies telles que la génomique, la transcriptomique et la protéomique.

5. PATHOLOGIES PLAQUETTAIRES

Les plaquettes jouent un rôle central dans l'hémostase, surtout l'hémostase primaire. Les anomalies quantitatives (thrombopénies ou thrombocytose), fonctionnelles (thrombopathies), ou mixtes, peuvent potentialiser des hémorragies excessives ou au contraire des thromboses, quel que soit leur cause constitutionnelle ou acquise^[16]. La plupart des pathologies plaquettaires se traduisent par un syndrome hémorragique d'intensité variable^[67], essentiellement des saignements cutanéomuqueux parmi lesquels le purpura, les épistaxis, les gingivorragies et les ménorragies. Les formes modérées ne présentent des problèmes de saignement qu'après les traumatismes ou des interventions chirurgicales. Les complications hémorragiques mettant la vie en danger, tels que hémorragies intracrâniennes, gastro-intestinales ou génito-urinaires, sont beaucoup moins fréquentes. Des questionnaires d'hémorragie ont été développés pour évaluer la gravité des saignements^[204, 205].

Les pathologies plaquettaires acquises sont beaucoup plus fréquentes et aussi relativement plus faciles à diagnostiquer. Les thrombopénies et les thrombopathies congénitales constituent un groupe de pathologies rares résultant d'anomalies génétiques^[206, 207]. Elles peuvent être isolées ou associées à d'autres anomalies hématologiques et/ou extra-hématologiques.

Leur diagnostic est souvent difficile à établir, pour de nombreuses raisons^[208]. Premièrement, les pathologies constitutionnelles sont rares et donc très méconnues par les cliniciens, qui ont tendance à soupçonner les maladies les plus fréquentes. Deuxièmement, pour faire un diagnostic définitif, il nécessite souvent des techniques complexes qui ne sont pas largement disponibles. Enfin, la moitié des patients présentent des formes qui n'ont pas encore été décrites ou dont le mécanisme reste inconnu. En conséquence, de nombreux patients atteints de pathologies plaquettaires constitutionnelles sont diagnostiqués à tort ou simplement négligés.

Un diagnostic définitif pour les patients présentant une maladie constitutionnelle peut servir à plusieurs fins^[18, 206, 208]. D'abord, il est essentiel pour adopter l'approche thérapeutique pertinente et pour éviter les traitements inutiles et potentiellement dangereux. Ensuite, un diagnostic correct permet de mieux définir le pronostic des patients, par exemple, le risque de saignements, l'évolution de la numération plaquettaire, la possibilité de développer d'autres complications (néphropathie et surdité dans le syndrome MYH9, hémopathies malignes dans le syndrome

FPD/AML). De plus, il définit également le risque de transmettre la maladie aux descendants et, dans de nombreux cas, permet le diagnostic prénatal. Enfin, l'exclusion de déficits déjà connus par des explorations précises est le point de départ pour la découverte des nouvelles maladies qui ne sont pas encore connues.

Dans ce chapitre, nous allons présenter les thrombopénies et thrombopathies constitutionnelles.

5.1 THROMBOPENIES CONSTITUTIONNELLES

Les thrombopénies constitutionnelles constituent un groupe de pathologies rares progressivement mieux identifiées grâce à une meilleure connaissance des constituants des plaquettes et de la mégacaryopoïèse et ainsi que la disponibilité de nouvelles méthodes. Au cours de ces dernières années, la connaissance sur les étiologies génétiques a considérablement avancé et plusieurs nouvelles entités ont été découvertes, telles que celles résultant de mutations dans les gènes *FLNA*, *TUBB1*, *ANKRD26*, *CYCS*, et *ABCG5* ou *ABCG8*^[209, 210]. On a identifié actuellement au moins 24 gènes dont les mutations se traduisent par 22 types de thrombopénie constitutionnelle^[206, 208] (Tableau XIII). Cependant, une grande proportion des patients présentant une thrombopénie héréditaire n'ont pas de diagnostic bien établi car leur pathologie n'a jamais été décrite. L'étude de grandes séries de patients a identifié les caractéristiques particulières de ces différentes formes et a révélé qu'elles ont différents degrés de complexité clinique et une grande variation dans le pronostic^[206].

Tableau XIII. Les principale thrombopénies constitutionnelles avec une étiologie génétique identifiée^[206].

Disease (abbreviation, OMIM entry)	Inheritance	Gene (chromosome localization)	Other features
Large platelets			
MYH9-related disease (MYH9-RD, nd)	AD	<i>MYH9</i> (22q12-13)	Giant platelets, leukocyte inclusions, cataracts, nephropathy and/or deafness
Bernard – Soulier syndrome (BSS, 231200)	Biallelic	<i>GP1BA</i> (17p13), <i>GPIBB</i> (22q11), GP9	Giant platelets

			(3q21)	
Monoallelic	AD	Idem		Large platelets
Paris-Trousseau thrombocytopenia (TCPT, 188025), Jacobsen syndrome (JBS, 147791)	AD	Large deletion (11q23-ter)		Large α -granules, cardiac and facial defects, developmental delay \pm other defects
Gray platelet syndrome (GPS, 139090)	AR	<i>NBEAL2</i> (3p21.1)		Large and pale platelets, evolutive myelofibrosis, splenomegaly, high serum vit B12
Platelet-type von Willebrand disease (VWDP), 177820)	AD	<i>GPIBA</i> (17p13)		Possible giant platelets, platelet count goes down under stress; enhanced platelet aggregation in response to ristocetin
GATA1-related disease (GATA1-RD) X-linked thrombocytopenia with or without dyserythropoietic anemia (XLTTA, 300367); X-linked thrombocytopenia with thalassemia (XLTT, 314050)	XL	<i>GATA1</i> (Xp11)		Haemolytic anaemia, possible unbalanced globin chain synthesis, possible congenital erythropoietic porphyria
Thrombocytopenia associated with sitosterolaemia (STSL, 210250)	AR	<i>ABCG5</i> (2p21), <i>ABCG8</i> (2p21)		Stomatocytosis, possible anaemia, tendon xanthomas, atherosclerosis
ITGA2/ITGB3-related thrombocytopenia/Glanzmann thrombasthenia (GT, 273800)	AD	<i>ITGA2B</i> (17q21.31), <i>ITGB3</i> (17q21.32)		Platelet anisotropy, possible defects of platelet function
FLNA-related thrombocytopenia (FLNA-RT, nd)	XL	<i>FLNA</i> (Xq28)		Platelets from small to giant. May be associated with periventricular nodular heterotopia (MIM 300049)
TUBB1-related macrothrombocytopenia (nd, 613112)	AD	<i>TUBB1</i> (6p21.3)		Giant platelets
GFI1B-related thrombocytopenia (GFI1B-RT, 187900)	AD	<i>GFI1B</i> (9q34.13)		None
ACTN1-related thrombocytopenia (ACTN1-RT, 615193)	AD	<i>ACTN1</i> (14q24.1)		None
PRKACG-related thrombocytopenia (PRKACG-RT, 616176)	AR	<i>PRKACG</i> (9q21.11)		None
Normal-sized platelets				

Congenital amegakaryocytic thrombocytopenia (CAMT, 604498)	AR	<i>c-Mpl</i> (1p34)	Reduced megakaryocytes, evolution into bone marrow aplasia
Thrombocytopenia with absent radii (TAR, 274000)	AR	<i>RBM8A</i> (1q21.1)	Platelet count tends to rise and often normalizes in adult life, reduced megakaryocytes, bilateral radial aplasia ± other malformations
Familial platelet disorder and predisposition to acute myelogenous leukemia (FPD/AML, 601399)	AD	<i>CBFA2/RUNX1/AML1</i> (21q22)	Development of leukemia or MDS in 30-40 % of patients
ANKRD26-related thrombocytopenia (THC2, 313900)	AD	<i>ANKRD26</i> (10p2)	Risk of leukemia?
Amegakaryocytic thrombocytopenia with radio-ulnar synostosis (nd, 605432)	AD	<i>HOXA11</i> (7p15-14)	Reduced megakaryocytes, possible evolution into aplastic anemia, radio-ulnar synostosis ± other defects
CYCS-related thrombocytopenia (THC4, 612004)	AD	<i>CYCS</i> (7p15.3)	None
Small platelets			
Wiskott - Aldrich syndrome (WAS, 301000)	XL	<i>WAS</i> (Xp11)	Severe immunodeficiency,eczema
X-linked thrombocytopenia (XLT, 313900)			No or mild immunodeficiency

5.1.1 Classification des thrombopénies constitutionnelles

Du fait de leur grande hétérogénéité clinique et biologique et des incertitudes concernant leur mécanisme, plusieurs méthodes de classification sont proposées en fonction de critères suivantes : les caractéristiques cliniques (l'existence d'anomalies extra-hématologiques)^[211], le mode de transmission (autosomique dominante, autosomique récessive et liée à l'X)^[18], l'anomalie moléculaire identifiée (mutation génétique)^[212], la taille plaquettaire définie par le volume plaquettaire moyen^[209] ou encore l'étape à laquelle la production de plaquettes est perturbée (la production de mégacaryocytes, la différenciation des mégacaryocytes ou de la structure et des fonctions plaquettaires)^[213]. La classification sur la base de mécanismes pathogéniques qui est la plus logique, cependant, n'est pas pratique parce que la pathogénité pour un grand nombre de patients reste encore inconnue. Le mode de transmission a peu de valeur d'orientation diagnostique,

étant donné que la grande majorité des thrombopénies génétiques sont transmises sur un mode autosomique dominant et il existe des cas sporadiques dûs à des mutations *de novo*. Les caractéristiques cliniques semblent utiles, puisque l'histoire de la maladie et l'examen clinique permettent de découvrir des anomalies qui sont pathognomoniques pour certaines formes surtout les formes syndromiques. L'anomalie de la taille plaquettaire constitue une caractéristique constante pour de nombreuses maladies et peut facilement être déterminée même dans des laboratoires non spécialisés. Ainsi, nous choisissons la classification des thrombopénies constitutionnelles basée d'abord sur l'existence de signes extra-hématologiques et puis la taille des plaquettes^[208, 214].

5.1.2 Thrombopénies syndromiques

Thrombopénie Paris-Trousseau (OMIM 188025)/Syndrome de Jacobsen (OMIM 147791)

La thrombopénie de Paris-Trousseau est une macrothrombopénie autosomique dominante, qui peut s'accompagner d'un syndrome malformatif, le syndrome de Jacobsen. Ce syndrome se caractérise par un retard de croissance staturo-pondéral et mental, et un syndrome dysmorphique avec essentiellement des anomalies de la face et des extrémités. Peuvent également s'associer des malformations cardiaques, des anomalies génito-urinaires, voire des anomalies du système nerveux central^[215]. En 1993, Favier et collaborateurs décrivent plus précisément les caractéristiques de la thrombopénie qui accompagne le syndrome de Jacobsen dans la moitié des cas et individualisent celle-ci sous le nom de thrombopénie de Paris-Trousseau^[216].

La thrombopénie est modérée (30 à 80 x 10⁹/L), d'âge de découverte entre 1 mois et 12 ans^[217]. La thrombopénie est peu symptomatique et peut se corriger au moins partiellement avec le temps. Le faible pourcentage de macroplaquettes, en moyenne 10%, explique l'augmentation modérée du VPM (12 à 15 fL). Le frottis sanguin montre l'association de macroplaquettes bien granuleuses et des plaquettes de taille normale dont certaines possèdent un granule géant coloré en rouge correspondant à la fusion des granules α caractéristique dans ce syndrome^[217], ce qui a été démontré par microscopie électronique^[218]. L'étude de moelle osseuse montre une dysmégacaryopoïèse avec un nombre de MKs augmenté avec prédominance des micro-MKs immatures.

Le syndrome de Jacobsen/thrombopénie de Paris-Trousseau est dû à une délétion du bras long du chromosome 11 (11q23-24). La perte de gène *FLII* hémizygote (localisé sur 11q24), a été

impliquée comme cause potentielle de la thrombocytopénie Paris-Trousseau du fait de similarités sur les anomalies des MKs dans l'embryons de souris dans lesquelles *FLII* a été génétiquement supprimés [45, 219]. Il est possible que la deletion d'un gène adjacent est responsable du retard mental et des anomalies dysmorphiques, symptômes typiques du syndrome de Jacobsen [18].

Syndrome de DiGeorge, syndrome vélo-cardio-facial, CATCH22 (cardiac defects, abnormal facies, thymic hypoplasia, cleft palate, hypocalcemia), syndrome de la délétion 22q11.2

Le syndrome de DiGeorge (OMIM 188400) est relativement fréquent (1/4 000 naissances). Son expression phénotypique est extrêmement variable, y compris au sein d'une même famille. Dans la littérature, plusieurs phénotypes ont été décrits sous les noms différents, tels que « VCF Syndrome » (OMIM 192430), « Takao syndrome », « Shprintzen syndrome » [220-222]. Cela a conduit Wilson *et al.* [223] à proposer l'acronyme CATCH 22, et puis « 22q11 deletion syndrome » et « CATCH phenotype » par Burn [224].

Dans sa forme classique, il associe une dysmorphie faciale caractéristique (petit nez rond, microstomie, fente palatine, implantation basse des oreilles, micrognathie), des malformations cardiaques, une hypo- ou aplasie du thymus et des glandes parathyroïdes qui sont responsables respectivement d'un déficit de l'immunité cellulaire et d'une hypocalcémie.

La thrombopénie est très modérée, présente dans 35% des cas, en général non associée à des manifestations hémorragiques, le plus souvent découverte lors de l'exploration pré-opératoire. Les macroplaquettes sont présentes dans 80% des cas avec un VPM faiblement augmenté (10 à 20 fL) [225, 226].

Ce syndrome est secondaire à une délétion du bras long du chromosome 22 qui peut donc intéresser le gène codant la GPIIb β (un des éléments du complexe GPIIb-IX-V), localisé en 22q11.2. Cette délétion survient le plus souvent *de novo* ou est transmise selon un mode autosomique dominant. La perte d'un allèle *GPIIB* orrespondant à une forme hétérozygote du syndrome de Bernard-Soulier, peut avoir une macrothrombopénie très modérée sans défaut d'agglutination plaquettaire à la ristocétine [227]. La thrombopénie doit être distinguée avec thrombopénie immunitaire, qui est également fréquente chez ces patients à cause de leur déficit de l'immunité cellulaire T [227].

5.1.3 Thrombopénie et malformations osseuses

La thrombopénie avec aplasie radiale ou syndrome TAR (Thrombocytopenia with absent radii; OMIM 274000)

Il s'agit d'une maladie autosomale récessive rare caractérisée par une thrombopénie avec une diminution quantitative des mégacaryocytes, et aplasie radiale bilatérale avec des pouces présents^[228, 229] qui se distingue des autres syndromes qui combinent anomalies sanguines avec absence de radius tels que l'anémie de Fanconi. Des anomalies des membres inférieurs, cardiaques, rénales, gastro-intestinales et génito-urinaires peuvent également être présentes. Une réaction leucémoïde est transitoire et récidivante pendant les premiers mois de la vie mais est exceptionnelle après l'âge de deux ans. Toutefois, la survenue de leucémie a été décrite pour certains patients de TAR^[230].

La thrombopénie est présente dans 100% des cas^[228]. La thrombopénie survient généralement dès la naissance ou dès le premier trimestre. Elle est souvent sévère ($<30 \times 10^9/L$) à l'origine de symptômes hémorragiques fréquents et parfois graves (saignements gastro-intestinaux et intra-cérébraux). La thrombopénie s'améliore spontanément le plus souvent après l'âge d'un an^[228]. Les plaquettes sont de taille et d'aspect morphologique normaux. Il a été rapporté que les plaquettes de ces patients montraient une réponse diminuée au collagène et une absence d'agrégation secondaire en réponse à l'ADP ou l'épinéphrine, ce qui évoque un déficit en granules denses^[78].

L'anomalie génétique responsable n'a pas été encore clairement établie. La moelle osseuse de TAR présente un défaut de réponses à la TPO avec absence de prolifération (CFU-MKs) et de différenciation des mégacaryocytes, mais aucun déficit dans *THPO* (le gène de TPO), *MPL*, ou *JAK2* n'a été identifié^[231, 232]. Deux études récentes ont identifié une délétion en 1q21.1 et une mutation dans la région régulatrice du gène *RBM8A*^[233-235].

Syndrome oculo-oto-radial ou syndrome d'IVIC (instituto Venezolano de investigaciones científicas) (OMIM 147750)

Ce syndrome a été décrit pour la première fois en 1980 par Arias^[236]. Il s'agit d'un syndrome rare de transmission autosomique dominante en rapport avec une mutation hétérozygote du gène *SALL4*^[237]. Son expression phénotypique est variable et associe des anomalies osseuses des avant-bras (hypoplasie, voire aplasie asymétrique, limitation de la prono-supination) avec une atteinte des pouces qui sont absents ou dysmorphiques, une surdité mixte bilatérale et une atteinte des muscles

oculomoteurs externes. Une thrombopénie modérée (40 à 120 x 10⁹/L) est présente dans plus de la moitié des cas.

Amégacaryocytose et synostose radio-cubitale (Amegakaryocytic thrombocytopenia with radioulnar synostosis, ATRUS; OMIM 605432)

Cette association a été décrite en 2000 dans deux familles non apparentées, non consanguines et d'origine ethnique différente^[238, 239]. Les sujets atteints ont une limitation de la pronosupination en rapport avec une synostose radio-cubitale supérieure associée de façon inconstante à une clinodactylie, une syndactylie, une hypoplasie des hanches et des troubles auditifs.

La thrombopénie marquée (10-30 x 10⁹/L) est présente dès la naissance mais elle ne s'améliore pas avec l'âge. Dans les cas les plus sévères, l'exploration médullaire révèle une amégacaryocytose isolée qui évolue vers l'aplasie médullaire pouvant justifier une allo-greffe de moelle ou cellules souches hématopoïétique.

Les sujets atteints ont tous une mutation hétérozygote dans l'exon 2 de l'*homéo box HOXA11* (chromosome 7p15-14.2) responsable de la synthèse d'une protéine tronquée (codon stop prématuré). L'*HOXA11* est impliqué dans la morphogenèse de l'avant-bras et l'amégacaryocytose, présente uniquement chez certains des enfants atteints, pourrait être secondaire à un défaut d'interaction entre *HOXA11* et d'autres gènes essentiels pour la différenciation mégacaryocytaire pendant l'embryogenèse.

5.1.4 Autres thrombopénies avec atteintes extra-hématologiques

Syndrome MYH9 (MYH9-related disease, MYH9-RD) : thrombopénie, atteinte sensorielle et rénale

Le groupe des thrombopénies constitutionnelles avec macroplaquettes associées à des inclusions leucocytaires basophiles comprend quatre formes cliniques d'expression phénotypique proche : syndromes de May-Hegglin (OMIM 155100), de Fechtner (OMIM 153640), d'Epstein (OMIM153650), de Sebastian (OMIM 605294)^[240-242]. Les quatre formes ont été définies en fonction de la présence ou l'absence d'inclusions neutrophiles et d'anomalies associées similaires au syndrome Alport (glomérulonéphrite, surdité neurosensorielle et cataracte) comme indiqué dans le Tableau XIV. Ces syndromes ont été récemment regroupés dans une même entité clinique, le syndrome MYH9 ou MYH9-RD, en raison de la mise en évidence de mutations au niveau d'un même gène : le gène *MYH9* (pour Myosine Heavy Chain 9) localisé sur 22q12.3^[240].

Tableau XIV. Phénotypes cliniques du syndrome MYH9^[240].

	MHA	FTS	EPS	SPS
Macrothrombocytopenia	+	+	+	+
Inclusion bodies large	+	-	-	-
Inclusion bodies small	-	+	-	+
Hearing loss	-	+	+	(+)
Nephritis	-	+	+	-
Cataract	-	+	-	(+)

(+) = Manifestation of symptoms at older age.

Tous les sujets atteints de syndrome MYH9 présentent dès la naissance une thrombopénie d'intensité variable (de $<30 \times 10^9/L$ jusqu'à $100 \times 10^9/L$)^[240] avec présence de plaquettes géantes. Les signes hémorragiques sont habituellement très modérés, reflétant une masse plaquettaire presque normale et une fonction plaquettaire largement préservée. En fait, l'étude fonctionnelle des plaquette montre une agrégation normale mais associée à une réduction de changement de forme plaquettaire (une déviation de la courbe d'agrégation) en réponse au collagène^[240].

Les anomalies extra-hématologiques apparaissent progressivement et sont d'importance variable justifiant la surveillance au long cours de ces patients. En outre, différentes formes cliniques peuvent être observées au sein d'une même famille, malgré la transmission autosomique dominante.

Le syndrome MYH9 résulte des mutations du gène *MYH9* codant pour la chaîne lourde de la myosine non-musculaire de type IIA (Non-muscular myosin IIA, NMM-IIA). Deux chaînes lourdes et deux paires de chaînes légères constituent la NMM-IIA, une protéine de moteur qui est impliqué dans une variété de processus cellulaires nécessitant une force de contraction. En outre, la NMM-IIA est également essentielle dans l'organisation de la membrane de démarcation pendant la formation des proplaquettes^[23, 243].

Jusqu'à présent, au moins 49 mutations différentes ont été identifiées dans le gène *MYH9*^[208] et une base de donnée a été établie ([http://www.registromyh9.org/English version/](http://www.registromyh9.org/English%20version/)). La protéine NMM-IIA mutée forme des agrégats dans les neutrophiles (pseudo-corps de Döhle)^[244], qui est caractéristique du syndrome MYH9. Ces inclusions contiennent également la protéine NMM-IIA non mutée qui

est transcrites à partir de l'allèle normal. Cela entraîne de plus l'épuisement de la protéine et aggrave les symptômes cliniques^[245]. Les grands agrégats peuvent être observés sur le frottis sanguin par microscopie optique, apparaissant en bleu après coloration par le Wright-Giemsa or le MGG. Lorsqu'ils sont petits, la mise en évidence doit recourir aux techniques plus complexes, telles que la microscopie électronique ou la microscopie à fluorescence. Il a été rapporté que le nombre et la taille des inclusion sont en corrélation avec la localisation de la mutation^[244]. Les inclusions plus nombreuses et plus petites sont associées aux mutations dans le domaine moteur à l'extrémité N-terminale qui sont souvent à l'origine des phénotypes cliniques plus sévères.

Syndrome de Wiskott-Aldrich (OMIM 301000) : Thrombopénie microcytaire, eczéma, déficit immunitaire

Le syndrome Wiskott-Aldrich est de transmission récessive liée à l'X donc concerne que les garçons. Les conductrices obligatoires sont asymptomatiques, avec un profil hématologique et immunologique normal. Ce syndrome est défini classiquement par la triade thrombopénie microcytaire, déficit immunitaire et eczéma. Les manifestations hémorragiques dominant le tableau clinique initial, sont dues à la thrombopénie et à la présence de microplaquettes associée à une thrombopathie fréquente (de type anomalie des granules denses)^[40, 78]. Le déficit immunitaire est plus tardif, d'apparition progressive, et touche les lymphocytes T et B.

La thrombopénie microcytaire est primitivement en rapport avec un mécanisme central dû à une anomalie de la protéine WASP, codée par le gène WAS situé en Xp11.23^[246], et dont le rôle est important dans la polymérisation des filaments d'actine des cellules hématopoïétique en particulier la formation des proplaquettes^[247]. La thrombopénie est très souvent aggravée par un mécanisme périphérique d'origine auto-immune pouvant conduire à un volume plaquettaire moyen dans les limites de la normale par coexistence de plaquettes de petite taille, propres au syndrome de Wiskott-Aldrich et à des plaquettes de grande taille, habituelles dans les thrombopénies immunologiques.

5.1.5 Thrombopénies constitutionnelles sans anomalies extra-hématologiques

L'orientation diagnostique repose sur le volume plaquettaire qui permet de définir les thrombopénies microcytaires, normocytaires ou macrocytaires.

Thrombopénie microcytaire

Thrombopénie liée à l’X (XLT) (THC1, OMIM 313900)

L’anomalie génétique est identique à celle du syndrome de Wiskott-Aldrich et concerne le gène *WAS*, mais la thrombopénie est isolée sans eczéma, ni déficit immunitaire. Il s'agit de la forme modérée du syndrome de Wiskott-Aldrich qui mérite d'être individualisée car de meilleur pronostic. La thrombopénie a les mêmes caractéristiques que celle observée dans le WAS, pouvant même régresser à l'âge adulte. Bien qu'il n'y ait pas de corrélation formelle entre le génotype et le phénotype, le syndrome XLT serait le plus souvent secondaire à une diminution de synthèse de la protéine WASP par mutations faux-sens (76 %) situées principalement dans les deux premiers exons du gène *WAS* ^[248].

Thrombopénies normocytaires

Amégacaryocytose congénitale (Congenital amegakaryocytic thrombocytopenia, CAMT; OMIM 604498)

Il s’agit d’une thrombopénie constitutionnelle rare de transmission autosomique récessive, se révélant le plus souvent dans la première année de vie et pouvant évoluer vers l’aplasie médullaire ^[249]. Les manifestations hémorragiques sont précoces et peuvent être sévères (hémorragies intracérébrales, hémorragies digestives). La thrombopénie est sévère (inférieure à $30 \times 10^9/L$) avec une absence ou une diminution majeure du nombre de mégacaryocytes. Les patients ont des taux élevés de thrombopoïétine plasmatiques. Les cellules médullaires CD34+ ne peuvent pas se différencier en mégacaryocytes *in vitro*. Ce défaut de différenciation est en rapport avec une anomalie du gène *MPL* (localisé sur 1p34.2) codant pour le récepteur (c-Mpl) de la thrombopoïétine ^[250]. Au moins 15 types de mutation ont été décrits. Les patients sont le plus souvent hétérozygotes composites pour des mutations ou des délétions différentes ou homozygotes pour une mutation en cas de consanguinité ^[251].

Thrombopénie familiale autosomique dominante, liée au chromosome 10 (Thrombocytopenia 2, THC2; OMIM188000)

La thrombopénie est isolée, entre 20 et 110 G/L. Les manifestations hémorragiques sont modérées ou absentes. La morphologie et la fonction des plaquettes sont généralement normales, selon les études comprenant l’examen de frottis sanguin, les tests d’agrégation plaquettaire et la détermination de glycoprotéines par cytométrie en flux ^[208]. Toutefois, un déficit des granules α et une expression

réduite de GPIa ont été rapportés pour certains cas. L'étude de la moelle osseuse peut montrer une dysmégacaryopoïèse avec des MKs dystrophiques et de petite taille. *In vitro*, on observe un blocage de la différenciation mégacaryocytaire. Le locus responsable THC2 est localisé en 10p11-12^[252]. Les mutations sont récemment rapportées, impliquant le promoteur du gène *ANKRD26* (*ANKRD26 5'-UTR*)^[253]. Une étude récente a montré que cette anomalie génétique a été trouvée dans environ 10% des patients présentant une thrombopénie constitutionnelle, suggérant que la thrombopénie liée au gène *ANKRD26* est une forme relativement fréquente^[254].

Thrombopénie familiale avec prédisposition aux leucémies (FPD/AML; OMIM 601399)

Cette maladie rare de transmission autosomique dominant est également nommée dans la littérature anglo-saxonne FPD/AML (pour Familial platelet disorder with predisposition to acute myelogenous leukemia)^[255]. La sémiologie hémorragique est variable d'un patient à l'autre. La thrombopénie est souvent modérée (30 à 150 x 10⁹/L) avec des plaquettes d'aspect normal, mais elle est associée à une thrombopathie aspirine-like ou de type déficit en granules denses^[256]. Cela explique la symptomatologie hémorragique malgré la thrombopénie modérée. Ces patients présentent une prédisposition aux hémopathies malignes (essentiellement des leucémies) mais aussi à d'autres néoplasies pour environ 1/3 d'entre eux, qui surviennent préférentiellement entre la troisième et la sixième décennie^[208].

Les mutations à l'origine de ce syndrome intéressent le gène *RUNX1* (ou *AML1* ou *CBFA2*) qui est localisé dans la région 21q22.1-22.2^[256, 257]. Ce gène code pour le facteur de transcription CBF α (ou AML1/RUNX1) qui intervient dans la différenciation hématopoïétique.

Thrombopénies macrocytaires

Macrothrombopénie méditerranéenne (OMIM 153670)

Il s'agit d'une thrombopénie familiale autosomique dominante avec faible macrocytose plaquettaire qui est peu, voire asymptomatique^[258]. Elle est associée à une mutation (Ala156Val) hétérozygote du gène de la GPIIb α (variant Bolzano), correspondant à une forme hétérozygote de syndrome Bernard-Soulier (voir « Thrombopathies »). C'est essentiellement un diagnostic d'élimination puisque la thrombopénie n'est associée ni à une thrombopathie, et ni à un syndrome malformatif.

Thrombopénie macrocytaire liée à l'X avec dysérythropoïèse liée à GATA-1

Le gène *GATA1*, situé sur le chromosome X (Xp11.23), joue un rôle important dans l'hématopoïèse, en particulier dans la différenciation du précurseur commun érythro-mégacaryocytaire. Les mutations de ce gène, codant pour un facteur de transcription, sont à l'origine d'une thrombopénie macrocytaire associée à des signes de dysérythropoïèse avec ou sans anémie^[259]. En fonction de la mutation du gène *GATA1*, la thrombopénie est plus ou moins sévère. La mutation Val 205 Met donne la symptomatologie la plus sévère : thrombopénie inférieure à $20 \times 10^9/L$ et anémie précoce (in utero) et sévère nécessitant un support transfusionnel.

Une forme particulière de thrombopénie liée à l'X, normocytaire, est associée à β -thalassémie. Elle s'accompagne d'un déséquilibre de production des chaînes α et β responsable d'une anémie hémolytique. Cette anomalie est due à une mutation Arg 216 Gln du gène *GATA1*^[260]. La thrombopénie est modérée contrastant avec un allongement majeur du temps de saignement et une augmentation de l'aggrégation plaquettaire à l'ADP, ce qui suggère une thrombopathie^[261].

Autres macrothrompénies constitutionnelles

Une macrothrombopénie peut également s'associer à deux types de thrombopathies, le syndrome des plaquettes grises et la maladie de von Willebrand de type plaquettaire (voir dans « Thrombopathies »).

Thrombopénies avec plaquettes géantes

L'observation de plaquettes de très grande taille doit évoquer le syndrome MYH9 ou le syndrome de Bernard-Soulier (voir dans « Thrombopathies »).

5.2 THROMBOPATHIES

Les thrombopathies ou dysfonctions plaquettaires sont la conséquence d'anomalies qualitatives des plaquettes. Elles peuvent concerner chaque étape de la physiologie plaquettaire. A l'inverse des thrombopathies acquises qui sont habituellement secondaires à la prise d'un médicament (e.g., les anti-agrégants plaquettaires) ou à une maladie (e.g., urémie, cirrhose et hémopathies), les thrombopathies résultant d'anomalies génétiques sont beaucoup plus rares.

Il existe plusieurs méthodes de classification pour ces pathologies très hétérogènes^[82, 115, 129, 262]. En fonction d'anomalies des composants plaquettaires, elle peuvent être largement classées en^[263] : (1) anomalies des récepteurs plaquettaires pour les protéines adhésives; (2) anomalies des récepteurs plaquettaires pour des agonistes solubles; (3) anomalies des granules plaquettaires; (4) anomalies

des voies de signalisation; (5) anomalies des phospholipides membranaires; et (6) diverses anomalies de la fonction plaquettaire.

5.2.1 Anomalies des récepteurs plaquettaires pour les protéines adhésives

Syndrome de Bernard-Soulier (OMIM 231200)

Ce syndrome se caractérise par un déficit quantitatif ou qualitatif du complexe GPIb-IX-V, récepteur indispensable à l'adhérence plaquettaire et qui se lie au vWF^[64]. Son mode de transmission est autosomique récessif. La prévalence est estimée à 1/1 million^[61]. Les patients présentent un syndrome hémorragique grave du fait de l'anomalie à la fois fonctionnelle et quantitative des plaquettes. La thrombopénie, d'importance variable (20 à 150 x 10⁹/L), est associée à la présence dominante (>80%) de plaquettes géantes et à une thrombopathie avec un défaut d'adhérence au sous-endothélium par le biais du facteur Willebrand. Celle-ci est révélée par l'absence d'agglutination plaquettaire en présence de ritocétine ou de botrocétine, non corrigée par l'adjonction de plasma normal. L'agrégation plaquettaire est normale en réponse aux agonistes physiologiques (ADP, collagène), à l'exception de la thrombine à faibles concentrations, car GPIb α joue un rôle important dans l'activation par la thrombine^[92].

Le déficit de ce complexe peut être mis en évidence par cytométrie en flux ou Westernblot. A noter que l'expression relativement normale de ce complexe peut être observée dans les formes où les mutations rendent le récepteur non-fonctionnel^[67]. Les anomalies les plus souvent retrouvées intéressent la sous-unité GPIb α . D'autres mutations ont été décrites sur les sous-unités GPIb β et GPIX mais jamais sur la GPV^[40]. Le défaut du complexe GPIb-IX-V est responsable de la thrombopénie à plaquettes géantes par altération des interactions entre la membrane et le cytosquelette plaquettaire mais aussi par défaut de maturation des mégacaryocytes. Plus de 50 mutations différentes ont été identifiées^[67].

Maladie de von Willebrand de type plaquettaire (OMIM 177820)

De transmission autosomique dominante, la maladie est causée par des mutations du gène codant GPIb α situé sur le chromosome 17. Elle se caractérise par une augmentation de l'affinité de la GPIb α pour le vWF soluble, ce qui est à l'origine du blocage du GPIb α et de l'élimination du vWF circulant^[264]. Elle comporte les mêmes caractéristiques cliniques et biologiques que la maladie de von Willebrand de type 2B, où l'anomalie réside sur le vWF (localisé sur le chromosome 12) : la diminution du taux de vWF et des multimères de haut poids moléculaire plasmatique,

l'agglutination plaquettaire *in vitro* en présence de faibles concentrations de ristocétine, et une thrombopénie plus ou moins importante avec présence de macroplaquettes. Le diagnostic différentiel entre les deux maladies peut être orienté par des épreuves croisées (le plasma du patient et les plaquettes normales, plasma normal et les plaquettes du patient) et une approche génétique moléculaire^[265].

Thrombasthénie de Glanzmann

De transmission autosomique récessive, la thrombopathie est liée à un déficit quantitatif ou qualitatif du complexe GPIIb/IIIa ou intégrine α IIb β 3 dû à mutations du gène *ITGA2B* ou *ITGB3*. Il s'agit de l'une des thrombopathies hémorragiques les plus graves à cause de défaut de l'agrégation plaquettaire. Il n'y a dans ce cas, ni thrombopénie, ni plaquettes géantes. La caractéristique biologique de la maladie est l'absence de l'agrégation plaquettaire associée à un changement normal de la forme plaquettaire en réponse à tous les agonistes, à l'exception de la ristocétine qui induit une agglutination normale dont le maximal est réduit^[92]. L'incorporation du fibrinogène des granules α plaquettaires et la rétraction du caillot sont absentes, car ces processus nécessitent le complexe GPIIb/IIIa. L'analyse par cytométrie en flux permet d'identifier le défaut de l'intégrine α IIb β 3; Ceci peut être complété par westernblot et un séquençage sélectif de gènes *ITGA2B* et *ITGB3*^[40]. Les mutations sont spécifiques pour chaque famille. Une base de données a été établie et peut être trouvée sur le site : <http://sinaicentral.mssm.edu/intranet/research/glanzmann>)

5.2.2 Anomalies des récepteurs plaquettaires pour des agonistes solubles

Des anomalies de récepteurs spécifiques à un agoniste ont été décrites pour l'ADP, le TXA₂, le collagène et l'épinéphrine. L'ADP et le TXA₂ jouent un rôle dans l'amplification des réponses plaquettaires à plusieurs autres agonistes. Ainsi, les patients atteints des anomalies de ces récepteurs pour l'ADP ou le TXA₂ présentent également une réponse d'agrégation diminuée à d'autres agonistes y compris le collagène et la thrombine à faibles concentrations.

ADP

Les platelets possèdent deux types de récepteurs à l'ADP : P2Y₁, P2Y₁₂. Les patients atteints du déficit en P2Y₁₂ ont seulement une agrégation primaire minimale et réversible à toutes les concentrations d'ADP, ce qui simule l'anomalie de fonction plaquettaire causée par les antagonistes de P2Y₁₂ tels que clopidogrel et prasugrel. De rares cas avec mutation génétique de P2Y₁₂ ont été

rapportés^[263, 266]. La fonctionnalité de P2Y12 peut être vérifiée de façon spécifique par le test VASP (voir « Exploration biologique des plaquettes »). Seulement un cas avec déficit en P2Y1 a été rapporté^[267].

TXA2

Une mutation du récepteur du TXA2 (TP α) a été rapportée chez des patients japonais^[268]. Il se caractérise par une absence d'agrégation plaquettaire en réponse à l'acide arachidonique et TXA2 analogue U46619.

Collagène

Il existe au moins deux récepteurs plaquettaires qui sont impliqués dans la réponse au collagène : GPVI et α 2 β 1. Les défauts de ces deux récepteurs sont caractérisés par une absence sélective de l'agrégation plaquettaire induite par le collagène. Cette anomalie spécifique de GPVI peut être révélée par absence d'agrégation au CRP (*Collagen Related Protein*) et confirmée par la cytométrie en flux.

Bien qu'un syndrome hémorragique ait été rapporté associé au déficit en GPVI ou α 2 β 1, aucune anomalie génétique de ces deux récepteurs n'a été bien identifiée^[82].

A noter que la fixation par les auto-anticorps peut conduire à une perte substantielle de GPVI plaquettaire via le clivage par la métalloprotéase^[269]. En outre, il est bien documenté que la densité de récepteurs GPVI et α 2 β 1 est affectée par le polymorphisme génétique (SNPs) et d'autres facteurs épigénétique^[270]. La perte acquise de GPVI peut également être associée à des syndromes myéloprolifératifs^[271] et au syndrome des plaquettes grises^[272]. L'absence de l'activation plaquettaire induite par le collagène a été associée à des mutations dans le gène *GP6*, mais le mode de transmission n'est pas connu^[273].

Epinéphrine

L'agrégation induite par l'épinéphrine, médiée par le récepteur adrénergique- α 2, peut être variable ou même altérée chez certains individus vraisemblablement normales. Une absence d'agrégation secondaire a été observée dans 10 à 15% des sujets normaux dans une étude^[274]. Le niveau d'expression de ce récepteur peut être affecté par de nombreux facteurs y compris le polymorphisme génétique, l'âge, l'exercice et des pathologies telles que les maladies cardiaques^[58]. Malgré que des déficits congénitaux du récepteur adrénergique- α 2 ont été rapportés associés à une réponse

plaquettaire diminuée à l'adrénaline, une relation entre les hémorragies et les déficits de ce récepteur n'est pas encore établie^[82].

5.2.3 Anomalies des granules plaquettaires

La maladie du pool vide (storage pool deficiency, SPD) est définie par une réduction du nombre ou contenu des granules plaquettaires. Elle peut concerner les granules- α (α -SPD), les granules denses (δ -SPD) ou mixtes ($\alpha\delta$ -SPD). Ces pathologies peuvent être isolées ou associées à des syndromes dont les principaux sont énumérés dans le Tableau XV.

Tableau XV. Les principaux syndromes associés aux anomalies des granules plaquettaires^[76].

Syndrome	Bleeding symptoms	Platelet count $\times 10^9/l$	Platelet ultrastructure	Inheritance (gene)	Platelet function abnormality	Associations
<i>α-Storage pool disease (α-SPD)</i>						
GPS	mild to moderate	30–100	↓/ empty α -granules, ↑ platelet size	autosomal recessive (most) or dominant (gene(s) unknown)	normal or ↓ aggregation with thrombin, collagen	myelofibrosis
QPD	mild to moderate	normal or ↓	↓ α -granule content	autosomal dominant (<i>PLAU</i>)	↓ aggregation with epinephrine	
ARC syndrome	mild	normal	lack of α -granules, ↑ platelet size	autosomal recessive (<i>VPS33B</i> , <i>VIPAR</i>)	↓ aggregation with ADP, arachidonate	arthrogryposis multiplex congenita, renal dysfunction, cholestasis, ichthyosis, recurrent infections
<i>δ-Storage pool disease (δ-SPD)</i>						
HPS (subtype 1–8)	moderate to severe	normal	↓ dense granules	autosomal recessive (<i>HPS1–HPS8</i>)	↓ second wave of aggregation	oculocutaneous albinism, α roidlipo-fuscinosis, nystagmus, ↓ visual acuity, (HPS2: immunodeficiency, HLH; HPS1,4: granulomatous colitis, pulmonary fibrosis)
CHS	moderate to severe	normal	↓ dense granules, giant inclusion bodies	autosomal recessive (<i>LYST</i>)	↓ second wave of aggregation, ↑ ATP/ADP ratio	partial albinism, immunodeficiency, HLH, neurological defects, hepatosplenomegaly
GS (subtype 1–3)	mild to absent	normal or ↓	n.d.	autosomal recessive (<i>MYO5A</i> , <i>RAB27A</i> , <i>MLPH</i>)	n.d.	partial albinism, silver hair, (GS1: neurological defects; GS2: immunodeficiency)
<i>$\alpha\delta$-Storage pool disease ($\alpha\delta$-SPD)</i>						
X-linked dyserythropoietic anemia with thrombocytopenia/ X-linked macrothrombocytopenia	moderate	mostly ↓	↓ dense granules, variable α -granules, ↑ platelet size	X-linked dominant, (<i>GATA1</i>)	↓ aggregation	β -thalassemia, congenital erythropoietic porphyria
WAS	moderate to severe	10–100	↓ granules, ↓ platelet size	X-linked recessive (<i>WAS</i>)	↓ aggregation	eczema, immunodeficiency, risk for autoimmune disorders

n.d. = Not detected.

δ-SPD

Le δ-SPD ou déficit en granules denses se traduit par une agrégation des plaquettes anormale : diminuée en présence de collagène et d'acide arachidonique à concentrations faibles à intermédiaires, monophasique (absence d'agrégation secondaire) et réversible en présence d'ADP (2 à 5 µM) ou d'adrénaline et généralement normale en présence de ristocétine^[92]. Le profil d'agrégation est similaire à celui de déficit de P2Y12. Toutefois, l'altération de réponse à l'ADP est plus sévère dans les déficits de P2Y12 : même à des concentrations très élevées (> 10 µM), l'ADP ne provoque qu'une agrégation minimale et rapidement réversible; alors, l'agrégation des δ-SPD peut s'améliorer voire être complète lors des fortes concentrations d'ADP^[92]. Le diagnostic est évoqué lors d'un profil d'agrégation anormal et une sécrétion d'ATP diminuée par les plaquettes activées. La confirmation de diagnostic nécessite des techniques plus complexes, telles que la microscopie électronique, le dosage des nucléotides ou de la sérotonine par HPLC ou ELISA^[123] (voir « Exploration biologique des plaquettes »).

Le δ-SPD peut s'associer à des syndromes, dont les syndromes de Hermansky-Pudlak (Hermansky-Pudlak syndrome, HPS), de Chediak-Higashi (Chediak-Higashi syndrome, CHS) et de Griscelli (Griscelli Syndrome, GS) ayant pour caractéristique commune hypopigmentation de la peau et des cheveux et un mode de transmission autosomique récessif. Le δ-SPD a été également décrit dans les syndromes TAR, FPD/AML et WAS (voir « Les thrombopénies constitutionnelles »).

HPS

Le syndrome de Hermansky-Pudlak est caractérisé par l'albinisme oculo-cutané de type tyrosinase-positif et une accumulation de la lipofuscine céroïde dans le système réticulo-endothélial, impliquant des anomalies des mélanosomes, des granules denses plaquettaires et des lysosomes. HPS peuvent être causés par des mutations dans des loci génétiques différents, dont neuf gènes ont été identifiés (*HPS1* à *HPS9*)^[262]. Les phénotypes cliniques sont variables, en relation avec les génotypes. Dans une grande proportion des patients, le développement d'une fibrose pulmonaire et une colite granulomateuse sont observés. Dans certains cas, peuvent s'associer une neutropénie, des infections répétées, une surdité et des complications neurologiques^[76].

CHS

Le CHS est caractérisé par un albinisme oculo-cutané de degré variable, de très gros granules

cytoplasmiques peroxydase positif dans de nombreuses cellules hématopoïétiques (neutrophiles) et non hématopoïétiques, des infections répétées dues à des anomalies immunologiques sévères (neutropénie, altération du chimiotactisme et des activités bactéricides, des fonctions anormales des cellules NK) et une dysfonction neurologique progressive^[76, 275]. Les mutations du gène *LYST* (localisé sur chromosome 1) sont responsables de cette maladie^[276].

GS

Le syndrome de Griscelli est caractérisé par un reflet argenté des cheveux et une hypopigmentation de la peau qui peuvent être associés à une atteinte neurologique (type 1), une immunodéficience (type 2) ou être isolée (type 3)^[76]. Une accumulation de grands mélanosomes anormaux dans le centre de mélanocytes est habituellement présente. Correspondant à trois formes cliniques, trois gènes en cause ont été identifiés, à savoir *MYO5A* pour le type 1, *RAB27A* pour le type 2 et *MLPH* pour le type 3. Les produits de ces gènes sont impliqués dans le transport des mélanosomes et ainsi que dans la libération des granules par les lymphocytes T cytotoxiques (protéine Rab27a).

α -SPD

Des carences spécifiques des protéines stockées dans les granules α peuvent être associées à des maladies héréditaires concernant des protéines plasmatiques correspondantes (par exemple, le fibrinogène dans l'afibrinogénémie et la thrombasthénie de Glanzmann, VWF dans le VWD de type 3). Seulement les pathologies spécifiques pour les déficits en granules α seront décrites ici.

Syndrome des plaquettes grises (SPG) (OMIM 139090)

Le syndrome des plaquettes grises est caractérisé par l'absence de granules α et une thrombopénie modérée avec présence de macroplaquettes. Les plaquettes apparaissent grises, agranulaires sur frottis sanguin coloré au MGG, ce qui est à l'origine de la dénomination. Une autre caractéristique de ce syndrome est l'apparition précoce d'une myélofibrose, qui est attribuée à la libération spontanée de facteurs de croissance synthétisés par les MKs anormaux^[277, 278].

Les études d'agrégation plaquettaire montrent des résultats variables chez des patients SPG : le plus rapporté est une réponse diminuée à la thrombine et au collagène liée au défaut de leurs récepteurs (PAR-1, PAR-4 et GPVI), tandis que l'agrégation plaquettaire induite par l'ADP, l'acide arachidonique et l'adrénaline sont habituellement normaux.

Le diagnostic est confirmé par l'absence de granules plaquettaires en microscopie électronique et

par la mise en évidence d'un déficit des protéines spécifiques aux granules α (PF4, β -thromboglobuline) par ELISA par exemple. A noter que les protéines membranaires des granules α sont normales dans ce syndrome, compatibles avec la mise en évidence de la présence de granules vides dans les plaquettes, ce qui suggère un déficit au niveau de l'emballage et du stockage des protéines^[67]. Le gène *NBEAL2* (localisé sur 3p21.31) a été récemment identifié dans ce syndrome^[279-281].

Le syndrome d'arthrogrypose - insuffisance rénale - cholestase (syndrome ARC)

C'est une maladie multisystémique autosomique récessive caractérisée par une arthrogrypose multiplex congenita neurogène, un dysfonctionnement tubulaire rénal et une cholestase néonatale avec une activité sérique réduite en gamma-glutamyl transférase. Le déficit des granules α plaquettaires dans ce syndrome est lié aux mutations du gène *VPS33B* (vacuolar protein sorting gene 33B) qui est impliqué dans la biogenèse des granules α . Le contenu et ainsi que les protéines membranaires des granules α sont défectueux^[282].

Syndrôme plaquettaire du Québec (Quebec platelet disorder, QPD, OMIM 601709)

De transmission autosomique dominante, le syndrome plaquettaire du Québec est caractérisé par des hémorragies sévères posttraumatiques qui sont résistantes aux transfusions plaquettaires et qui répondent au traitement anti-fibrinolytique, un excès de l'activateur du plasminogène de type urokinase (u-PA) dans les plaquettes qui conduit à une dégradation des protéines dans les granules α . La thrombopénie est modérée ou absente, et la morphologie plaquettaire est normale. L'étude d'agrégation plaquettaire montre une réponse fortement anormale à l'adrénaline, dont la raison n'est pas encore connue. Les protéines des granules α telles que le facteur V, la multimérine, le fibrinogène, le VWF, la thrombospondine, la fibronectine, la P-sélectine et l'ostéonectine sont dégradées de manière significative dans les plaquettes QPD. En revanche, le facteur plaquettaire 4 et la β -thromboglobuline ne semblent pas être affectés^[67]. L'anomalie génétique est une duplication en tandem de *PLAU*, le gène de u-PA^[283].

$\alpha\delta$ -SPD

Le déficit à la fois en granules α et granules δ a été rapporté dans la thrombopénie macrocytaire liée à l'X avec dysérythropoïèse et GATA-1 et ainsi que le WAS^[76] (voir « Les thrombopénies constitutionnelles »).

5.2.4 Anomalies des voies de signalisation

De nombreux déficits de molécules dans les voies de signalisation intracellulaires ont été décrits dans la littérature^[82], dont on cite :

- déficit des protéines liées au GTP, telles que *Gαq*, *Gαi2*, et *Gαs*;
- anomalies de la production de messagers secondaires IP3 et DAG : déficit de PLC-β2;
- anomalies de la mobilisation de calcium;
- anomalies dans la phosphorylation : déficit de PKC-θ;
- anomalies dans la voie de synthèse de TXA2 (déficits de PLA2, COX-1, synthase de TXA2)

De nombreux travaux actuels font progresser la compréhension de ces anomalies de la voie de signalisation^[284, 285].

5.2.5 Anomalies des phospholipides membranaires

Syndrome de Scott

C'est une maladie hémorragique extrêmement rare^[286]. Les patients présentant ce syndrome ont un bilan d'hémostase normal à l'exception du test de consommation de prothrombine. L'anomalie en cause est un défaut d'exposition de phosphatidylsérine (PS) à la surface des plaquettes activées, mécanisme essentiel pour l'assemblage des complexes d'activation de la coagulation. Il en résulte une diminution de la génération de la thrombine et ainsi la formation de fibrine au site de lésions vasculaires. De même, la libération de microparticules plaquettaires procoagulantes est en outre pratiquement inexistante chez les patients, ce qui contribue probablement à la tendance hémorragique. Le défaut d'exposition de PS peut être mis en évidence par marquage fluorescent de l'annexine V détecté par cytométrie en flux. Pour l'anomalie génétique responsable, une mutation de ABCA1 (ATP-binding cassette transporter A1) a été identifiée pour un patient^[287], tandis que des mutations du gène *TMEM16F* codant pour un canal calcique transmembranaire ont été trouvées dans d'autres cas^[55, 288].

PARTIE II : TRAVAUX DE RECHERCHE

ETUDE 1 : ETAT DES CONNAISSANCES SUR LES PATHOLOGIES PLAQUETTAIRES EN CHINE : REVUE DE LA LITTERATURE

RESUME

L'objectif est d'évaluer l'état des connaissances sur les pathologies plaquettaires constitutionnelles en Chine. En effet, dans le cadre de la collaboration franco-chinoise établie entre les facultés de Wuhan et de Nancy, ma directrice de thèse a eu pour mission d'enseigner sur la thématique des pathologies plaquettaires constitutionnelles aux étudiants chinois et aux praticiens du Service d'Hématologie (2013) ; durant cette rencontre, il a été observé une méconnaissance de cette thématique. D'ailleurs, je reconnais n'avoir jamais eu de cours durant mon cursus médical sur cette thématique. Ainsi nous avons réalisé une recherche documentaire en utilisant des bases de données de la littérature scientifique comme PubMed, CNKI (<http://www.cnki.net/>), wanfangdata (<http://www.wanfangdata.com.cn/>) et Chongqing vip (<http://www.cqvip.com/>) (3 bases de données chinoises) sur les publications en anglais ou chinois publiées par la communauté médicale chinoise. Cinquante-cinq publications ont été trouvées et analysées. Les pathologies les plus rapportées sont la thrombathénie de Glanzmann, le syndrome Wiskott-Aldrich et le syndrome de MYH9. Les auteurs provenaient essentiellement des villes de Suzhou, Shanghai, Hong Kong et Taipei. Ces observations nous ont permis de conclure que les pathologies plaquettaires constitutionnelles sont très méconnues et peu diagnostiquées dans la grande majorité des villes en Chine, ce qui nécessite la formation des équipes de soins et la diffusion des informations.

INTRODUCTION

Les pathologies plaquettaires constitutionnelles constituent un ensemble de maladies rares souvent méconnues et diagnostiquées à tort dans le monde entier. Cependant, le diagnostic précis est essentiel pour la prise en charge de ces patients comme illustré dans le chapitre précédent. La Chine est le pays ayant la population la plus grande du monde (1.4 milliards) et donc il y existe certainement un très grand nombre de patients atteints de pathologies plaquettaires constitutionnelles. Une bonne connaissance permettrait la prise en charge de ces patients de façon adaptée et d'éviter des traitements inutiles et potentiellement iatrogènes. Dans le cadre de collaboration entre Nancy et Wuhan, une forte méconnaissance des pathologies plaquettaires

constitutionnelles en Chine a été observée par ma directrice lors de ses enseignements réalisés à la faculté de Médecine de l'Université Wuhan et lors de ses rencontres avec ses collègues de la discipline hématologie. De ce fait, nous proposons de faire une revue de la littérature pour mieux connaître l'état des connaissances des médecins chinois sur ces pathologies.

METHODES

Recherche documentaire

Nous avons réalisé la recherche en utilisant les bases de données de la littérature scientifique, y compris PubMed pour les références en anglais, CNKI (<http://www.cnki.net/>), wanfangdata (<http://www.wanfangdata.com.cn/>) et Chongqing vip (<http://www.cqvip.com/>) pour les références en chinois. Les publications pertinentes ont été trouvées en utilisant les mots clés suivants : “inherited”, “congenital”, “hereditary”, combinés avec “platelet disorder”, “platelet”, “thrombocytopenia”, et “China” or “Chinese”. Les bibliographies des publications ont été également examinées pour chercher des publications pertinentes supplémentaires.

RESULTATS

Cinquante-cinq publications ont été trouvées et analysées (voir le Tableau XVI), dont 25 en anglais et 30 en chinois, sur une période de 27 ans (1987-2014). Dans la Figure 13, les articles ont été regroupés en fonction du sujet (types de pathologie plaquettaire ou article de revue). Dans la Figure 14, l'adresse des auteurs a été utilisée pour classer les publications.

Tableau XVI. Les publications des pathologies plaquettaires constitutionnelles de la population

Chinoise.

No	Année	Premier auteur	Pathologie plaquettaire	Ville des auteurs	Langue
1	1987	Du X ^[289]	BSS	Suzhou	Anglais
2	1987	Ruan CG ^[290]	BSS	Suzhou	Anglais
3	1987	Ruan CG ^[291]	GT	Suzhou	Chinois
4	1988	Ruan CG ^[292]	GT	Suzhou	Chinois
5	1990	Wu G ^[293]	Granules alpha	Suzhou	Anglais
6	1992	Lau YL ^[294]	WAS	Hong Kong	Anglais
7	1992	Lau YL ^[295]	WAS	Hong Kong	Anglais
8	1993	Zhang GS ^[296]	Revue	Changsha	Chinois
9	1996	Huang MT ^[297]	WAS	Taipei	Anglais
10	1998	Lin JS ^[298]	MYH9	Taipei	Anglais
11	1998	Leung TF ^[299]	MYH9	Hong Kong	Anglais

12	2000	Chen FP ^[300]	GT	Changsha	Chinois
13	2001	Wang ZY ^[301]	BSS	Suzhou	Chinois
14	2001	Wang ZY ^[302]	Autre cas clinique	Suzhou	Anglais
15	2002	Wang ZY ^[303]	Autre cas clinique	Suzhou	Chinois
16	2002	Meng FB ^[304]	Revue	Unconnu	Chinois
17	2002	Chan KW ^[305]	WAS	Hong Kong	Anglais
18	2003	Zhao XJ ^[306]	BSS	Suzhou	Chinois
19	2003	Xi L ^[307]	BSS	Suzhou	Chinois
20	2004	Wang ZY ^[308]	BSS	Suzhou	Anglais
21	2004	Yuan XY ^[309]	GT	Changsha	Chinois
22	2004	Rao YF ^[310]	MYH9	Nanchang	Chinois
23	2004	Hu YL ^[311]	Revue	Nanjing	Chinois
24	2004	Chien YH ^[312]	WAS	Taipei	Anglais
25	2005	Fu B ^[313]	GT	Changsha	Chinois
26	2005	Chen WZ ^[314]	GT	Shanghai	Chinois
27	2005	Lin FR ^[315]	Revue	Shijiazhuang	Chinois
28	2006	Wang XY ^[316]	GT	Tianjin	Chinois
29	2006	Ma ES ^[317]	MYH9	Hong Kong	Anglais
30	2006	Wu SY ^[318]	Autre cas clinique	Suzhou	Chinois
31	2006	Wu SY ^[319]	Autre cas clinique	Suzhou	Anglais
32	2006	Su Y ^[320]	Phytostérolémie	Suzhou	Anglais
33	2007	Jiang TH ^[321]	WAS	Taipei	Anglais
34	2008	Jin PP ^[322]	GT	Shanghai	Chinois
35	2008	Chen WZ ^[323]	GT	Shanghai	Chinois
36	2008	Jin PP ^[324]	GT	Shanghai	Chinois
37	2008	Yang HY ^[325]	MYH9	Suzhou	Chinois
38	2008	Lee WI ^[326]	WAS	Taipei	Anglais
39	2009	Yu TT ^[327]	GT	Shanghai	Chinois
40	2009	Yap DY ^[328]	MYH9	Hong Kong	Anglais
41	2009	Lee PP ^[329]	WAS	Hong Kong	Anglais
42	2010	Qin HH ^[330]	GT	Shanghai	Chinois
43	2010	Sun HX ^[331]	Revue	Suzhou	Chinois
44	2010	Lee WI ^[332]	WAS	Taipei	Anglais
45	2010	Zhang ZY ^[333]	WAS	Chongqing	Anglais
46	2011	Cui QY ^[334]	GT	Suzhou	Chinois
47	2011	Wang G ^[335]	Phytostérolémie	Suzhou	Anglais
48	2011	Lin HL ^[336]	Revue	Guangzhou	Chinois
49	2012	Wu XH ^[337]	MYH9	Heilongjiang	Chinois
50	2012	Wu XH ^[338]	MYH9	Heilongjiang	Chinois
51	2012	Wang G ^[339]	Phytostérolémie	Suzhou	Anglais
52	2012	Zhou FF ^[340]	Revue	Tianjin	Chinois
53	2013	Shi RM ^[341]	GT	Xi'an	Chinois
54	2013	Jin PP ^[342]	GT	Shanghai	Anglais
55	2014	Wang ZY ^[343]	Phytostérolémie	Suzhou	Anglais

DISCUSSION

Comme le montre la Figure 14, la pathologie plaquettaire la plus publiée dans la population chinoise est la thrombasthénie de Glanzmann (GT) (15 références, 27%), suivie par le syndrome Wiscott-Aldrich (WAS) (10, 18%), le syndrome MYH9 (8, 15%), le syndrome Bernard-Soulier (BSS) (6, 11%) et la phytostérolémie avec macrothrombocytopenie (4, 7%). Le reste comprend 7 revues (13%) qui sont toutes en chinois et six d'entre eux concernent les thrombopénies constitutionnelles, 4 rapports de cas cliniques et un article à propos des granules α .

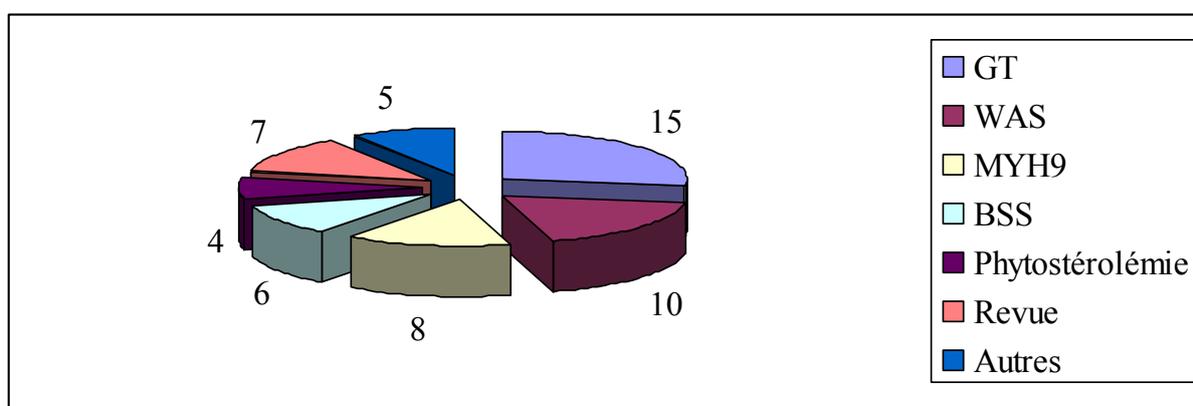


Figure 14. Répartition des publications en fonction de la pathologie.

A noter que plusieurs grandes cohortes de patients ont été publiées, y compris une série de 25 cas avec GT^[300], 3 séries de patients atteints de WAS (35 cas dans réf 329, 24 cas dans la réf 333, 16 cas dans réf 332)

Dans la Figure 15, on constate que plus d'un tiers des articles (20 sur 56) a été publiés par des auteurs de l'Université de Suzhou, dont les pathologies concernées sont BSS (6 publications), la phytostérolémie (5), GT (3), MYH9 (1) et divers (6). Sept publications de l'Hôpital Ruijin de Shanghai sont toutes à propos de GT, ce qui est similaire à celle de Changsha avec 3 sur 4 articles concernant GT. Les publications de Taiwanais (ville de Taipei) est centrées sur WAS (5 publications) et MYH9 (1), de même pour Hong Kong avec 4 articles sur WAS et 3 sur MYH9. Très peu de publications sur les pathologies plaquettaires constitutionnelles ont été trouvées en provenance d'autres régions de la Chine : Tianjin (2), Heilongjiang (2), Chongqing (1), Guangzhou (1), Nanjing (1), Xi'an (1), Nanchang (1) et Shijiazhuang (1).

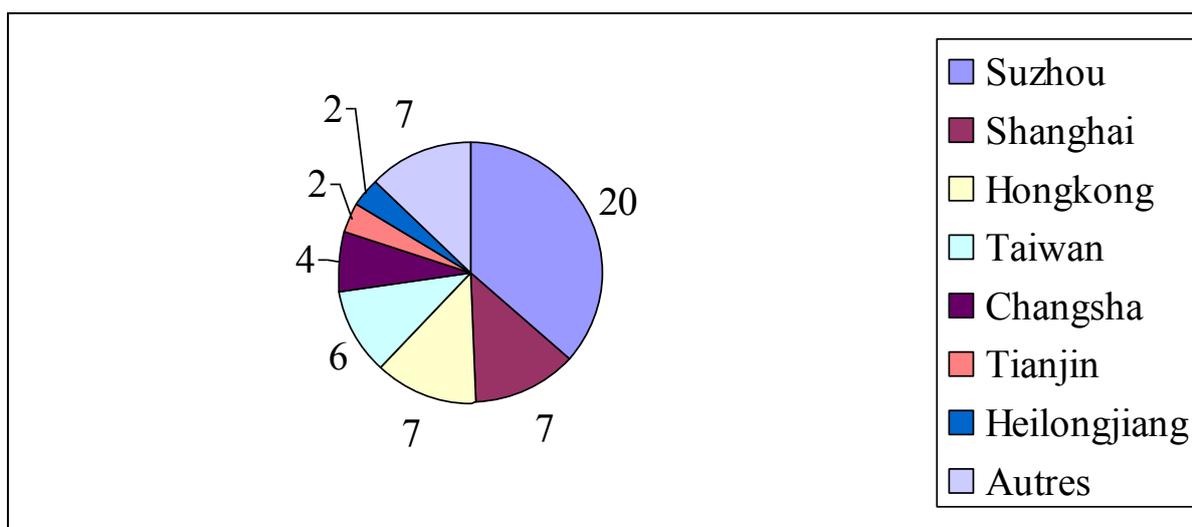


Figure 15. Répartition des publications en fonction de ville.

La répartition géographique des publications permettrait de refléter dans une certaine mesure le niveau socio-économique. Les villes comme Suzhou, Shanghai, Hong Kong et Taipei sont celles qui sont mieux développées au niveau économique et scientifique. L'analyse plus attentive de ces publications montre que les centres de Suzhou et Shanghai sont performants pour le diagnostic génétique et les recherches fondamentales, tandis que les centres de Hong kong, Taipei ainsi que de Chongqing sont caractérisés par leur plus grande expérience dans la prise en charge des patients atteints de WAS, surtout avec la greffe de cellules souches hématopoïétiques.

Cependant, au vue de la surface de la Chine, ces centres compétents ne couvrent qu'une petite proportion de la population Chinoise. Dans la grande majorité des villes en Chine, les pathologies plaquettaires constitutionnelles sont très probablement peu connues et peu diagnostiquées, comme le dévoile cette étude documentaire. En outre, les types de pathologies rapportées sont celles dont le diagnostic est relativement facile à établir en raison de leurs symptômes hémorragiques importantes et/ou des anomalies biologiques évidentes. Toutefois, ces entités sont très rares et elles ne représentent qu'une minorité des pathologies plaquettaires constitutionnelles (voir le chapitre précédent). Ce qui justifie la nécessité de la formation des équipes de soins et la diffusion des informations sur cette thématique.

Dans mon expérience personnelle, je n'ai jamais eu de formation sur les pathologies plaquettaires constitutionnelles pendant mes études en médecine à Wuhan, une ville au centre de la Chine.

Pendant mon stage à l'Hôpital de Zhongnan à Wuhan, ces pathologies n'ont jamais été abordées.

Dans le cadre de la filière médicale francophone, Pr Liu de l'équipe d'Hématologie de l'Hôpital de Zhongnan (Wuhan, la province de Hubei) a établi un travail collaboratif avec Dr Véronique Latger-Cannard, du service d'Hématologie Biologique du CHRU de Nancy, référente dans les pathologies plaquettaires au sein du réseau Français du Centre de Référence des Pathologies Plaquettaires. Le but est d'utiliser des moyens cliniques et biologiques existants déjà pour optimiser le diagnostic des thrombopénies constitutionnelles en passant par la formation des étudiants et du personnel médical. Les objectifs sont d'une part de sensibiliser du personnel médical à l'existence de ces pathologies rares et d'autre part de mieux connaître les outils existants (par exemple, analyseurs d'hématimétrie et analyse morphologique sur frottis sanguin) pour optimiser le diagnostic des thrombopénies et thrombopathies constitutionnelles. L'équipe Nancéienne (Dr V. Latger-Cannard) apportera sa contribution pour valider tout nouveau diagnostic, assurer une aide dans le suivi et apporter des conseils dans la prise en charge thérapeutique. La mise en place de ce réseau collaboratif franco-chinois devrait permettre d'améliorer le diagnostic et la prise en charge de ces patients.

Pour le premier pas de cette collaboration, nous avons rédigé et publié un article sur la thématique des thrombopénies constitutionnelles en langue chinoise dans une revue largement diffusée en clinique. Dès mon retour à Wuhan, je ciblerai mes efforts sur le diagnostic de ces pathologies plaquettaires et je poursuivrai ma collaboration avec Dr Latger-Cannard.

Article en Chinois publié

ARTICLE : CLINICAL-BIOLOGICAL DIAGNOSIS FOR HEREDITARY THROMBOCYTOPENIAS

Cai Huili^{1,2}, Liu Shangqin², Zhou Yi², Tu Jiancheng³, STOLTZ Jean François^{4,5},
LATGER-CANNARD Véronique^{1,5,6}

¹Department of Biological Hematology, CHU Nancy, Nancy, France

²Department of Clinical Hematology, Zhongnan Hospital, Wuhan, China

³Central laboratory of Zhongnan Hospital, Wuhan, China

⁴Cells and Tissue Therapy Unit, CHU Nancy, Nancy, France

⁵CNRS Unit 7365 IMoPA, Laboratory of Molecular Engineering and Articular Pathophysiology,
National Center for Scientific Research-University of Lorraine, Faculty of Medicine, Nancy, France

⁶Grand East Competence Center on Inherited Platelet Disorder, CHU Nancy, Nancy, France

Corresponding author: LATGER-CANNARD Véronique, Email: v.cannard@chu-nancy.fr

Abstract

Hereditary thrombocytopenias (or inherited thrombocytopenias) are a heterogeneous group of rare diseases characterized by a reduced number of blood platelet. In the past few decades, tremendous advances have been achieved in the understanding the molecular basis of these disorders, including identification of many defective genes in most cases. However, the pathophysiology is often unknown and the diagnosis is rarely straightforward. In the review, we summarized our knowledge of inherited thrombocytopenias and those from the literature in the classification, clinical manifestations, and particularly in the laboratory features of platelet numeration and morphology. This would provide valuable insights for clinicians and biologists in the diagnostic approaches to such disorders.

Keywords: Thrombocytopenia; Platelet count; Diagnosis

遗传性血小板减少症的诊断

蔡惠丽 刘尚勤 周怡 涂建成 STOLTZ Jean François LATGER-CANNARD Véronique

【摘要】 遗传性血小板减少症是一类以血小板减少为特征的罕见疾病。近几十年来, 尽管该疾病的分子发病基础研究取得了显著进展, 如发现大部分患者存在异常表达的基因, 然而, 其病理生理机制目前仍不十分清楚, 诊断也较为困难。本文结合文献和我们的实践经验, 对遗传性血小板减少症的分类、临床表现以及实验室血小板计数和形态学的特点作一综述, 以助于提高临床医师和检验医师对该类疾病的诊断。

【关键词】 血小板减少; 血小板计数; 诊断

Clinical-biological diagnosis for hereditary thrombocytopenias Cai Huili^{*}, Liu Shangqin, Zhou Yi, Tu Jiancheng, STOLTZ Jean François, LATGER-CANNARD Véronique. *Department of Clinical Hematology, Zhongnan Hospital, School of Medicine, Wuhan University, Wuhan 430071, China*
Corresponding author: LATGER-CANNARD Véronique, Email: v.cannard@chu-nancy.fr

【Abstract】 Hereditary thrombocytopenias (or inherited thrombocytopenias) are a heterogeneous group of rare diseases characterized by a reduced number of blood platelet. In the past few decades, tremendous advances have been achieved in the understanding the molecular basis of these disorders, including identification of many defective genes in most cases. However, the pathophysiology is often unknown and the diagnosis is rarely straightforward. In the review, we summarized our knowledge of inherited thrombocytopenias and those from the literature in the classification, clinical manifestations, and particularly in the laboratory features of platelet numeration and morphology. This would provide valuable insights for clinicians and biologists in the diagnostic approaches to such disorders.

【Key words】 Thrombocytopenia; Platelet count; Diagnosis

遗传性血小板减少症 (hereditary thrombocytopenia) 是一类认识不足和诊断困难的罕见疾病。临床表现没有特异性, 常被误诊为免疫性血小板减少症^[1-2]。为此, 在中法医疗合作项目的框架下, 武汉大学中南医院与法国南锡医学院附属中心医院建立了合作关系, 运用临床和实验室手段, 通过培训相关专业人员, 以提高遗传性血小板减少症的诊断水平。一方面, 增强医务工作者对该病的认识; 另一方面, 提高对现有的诊断技术的应用能力。

一、遗传性血小板减少症的分类

遗传性血小板减少症存在多种分类方法^[3], 常用的分类方法为 Balduini C 分类法^[4], 依据是血小

板的大小, 见表 1。

二、遗传性血小板减少症的临床表现

临床医师进行血小板减少症诊断时, 根据患者的临床表现往往就可以将获得性与遗传性血小板减少症区别开来。然而, 由于对此类疾病认识不足及问诊不恰当, 遗传性血小板减少症常被漏诊或误诊。因此, Drachman^[5]提出了一套问诊的方法, 见表 2。

三、实验室检查

(一) 血细胞自动分析仪

如发现不明原因的或新近出现的血小板减少症, 应仔细分析血小板检测的条件及血细胞分析仪得出的血小板各项指标的结果。

血小板计数一般采用 EDTA 抗凝血, 检测前应注意核对患者信息, 检查标本质量, 观察是否存在血凝块 (可能黏附于瓶盖上)。

发送报告前, 应仔细分析和解读血小板相关指标, 包括血小板体积分布曲线和平均血小板体积。

1. 血小板体积分布曲线: 首先确认血小板指标

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2014.04.037

作者单位: 430071 武汉大学中南医院血液科 (蔡惠丽、刘尚勤、周怡), 检验科 (涂建成); 法国南锡医学院附属中心医院血液实验室 (蔡惠丽、LATGER-CANNARD Véronique); 法国国家科学研究中心 (CNRS) 法国研究联盟 3209-UTCT (细胞移植治疗中心) (STOLTZ Jean François); 法国东北部血小板疾病诊断中心 (LATGER-CANNARD Véronique)

通讯作者: LATGER-CANNARD Véronique, Email: v.cannard@chu-nancy.fr

报告的有效性: 血小板体积分布曲线应呈对数正态分布, 始于基线并回归基线, 且不伴随异常警报; 曲线的形态取决于血细胞计数仪的工作原理(即阻抗型或光学原理)。

阻抗型血细胞计数仪: 采用电阻抗原理的血细胞自动分析仪直接计算出血小板体积的信息, 信号强度与血小板体积成正比。不同的生产厂家的血细胞分析仪, 分析血小板体积范围有所差异。例如,

表1 遗传性血小板减少症 Balduni C 分类法 (Hum Genet, 2012)

疾病(缩写, OMIN 编号)	家庭数量	遗传特性	基因(染色体定位)	其他特征
大血小板				
MYH9 相关疾病(MYH9-RD, nd)	220	AD	MYH9(22q12-13)	巨血小板, 白细胞内包涵体, 白内障, 肾病和/或耳聋
Bernard-Soulier 综合征(BSS, 231200)	140	AR	GP1BA(17p13)	巨血小板
双等位基因	53	AD	GP1BB(2q11)	大血小板
单等位基因			GP9(3q21)	
Paris-Trousseau 血小板减少症 (TCPT, 188025/600588)	200	AD	11q23-ter 缺失	心脏和面部缺陷, 发育延迟±其他缺陷
Jacobsen 综合征 (JBS, 147791)				
灰色血小板综合征 (GPS, 139090)	26	AR	NBEAL2(3p21.1)	大而“苍白”的血小板, 进行性骨髓纤维化, 脾大, 血清维生素 B12 增高
von Willebrand 病 血小板型 (VWDP, 177820)	20	AD	GP1BA(17p13)	可存在巨大血小板, 应激时血小板计数下降
GATA1 相关性疾病(GATA1-RD)(红细胞增生异常性贫血伴血小板减少症-nd, 300367-X 连锁血小板减少症伴地中海贫血-XLTT, 314050)	10	XL	GATA1(Xp11)	溶血性贫血, 可存在不平衡的球蛋白链合成及先天性红细胞增生性卟啉症
血小板减少症伴植物固醇血症(STSL, 210250)	9	AR	ABCG5 ABCG8(2p21)	口型红细胞, 贫血, 肌腱黄色瘤, 动脉粥样硬化
ITGA2/ITGB3 相关血小板减少症(nd,nd)	8	AD	ITGA2(5q23-q31)ITGB3(17q21.32)	血小板大小不均, 可有血小板功能异常
FLNA 相关血小板减少症(FLNA-RT, nd) (MIM, 300049)	4	XL	FLNA(Xq28)	从小血小板到巨大血小板均存在, 可合并脑室周围结节易位
TUBB1 相关性 血小板减少症(nd,nd)	1	AD	TUBB1(6p21.3)	巨大血小板
正常大小血小板				
先天性无巨核细胞性 血小板减少症 (CAMT, 604498)	56	AR	c-Mpl(1p34)	巨核细胞减少, 进而进展为骨髓再生障碍
血小板减少伴桡骨缺失(TAR, 274000)	53	AR	RBM8A(1q21.1)	血小板计数趋于增高, 成年时期往往恢复正常; 巨核细胞减少, 双侧桡骨发育不全, 和/或其他异常
家族性血小板疾病并急性髓性白血病倾向 (FPD/AML, 601399)	30	AD	CBFA2(21q22)	40%发展为白血病或骨髓增生异常综合征
ANKRD26 相关血小板减少症(THC2, 313900)	21	AD	ANKRD26(10p2)	白血病风险?
无巨核细胞性血小板减少伴桡尺骨融合 (CTRUS, 605432)	8	AD	HOXA11(7p15-14)	巨核细胞减少, 可进展为再生障碍性贫血, 尺-桡骨融合
CYCS 相关血小板减少症(THC4, 612004)	1	AD	CYCS(7p15.3)	无
小血小板				
Wiskott-Aldrich 综合征(WAS, 301000)	约 4/百万	XL	WAS(Xp11)	严重免疫缺陷
X 连锁性血小板减少症(XLT, 313900)				无或轻度免疫缺陷

注: AD: 常染色体显性遗传; AR: 常染色体隐性遗传; XL: X 连锁性遗传; nd: 未确定

表2 提示遗传性血小板减少症的临床表现 (Drachman JG, 2004)

出血病史	ITP	遗传性
1. 何时开始出现出血、瘀点瘀斑	最近	长期存在
2. 健康状况有无改变? 是否服用新的药物	有	无改变
3. 在小创伤、月经期、手术、分娩时有无“过多”的出血	无	有
4. 有无家庭成员有出血倾向或血小板减少	无	有
5. 以前是否有过正常血小板值? 何时?	有	无
6. 对治疗(激素, IVIG, anti-D, 脾脏切除)的反应	血小板升高(约 80%)	不定或效果甚微
7. 输注血小板(必要时)疗效	效果甚微或短暂	效果明显且持续时间正常

LH-750 (Beckman Coulter) 分析的血小板体积范围为 2~20 fl。而 XE-2100D (Sysmex) 分析的血小板体积范围为 2~40 fl。

光学型血细胞计数仪: 在采用光学原理计数的血细胞分析中(如 ADVIA2120, Siemens), 仪器公司提供一种特殊的溶液(含有十二烷基硫酸钠和戊二醛), 使血小板变成等体积的球形。ADVIA2120 不仅分析血小板的大小, 还通过光散射分析血小板的结构。在大小/结构(size/structure)点状图中, 分析的血小板群变得可视化, 可以减少红细胞、红细胞碎片、影子红细胞等成分的干扰(图 1A)。此外, 基于红细胞分析的大小/结构细胞点状图中, 可以识别较大体积的血小板。因此, 血小板体积分布曲线由 2 部分组成: 2~30 fl 范围内的血小板对数正态分布分析及 30~60 fl 范围内的基于红细胞点状图的分析^[6-7](图 1B)。

2. 平均血小板体积(mean platelet volume, MPV)分析: 在生理状态下, 血小板的体积并不均一, 血小板的平均体积一般通过仪器的对数转换计算得到, 不同的血细胞分析仪测量的 MPV 有所差异^[8-9]。MPV 正常值受许多因素的影响, 包括抗凝剂、检测时间和仪器类型等^[9-11]。因此, 每个实验室应建立自己的正常值范围。然而, 由于缺乏标准化测量, 不同实验室间该指标的比较研究目前尚无方法进行^[9,12]。

3. 血小板体积分布曲线分析结果及 MPV 值: 正常大小的血小板: 血小板体积分布曲线成对数正态分布, 无外延, 无异常警报, 表明分析的血小板大小及形态正常, 生理性大小不均, 颗粒正常(图 2A, 2D, 2G, 2J)。中国人群 MPV 正常值范围因区域及检测仪器的不同而有所差别, 约 7~11 fl^[13-14]。

小血小板: 在某些少数情况下, 血小板直方图向左偏移, 即血小板体积偏小, 但仍呈对数分布, 由此得出一个较小的 MPV 值, 通常小于 7 fl。如伴

有严重的血小板减少, 则血小板直方图可能表现为一个完全向左偏移而没有对数分布的峰, 而且自动分析仪报告的体积分布曲线不光滑, 在这种情况下, 分析仪不能正确报告 MPV 值^[8]。

大血小板: 血小板体积分布曲线向右延展, 但仍呈对数正态分布, 曲线光滑, 提示存在体积较大的血小板, 自动分析仪能识别并计数, “大血小板”的存在, 能促发异常警报(“异常血小板细胞群”或“存在大血小板”), MPV 也高于正常范围(图 2B, 2E, 2H, 2K)。

巨大血小板: 巨大血小板的存在导致曲线失去对数正态分布, 或曲线突然中断、不光滑(如 LH750)(图 2F), 或曲线不回归基线(XE2100, XE2000i)(图 2I)。通常伴随“大血小板”或“血小板聚集”的异常警报, 分析仪或不报告 MPV 值或报告一个错误的 MPV 值。

同样的情况下, 运用光学工作原理的血细胞分析仪(ADVIA120, ADVIA2120), 因其特殊的计算方式, 呈现出不同的血小板体积曲线。我们在前面已经提到, 其血小板体积分布曲线由两部分组成, 即 2~30 fl 对数正态分布的血小板分析及 30~60 fl 范围内基于红细胞点状图的分析^[6-7]。因此, 血小板体积直方图呈双峰分布, 包括正常生理大小的及体积巨大的血小板(上限为 60 fl)(图 2C)。分析仪总是可以报告 MPV 值, 提示血小板体积增大, 且不伴随异常警报。根据我们实验室的经验, ADVIA2120 检测到的 MPV 值可高达 27~28 fl。

这些曲线形态表明光学原理的分析仪可以检测到体积很大的血小板, 而阻抗型的分析仪则不能检测到, 导致血小板计数被低估^[8]。这些血小板即为巨大血小板。

在一些情况下, 血细胞计数仪无法准确计数血小板, 此时则建议进行特异性免疫标记后流式细胞术计数^[15]。

(二) 血细胞涂片显微镜检查

国内血涂片制作过程: 取一滴血(EDTA 抗凝血或现场手指采血), 滴于洁净无油脂的玻璃一端, 手持玻璃推片呈 30° ~ 45° 的角度推出均匀的血膜。制作细节见参考文献^[16-17]。

如怀疑遗传性血小板减少症, 即使无异常警报, 仍建议常规进行血小板形态检查——采用 EDTA-K₂ 抗凝血行血涂片及 MGG 染色或瑞氏染色。在 EDTA 存在情况下, 血小板呈时间依赖性肿胀^[18], 抽血后应尽快进行涂片。自动化机器的血涂片容易使血小板皱缩, 从而使评估血小板形态更加困难, 因此一般不建议采用。观察血小板应同时观察红细胞及白细胞形态。

正常血小板: 无核的血细胞, 呈圆盘状, 直径 $2\sim 3\ \mu\text{m}$, 大小不均匀, 在 MGG 染色的血涂片上, 胞浆内包含紫色的颗粒(只有 α 颗粒着色), 均匀散在分布, 或者成群分布, 位于中央形成颗粒体 (granulomer), 即功能性的分泌体 (secretoma), 周围可见无颗粒的亮区或晕环。血小板颗粒包括 3 种: α 颗粒, 致密颗粒, 溶酶体。

小血小板 (microplatelet): 大小较均一, 体积较小, 呈点状(图 3A)。血小板减少时, 血涂片上可能很难见到小血小板, 它们易与细胞碎片相混淆, 血小板着紫色, 易于与其他颗粒相区别。

大血小板 (macroplatelet): 血小板体积较大, 但直径小于红细胞 ($7\ \mu\text{m}$), 称为大血小板(图 3B, 3D), 血涂片检查可观察到血小板均较正常血小板大。

巨大血小板 (giant platelet): 血涂片形态分析观察到一些体积大于红细胞的血小板, 为区别于大血小板, 称为巨大血小板, 数目不等, 但如果数量超过血小板计数的 5%, 应考虑为异常, 需进一步检查。发现巨大血小板时, 还应在高倍镜 (100 倍油镜) 下查找白细胞内是否存在嗜碱性包涵体, 包涵体一般呈长条状或圆形, 数目不等, 如存在, 则应考虑 MYH9 综合征的诊断。

四、根据临床表现、血小板参数及形态诊断遗传性血小板减少症

仔细分析血小板参数及形态学, 有助于我们评估血小板大小及其颗粒情况, 并根据临床表现寻找遗传性血小板减少症的病因。

(一) 正常血小板

1. 伴桡骨缺失的血小板减少症(thrombocytopenia

with absent radii, TAR): 以双侧桡骨缺失为特征, 100% 的病例存在血小板减少, 与染色体 1q21.1 缺失有关^[19-20]。出生后就出现血小板明显减少 ($< 30 \times 10^9/\text{L}$), 常导致频繁出血; 严重时可能出现消化道及颅内出血, 威胁生命。血小板计数随时间逐渐增加, 一岁后上升至正常。

2. 血小板减少症伴桡尺骨融合及无巨核细胞症 (thrombocytopenia associated with amegakaryocytosis and radio-cubital synostosis): 该综合征也表现为严重的血小板减少、血小板形态正常^[21], 多数病例与 HOXA11a 基因突变有关^[22], 血小板减少通常在一岁之前突然消失(计数恢复正常)。在严重的临床类型中, 骨髓检查提示孤立的巨核细胞缺失, 逐渐进展为骨髓再生障碍。

3. 先天性无巨核细胞性血小板减少症 (congenital amegakaryocytic thrombocytopenia): 同样具有明显的出血倾向, 出血症状见于所有病例, 出血早(甚至新生儿期), 出血严重(颅内出血、消化道出血)。严重的血小板减少 ($< 30 \times 10^9/\text{L}$), 先是孤立存在, 而后合并大细胞性贫血, 再逐渐进展为全血减少^[23], 而血小板形态正常。骨髓形态学检查提示巨核细胞明显减少, 甚至缺失^[24]。在这些患者中, 常可发现促血小板生成素受体 (c-MPL) 基因突变, 由此导致巨核细胞分化异常^[25]。

4. 家族性血小板减少症伴急性髓性白血病倾向 (familial platelet disorder with predisposition to acute myelogenous leukemia, FPD/AML): 是一种罕见的常染色体显性遗传性疾病^[26], 至今为止, 报道的病例尚不足 30 个。血小板一般为中度减少, 波动于 $80\sim 150\ \text{g/L}$ (法国血小板正常值 $150\sim 400\ \text{g/L}$, 中国血小板正常值 $100\sim 300\ \text{g/L}$), 血涂片上血小板形态正常, 颗粒正常。然而, 常合并致密颗粒缺陷, 血小板功能异常。因此, 即使血小板减少不明显, 也常常伴随出血症状。此病与 RUNX1 基因突变有关, 该基因与急性白血病的发生发展有关。1/3 的病例中, 家族史常提示髓性细胞性或淋巴细胞性血液病及其他肿瘤。

5. THC2 基因 (10p11-12) 突变相关的血小板减少症: 是近来报道的遗传性血小板减少症, 呈常染色体显性遗传, 与 ANKRD26 基因启动子突变有关^[27]。血小板计数波动于 $20\sim 80\ \text{g/L}$, 血小板大小正常, 未见报道大血小板的病例。血小板形态分析可见: 血小板嗜苯胺蓝颗粒减少, 甚至缺失, 提示 α 颗粒

异常,这已通过 α 颗粒成分(TSP1 蛋白)免疫荧光实验证实。尽管有报道描述,骨髓中巨核细胞生成异常,表现为巨核细胞增生不良,低分叶核、小巨核,但未见报道血小板功能异常(thrombopathy)。这一人群罹患血液病的概率高于正常人。

6. X 染色体 GATA1 突变相关的血小板减少症并地中海贫血:表现为血小板减少与贫血^[28]。血小板中度减少,形态正常。合并地中海贫血表现为小细胞性低色素贫血。

(二) 小血小板

血涂片观察到血小板体积较小,常伴有明显血小板减少,提示性连锁血小板减少症(XLT)或 Wiskott-Aldrich 综合征,均为 WAS 基因突变所致^[29]。由于血小板总量(platelet mass)减少(血小板数目减少,血小板体积减小),而且常合并血小板功能异常(致密颗粒缺陷),因而出血倾向明显(84%)。此外,常伴有湿疹(80%)、免疫缺陷(40%),还可能出 EBV 病毒诱导的淋巴瘤(13%)。性连锁血小板减少症有时仅表现为血小板减少与小血小板^[30]。

(三) 大血小板

1. 灰色血小板综合征(grey platelet syndrome, GPS):是一种罕见的遗传性血小板减少症,表现为血小板内容物 α -颗粒异常^[31],近来有研究表明 NBEAL2 基因与该综合征有关^[32],因为只有 α 颗粒能被 MGG 染色,因此血涂片上脱颗粒的血小板表现为颗粒减少甚至“空血小板”。该病一般出血症状轻微,但亦有严重出血的报道。

2. GATA1 基因突变导致的 X 连锁性血小板减少症伴红细胞增生异常:GATA1 基因位于 Xp11.23 上^[33],血小板减少程度与突变类型有关,常低于 10 g/L;存在大血小板,颗粒正常;且有红系异常,表现为贫血、红细胞大小不均、形态各异(poikilocytosis)、棘形红细胞及异常的幼红细胞。

3. 22q11.2 缺失综合征:包括上腭-心-面综合征(或头-面-心综合征)及 Di-George 综合征,症状表现为心脏、面部、胸腺、硬腭缺陷,低钙血症,学习和行为障碍。35%的病例出现血小板减少,出血症状较少见,通常是术前检查偶然发现^[34-35]。82%的病例存在大血小板,平均血小板体积轻度增加,但不影响血小板计数仪计数血小板。

4. 11q23 缺失:最初发现于 Jacobsen 综合征^[36]合并畸形综合征(主要为面部和心脏),约 50%的

病例出现血液学异常,表现为血小板减少或全血减少,但通常不合并出血症状。血小板计数轻中度减少(50~140 g/L),发现于出生后 1 个月至 12 岁之间^[37],随时间可波动或好转,甚至突然恢复正常。80%的病例平均血小板体积轻度增高,血涂片可观察到大小均一、颗粒正常的大血小板以及大小正常而 α -颗粒分布异常(存在一个被吉姆萨染成红色的巨大颗粒)的血小板(图 3D~3F)。这些血小板称为 Paris-Trousseau 血小板,也是该综合征的特征性表现,巨大颗粒由数个 α -颗粒融合而来,这已通过电子显微镜证实^[38]。大血小板比例不高,平均为 10%,因此平均血小板体积升高不明显,该比例也因人而异或同一个患者因时而异。有作者报道,在一 11q 嵌合体(mosaicism)的胎儿脐带血中发现了 Paris-Trousseau 血小板^[39]。

5. 合并大血小板的遗传性血小板减少症:可出现于血小板型 Willebrand 病或假性 Willebrand 病^[40],实验室检查提示血浆 Willebrand 因子含量降低,低剂量瑞斯托菌素(ristocetin)即可引起血小板聚集。原因在于 GPIb α 亚单位与 Willebrand 因子的结合区域出现异常。该疾病为 GPIb α 异常(位于 17 号染色体),与 2B 型 Willebrand 病不同,后者为 Willebrand 因子异常(位于 12 号染色体)所致。但这些异常均可导致血浆中 Willebrand 因子与其血小板上受体(糖蛋白 GPIb)结合增高,故血小板黏附于血管内皮下层增多,从而引起循环中 Willebrand 因子减少及出血症状。

6. 地中海大细胞性血小板减少症:表现为轻中度血小板减少(计数一般大于 50 g/L),血小板体积轻度增大,大血小板比例不确定^[41-42]。这是一个排除性诊断,因为血小板减少既不符合血小板功能异常,也无出血风险,更不伴随畸形综合征,而巨核细胞未发现任何异常,家族史调查在诊断中起重要作用,该遗传性血小板减少症与 GPIb α 基因突变有关(Bolzano 变异型)。

(四) 巨大血小板

1. Bernard-Soulier 综合征:出生后或儿童时期出现巨大血小板减少合并出血(皮肤黏膜紫癜)时,强烈提示 Bernard-Soulier 综合征。该综合征由血小板糖蛋白复合物 GPIb-IX-V 缺陷所致,诊断主要依据:瑞斯托菌素不能引起血小板聚集,流式术检测发现该复合物表达异常。血涂片示:大部分(大于 80%)为巨大血小板,大于红细胞,呈球形,颗粒

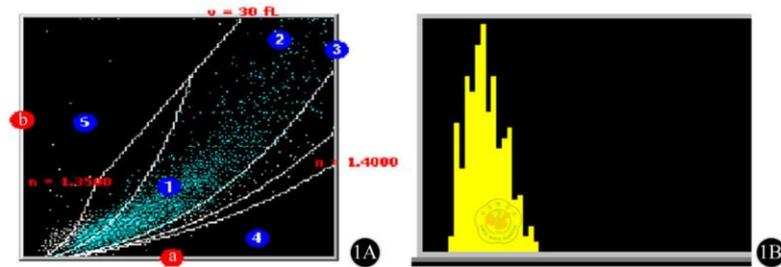


图1 1A: 血小板光散射点状图 (ADVIA2120, Siemens); a: 结构, b: 大小; 1: 血小板, 2: 大血小板, 3: 红细胞, 4: 红细胞碎片, 5: “影子”红细胞。1B: 血小板体积分布曲线 (ADVIA2120, Siemens) (该图片由法国南锡医学院附属中心医院血液实验室提供)

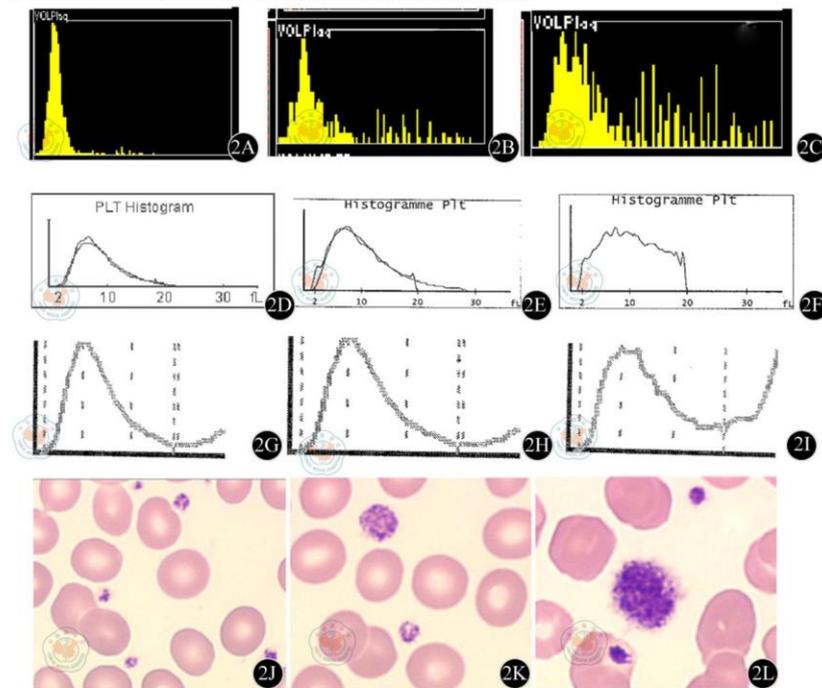


图2 不同大小的血小板对应的血小板体积分布曲线及细胞学形态。2A、2B、2C来自ADVIA2120 (Siemens); 2D、2E、2F来自LH-750 (Beckman Coulter); 2G~2I来自XE-2100D (Sysmex); 2J~2L为May-Grunwald Giemsa染色的外周血涂片 ($\times 1000$, Leica Application suite Version 3.6.0, Leica Microsystems Limited.)。正常大小的血小板: 2A (MPV: 7.11~9.11 fL)、2D (MPV: 8.00~10.00 fL)、2G (MPV: 9.11~11.11 fL)、2J; 大血小板: 2B (MPV>9.11 fL)、2E (MPV>10.00 fL)、2H (MPV>11.11 fL)、2K; 巨大血小板: 2C、2F、2I、2L (该图片由法国南锡医学院附属中心医院血液实验室提供)

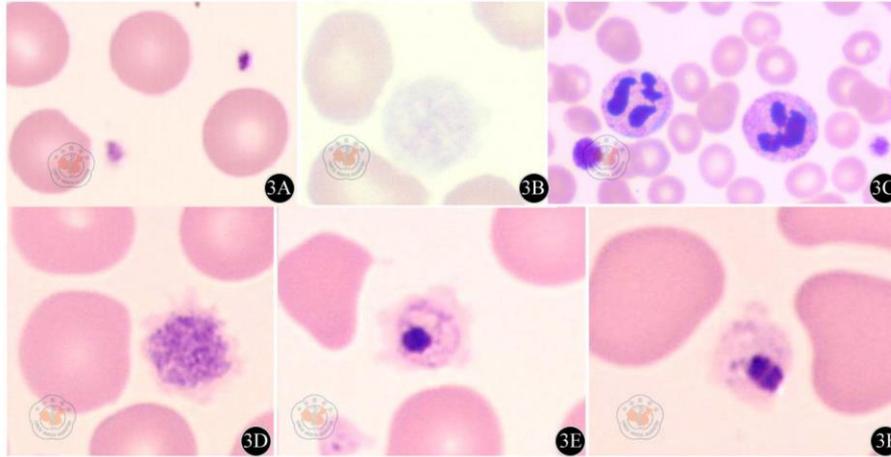


图3 3A: 小血小板, 呈点状; 3B: (灰色血小板综合征) α颗粒缺乏的大血小板; 3C: (MYH9综合征) 颗粒正常的大血小板及粒细胞内的碱性包涵体; 3D~3F: (Jacobsen综合征) 颗粒正常的大血小板 (3D) 及含有一巨大颗粒的血小板 (3E、3F, Paris-Trousseau血小板)。3A~3F均为MGG染色, C为630倍放大, 其余为1000倍放大 (Leica Application suite Version 3.6.0, Leica Microsystems Limited.) (该图片由法国南锡医学院附属中心医院血液实验室提供)

结构正常, 颗粒数量正常或增高。

2. MYH9 综合征: 由 5 种临床表现相近、出血轻微 (40%) 的亚型组成, 包括 May-Hegglin 异常、Sebatian 综合征, Fechtner 综合征, Epstein 综合征, Alport 样综合征。所有这些综合征均表现为大血小板减少症, 并与其他异常, 如肾小球肾炎, 耳聋 (Fechtner, Epstein, Alport-like 综合征), 起初也可仅表现为孤立的大血小板减少症^[43]。MYH9 综合征血液学表现为除巨大血小板外, 还有白细胞胞浆内出现长条形或圆形, 数目不等的嗜碱性包涵体 (需在高倍镜下观察) (图 3C)。

迄今为止, 在国内, 遗传性血小板减少症仍缺乏认识, 诊断率低, 由于缺乏筛查手段, 常被误诊为免疫性血小板减少症, 使遗传性血小板减少症一直处于被低估的状态。我们合作的目的在于: 对所有不明原因的血小板减少症, 通过更好地解读血细胞计数仪提供的血小板参数, 以及仔细观察血涂片的血细胞形态, 从而提高遗传性血小板减少症的诊断率。双方共同解读临床和实验室检查结果, 并讨论诊断、治疗、随访的参考意见。

参 考 文 献

[1] Gohda F, Uchiyama H, Handa H, et al. Identification of inherited macrothrombocytopenias based on mean platelet volume among patients diagnosed with idiopathic thrombocytopenia[J]. Thromb Res, 2007, 119(6): 741-746.

[2] Glembofsky AC, Marta RF, Pecci A, et al. International collaboration as a tool for diagnosis of patients with inherited thrombocytopenia in the setting of a developing country[J]. J Thromb Haemost, 2012, 10(8): 1653-1661.

[3] Nurden AT, Freson K, Seligsohn U. Inherited platelet disorders[J]. Haemophilia, 2012, 18(Suppl 4): 154-160.

[4] Balduini CL, Savoia A. Genetics of familial forms of thrombocytopenia[J]. Hum Genet, 2012, 131(12): 1821-1832.

[5] Drachman JG. Inherited thrombocytopenia: when a low platelet count does not mean ITP[J]. Blood, 2004, 103(2): 390-398.

[6] Stanworth SJ, Denton K, Monteath J, et al. Automated counting of platelets on the Bayer ADVIA 120 analyser[J]. Clin Lab Haematol, 1999, 21(2): 113-117.

[7] Briggs C, Harrison P, Machin SJ. Continuing developments with the automated platelet count[J]. Int J Lab Hematol, 2007, 29(2): 77-91.

[8] Latger-Cannard V, Hoarau M, Salignac S, et al. Mean platelet volume: comparison of three analysers towards standardization of platelet morphological phenotype[J]. Int J Lab Hematol, 2012, 34(3): 300-310.

[9] Hoffmann JJ. Reference range of mean platelet volume[J]. Thromb Res, 2012, 129(4): 534-535.

[10] Bowles KM, Cooke LJ, Richards EM, et al. Platelet size has diagnostic predictive value in patients with thrombocytopenia[J]. Clin Lab Haematol, 2005, 27(6): 370-373.

[11] Numbenjapon T, Mahapo N, Pornvipavee R, et al. A prospective evaluation of normal mean platelet volume in discriminating hyperdestructive thrombocytopenia from hypoproliferative thrombocytopenia[J]. Int J Lab Hematol, 2008, 30(5): 408-414.

[12] Machin SJ, Briggs C. Mean platelet volume: a quick, easy

- determinant of thrombotic risk[J]. *J Thromb Haemost*, 2010, 8(1): 146-147.
- [13] 林金煌, 许光辉, 柯丽军. 血小板检测参数的正常参考值范围及临床意义[J]. *重庆医学*, 2006, 35(23): 2164-2165.
- [14] 丛玉隆, 王鸿利, 彭作辉. 中国人群血小板各项参数的调查分析[J]. *中华检验医学杂志*, 2004 (06): 35-37.
- [15] Harrison P. Progress in the assessment of platelet function[J]. *Br J Haematol*, 2000, 111(3): 733-744.
- [16] 龚建红. 外周血涂片检查基本技能及其重要性[J]. *实用医技杂志*, 2011(10): 1066-1067.
- [17] 贾少荣. 标准血涂片与传统血涂片和血液分析仪分类结果比较[J]. *内蒙古医学杂志*, 2012, 44(2): 165-166.
- [18] O'Malley T, Ludlam CA, Fox KA, et al. Measurement of platelet volume using a variety of different anticoagulant and antiplatelet mixtures[J]. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 1996, 7(4): 431-436.
- [19] Greenhalgh KL, Howell RT, Bottani A, et al. Thrombocytopenia-absent radius syndrome: a clinical genetic study[J]. *J Med Genet*, 2002, 39(12): 876-881.
- [20] Rosenfeld JA, Traylor RN, Schaefer GB, et al. Proximal microdeletions and microduplications of 1q21. 1 contribute to variable abnormal phenotypes[J]. *Eur J Hum Genet*, 2012, 20(7): 754-761.
- [21] Thompson AA, Woodruff K, Feig SA, et al. Congenital thrombocytopenia and radio-ulnar synostosis: a new familial syndrome[J]. *Br J Haematol*, 2001, 113(4): 866-870.
- [22] Thompson AA, Nguyen LT. Amegakaryocytic thrombocytopenia and radio-ulnar synostosis are associated with HOXA11 mutation[J]. *Nat Genet*, 2000, 26(4): 397-398.
- [23] King S, Germeshausen M, Strauss G, et al. Congenital amegakaryocytic thrombocytopenia: a retrospective clinical analysis of 20 patients[J]. *Br J Haematol*, 2005, 131(5): 636-644.
- [24] Muraoka K, Ishii E, Tsuji K, et al. Defective response to thrombopoietin and impaired expression of c-mpl mRNA of bone marrow cells in congenital amegakaryocytic thrombocytopenia[J]. *Br J Haematol*, 1997, 96(2): 287-292.
- [25] Ballmaier M, Germeshausen M, Schulze H, et al. c-mpl mutations are the cause of congenital amegakaryocytic thrombocytopenia[J]. *Blood*, 2001, 97(1): 139-146.
- [26] Beri-Dexheimer M, Latger-Cannard V, Philippe C, et al. Clinical phenotype of germline RUNX1 haploinsufficiency: from point mutations to large genomic deletions[J]. *Eur J Hum Genet*, 2008, 16(8): 1014-1018.
- [27] Pippucci T, Savoia A, Perrotta S, et al. Mutations in the 5' UTR of ANKRD26, the ankirin repeat domain 26 gene, cause an autosomal-dominant form of inherited thrombocytopenia, THC2[J]. *Am J Hum Genet*, 2011, 88(1): 115-120.
- [28] Nichols KE, Crispino JD, Poncz M, et al. Familial dyserythropoietic anaemia and thrombocytopenia due to an inherited mutation in GATA1[J]. *Nat Genet*, 2000, 24(3): 266-270.
- [29] Imai K, Morio T, Zhu Y, et al. Clinical course of patients with WASP gene mutations[J]. *Blood*, 2004, 103(2): 456-464.
- [30] Albert MH, Bittner TC, Nonoyama S, et al. X-linked thrombocytopenia (XLT) due to WAS mutations: clinical characteristics, long-term outcome, and treatment options[J]. *Blood*, 2010, 115(16): 3231-3238.
- [31] Nurden AT, Nurden P. The gray platelet syndrome: clinical spectrum of the disease[J]. *Blood Rev*, 2007, 21(1): 21-36.
- [32] Albers CA, Cvejic A, Favier R, et al. Exome sequencing identifies NBEAL2 as the causative gene for gray platelet syndrome[J]. *Nat Genet*, 2011, 43(8): 735-737.
- [33] Ciovacco WA, Raskind WH, Kacena MA. Human phenotypes associated with GATA-1 mutations[J]. *Gene*, 2008, 427(1-2): 1-6.
- [34] Latger-Cannard V, Bensoussan D, Gregoire MJ, et al. Frequency of thrombocytopenia and large platelets correlates neither with conotruncal cardiac anomalies nor immunological features in the chromosome 22q11. 2 deletion syndrome[J]. *Eur J Pediatr*, 2004, 163(6): 327-328.
- [35] Liang HP, Morel-Kopp MC, Curtin J, et al. Heterozygous loss of platelet glycoprotein (GP) Ib-V-IX variably affects platelet function in velocardiofacial syndrome (VCFS) patients[J]. *Thromb Haemost*, 2007, 98(6): 1298-1308.
- [36] Jacobsen P, Hauge M, Henningsen K, et al. An (11; 21) translocation in four generations with chromosome 11 abnormalities in the offspring. A clinical, cytogenetical, and gene marker study[J]. *Hum Hered*, 1973, 23(6): 568-585.
- [37] Favier R, Jondeau K, Boutard P, et al. Paris-Trousseau syndrome: clinical, hematological, molecular data of ten new cases[J]. *Thromb Haemost*, 2003, 90(5): 893-897.
- [38] Breton-Gorius J, Favier R, Guichard J, et al. A new congenital dysmegakaryopoietic thrombocytopenia (Paris-Trousseau) associated with giant platelet alpha-granules and chromosome 11 deletion at 11q23[J]. *Blood*, 1995, 85(7): 1805-1814.
- [39] Valduga M, Cannard VL, Philippe C, et al. Prenatal diagnosis of mosaicism for 11q terminal deletion[J]. *Eur J Med Genet*, 2007, 50(6): 475-481.
- [40] Miller JL, Castella A. Platelet-type von Willebrand's disease: characterization of a new bleeding disorder[J]. *Blood*, 1982, 60(3): 790-794.
- [41] Behrens WE. Mediterranean macrothrombocytopenia[J]. *Blood*, 1975, 46(2): 199-208.
- [42] Savoia A, Balduini CL, Savino M, et al. Autosomal dominant macrothrombocytopenia in Italy is most frequently a type of heterozygous Bernard-Soulier syndrome[J]. *Blood*, 2001, 97(5): 1330-1335.
- [43] Althaus K, Greinacher A. MYH-9 Related Platelet Disorders: Strategies for Management and Diagnosis[J]. *Transfus Med Hemother*, 2010, 37(5): 260-267.

(收稿日期: 2013-07-17)

(本文编辑: 梁雷)

蔡惠丽, 刘尚勤, 周怡, 等. 遗传性血小板减少症的诊断 [J/CD]. *中华临床医师杂志: 电子版*, 2014, 8 (4): 752-759.

ETUDE 2 : EVALUATION DES PERFORMANCES DE LA COMBINAISON DU TEST A LA MEPACRINE ET L'EXPRESSION DE CD63 PAR CMF DANS LE DIAGNOSTIC DES PATHOLOGIES DES GRANULES DENSES

RESUME

Objectif

La pathologie des granules denses est rapportée comme la thrombopathie la plus fréquente, classée en deux sous-types, la maladie du pool vide delta (δ -SPD) et le déficit de sécrétion. Cette étude a pour objectif d'évaluer l'intérêt biologique de la combinaison du test de capture/sécrétion à la mépacrine et la mesure de l'expression de CD63 chez les patients suspects de pathologies des granules denses selon les tests biologiques habituels.

Méthodes

Tout patient présentant un profil d'agrégation plaquettaire anormal suggestif d'une pathologie des granules denses (profil « aspirine-like ») et/ou une diminution de la sécrétion d'ATP ont été inclus. Le test de capture/sécrétion de la mépacrine et la mesure de l'expression du CD63 sur la surface des plaquettes activées ont été réalisés par cytométrie en flux. Les intervalles de référence ont été établis à partir de témoins sains.

Résultats

Vingt-six patients ont été inclus sur une période de 5 ans. Dix-huit patients présentaient une diminution de la capture et de la sécrétion de la mépacrine associée à une réduction de l'expression de CD63, ce qui suggère un δ -SPD. Pour les 7 autres cas, la sécrétion de la mépacrine et l'expression de CD63 étaient diminuées mais en association avec une capture de la mépacrine normale, ce qui est compatible avec un déficit de sécrétion plutôt que δ -SPD. Pour un patient, le test à la mépacrine et la mesure de CD63 étaient normaux. Il est à noter que la mesure de la sécrétion d'ATP n'a pas pu être effectuée pour 7 patients sur 26 en raison d'un prélèvement insuffisant dans des cas pédiatriques et/ou de thrombopénie importante.

Conclusion

La combinaison du test à mépacrine et l'expression de CD63 a toujours, excepté pour un cas, été pathologique quand les tests habituels (l'agrégation plaquettaire et la sécrétion d'ATP) étaient en faveur d'une pathologie des granules denses. Cette méthode par cytométrie en flux nécessite un volume d'échantillon très faible (environ 1 mL), donc particulièrement adapté à la prise en charge des prélèvements pédiatriques. De plus, elle est également réalisable même en cas de thrombopénie majeure. Cet aspect représente un avantage important par rapport au test d'agrégation plaquettaire et au test de sécrétion d'ATP. Par conséquent, cette méthode peut être implantée dans les laboratoires qui sont équipés avec un cytomètre pour optimiser le diagnostic des pathologies des granules denses et améliorer la prise en charge de ces patients en particulier en cas de thrombopénie et/ou de faible quantité de prélèvement. Par ailleurs, ce test permet de distinguer les deux sous-types d'anomalie des granules denses.

Comme détaillé dans la synthèse bibliographique, les granules denses plaquettaires renferment les nucléotides (ADP et ATP), la sérotonine et du calcium. Le récepteur CD63, également connu sous le nom de la granulophysine, LIMP-CD63 et PTLGP40, est exprimé sur la membrane des granules denses pour les plaquettes au repos. Lors de l'activation plaquettaire, le contenu des granules denses est progressivement libéré, et la molécule CD63 est transférée sur la membrane « externe » des plaquettes.

La pathologie des granules denses, « *dense granule disorder* » dans la littérature anglosaxane, constitue une entité hétérogène, pouvant être classée en deux sous-types^[78, 123] la maladie du pool vide delta (« delta-storage pool disease », δ -SPD), appelée également syndrome du pool vide delta ou déficit en granules denses, définie par une diminution du contenu stocké dans les granules denses; 2) le déficit de sécrétion (« *primary secretion defect* ») caractérisé par un nombre normal des granules denses associé à une libération défectueuse résultant des anomalies des voies de signalisation.

Les étiologies de la pathologie des granules denses sont multiples : on distingue notamment les déficits constitutionnels et les déficits acquis. Cette anomalie des granules denses peut être isolée ou associée à d'autres pathologies congénitales dont le syndrome de Hermansky-Pudlak, le syndrome de Chediak-Higashi, le syndrome de Griscelli, le syndrome de Wiskott-Aldrich, la thrombopénie avec aplasie radiale, le syndrome FPD/AML ou le syndrome de Jacobsen^[49, 76, 78, 344], comme décrits dans le chapitre « Les pathologies plaquettaires ». Les formes secondaires ou acquises sont beaucoup plus fréquentes, pouvant être observées au cours d'hémopathies malignes (syndromes myéloprolifératifs, leucémies aiguës et syndromes myélodysplasiques essentiellement)^[183, 345] ou dans diverses autres situations : polyarthrite rhumatoïde, lupus érythémateux systémique^[346], greffe de moelle allogénique^[347], valvulopathie^[348], insuffisance rénale chronique en phase terminale^[349], purpura thrombopénique idiopathique^[350] ou circulation extracorporelle (CEC) en raison de l'activation des plaquettes au contact du circuit de CEC^[351]. La maladie du pool vide delta a été rapporté d'être associée à la prise d'un médicament anti-estrogénique le tamoxifène^[352]. Quelle qu'en soit la cause, il est décrit que la pathologie des granules denses est associée à la survenue de manifestations hémorragiques souvent modérées, bien que des hémorragies sévères aient été observées dans certains cas^[353, 354].

Plusieurs tests biologiques sont proposés pour établir le diagnostic d'anomalie des granules denses.

Les plus utilisés sont le test d'agrégation plaquettaire (LTA) et le test de sécrétion d'ATP par bioluminescence. Le profil de LTA montre une agrégation des plaquettes diminuée en réponse aux agonistes collagène et acide arachidonique, une diminution ou absence d'agrégation secondaire ou de seconde vague et une agrégation réversible en présence d'ADP alors que la voie de l'agglutination à la ristocétine est normale. La quantité d'ATP libérée par les plaquettes activées par des agonistes forts (collagène, TRAP) est généralement réduite à des degrés divers. Cependant, les deux tests ne permettent pas la distinction entre les deux sous-types : δ -SPD et déficit de sécrétion. En outre, de nombreuses études ont montré que le profil d'agrégation pouvait être normal dans une grande proportion des cas (environ 30%)^[353, 355]. De plus, les deux tests nécessitent un grand volume d'échantillons et ils ne sont pas réalisables en cas de thrombopénie importante. En général, la confirmation du diagnostic nécessite des techniques complexes telles que la microscopie électronique (examen morphologique des granules denses), le radio-immunomarquage (sérotonine) et l'HPLC (détermination des nucléotides ou de la sérotonine). Ces techniques spécialisées ne sont généralement pas disponibles dans les laboratoires d'hématologie qui explorent ces anomalies plaquettaires, excepté des laboratoires référents. Par conséquent, notre réflexion s'est portée vers l'utilisation de la cytométrie en flux, technique robuste, rapide et répandue, pour développer un test rapide et performant pour optimiser la détection des granules denses.

Comme présenté dans le chapitre « Exploration biologique des plaquettes », le test de capture et sécrétion de la mépacrine par cytométrie en flux permet de mettre en évidence les anomalies des granules denses. Le test à mépacrine a été rapporté initialement par Wall^[175] et Gordon^[173]. Dans les recommandations internationales, cette méthodologie est indiquée comme test à utiliser pour le diagnostic de la pathologie des granules denses^[67, 123]. Cependant, à notre connaissance, l'apport de ce test n'a jamais été évalué dans ce diagnostic. Nous avons, dans un premier temps, optimisé les conditions analytiques de ce test, puis nous l'avons implanté dans notre laboratoire d'hématologie depuis plusieurs années. Cette étude a pour objectif d'évaluer l'apport biologique dans la détection des anomalies des granules denses, de la combinaison du test de capture/sécrétion à la mépacrine et la mesure de l'expression de CD63 chez les patients suspects de pathologie des granules denses par rapport aux tests biologiques habituels, représentés par l'agrégation plaquettaire et la sécrétion d'ATP.

Article accepté dans *Seminars of Thrombosis and Hemostasis*

**ARTICLE : USEFULNESS OF FLOW CYTOMETRIC MEPACRINE
UPTAKE/RELEASE COMBINED WITH CD63 ASSAY IN DIAGNOSIS
OF PATIENTS WITH SUSPECTED PLATELET DENSE GRANULE
DISORDER**

Running title: Flow cytometry in platelet disorder diagnosis

Huili Cai, M.D.,¹ François Mullier, M.D., Ph.D.,² Birgit Frotscher, M.D.,¹ Marie-Elisabeth Briquel, M.D.,¹ Marie Toussaint, Ph.D.,¹ Frédéric Massin, M.D.,³ Thomas Lecompte, M.D.,⁴ Véronique Latger-Cannard, M.D., Ph.D.^{1,4,5}

¹Service d'Hématologie Biologique, CHRU Nancy, France

²Laboratory of Hematology, Namur Thrombosis and Hemostasis Center (NTHC), Namur Research Institute for Life Sciences, CHU Dinant Godinne UCL Namur, Yvoir, Belgium

³Plateforme de Cytométrie en flux, CHRU, Nancy

⁴Département des Spécialités de Médecine, Service d'Hématologie, Hôpitaux Universitaires de Genève, Suisse

⁵Centre de Compétence Nord-Est des Pathologies Plaquettaires, France

Corresponding author: Véronique Latger-Cannard,
Service d'Hématologie Biologique, CHRU Nancy, rue de Morvan, 54500,
Vandoeuvre-Lès-Nancy, Nancy, France.

Tel: +33 (0)3 83 15 37 64.

Fax: +33 (0)3 83 15 37 89.

E-mail: v.cannard@chu-nancy.fr

Abstract

Dense granule disorder is one of the most common platelet abnormalities, resulting from dense granule deficiency or secretion defect. This study was aimed to evaluate the clinical usefulness of the flow cytometric combination of mepacrine uptake/release assay and CD63 expression detection in the management of patients with suspected dense granule disorder. Over a period of 5 years, patients with abnormal platelet aggregation and/or reduced adenosine triphosphate (ATP) secretion suggestive of dense granule disorder were consecutively enrolled. The flow cytometric assays were systematically performed to further investigate dense granule functionality. Among the 26 included patients, 18 cases showed impaired mepacrine uptake/release and reduced CD63 expression on activated platelets, consistent with δ -storage pool deficiency. Another 7 patients showed decrease in mepacrine release and CD63 expression but mepacrine uptake was normal, indicating secretion defect rather than δ - storage pool deficiency. Unfortunately, ATP secretion could not be measured in 7 out of the 26 patients due to insufficient sample and/or severe thrombocytopenia. In conclusion, this test combination provides a rapid and effective method to detect the heterogeneous abnormalities of platelet dense granule by distinguishing between storage and release defects. This combination is particularly advantageous for severely thrombocytopenic patients and pediatric patients in which only minimal sample is required.

Keywords: dense granule disorder, mepacrine, CD63, granulophysin, flow cytometry

Abbreviations: δ -SPD, δ -storage pool deficiency; ATP, adenosine triphosphate; ADP, adenosine diphosphate; LIMP, lysosomal integral membrane protein; LTA, light transmission aggregometry; TRAP, thrombin receptor activating peptide; AA, arachidonic acid; RIPA, ristocetin-induced platelet agglutination; VASP, vasodilator stimulated phosphoprotein; CMML, chronic myelomonocytic leukemia; JMML, juvenile myelomonocytic leukemia; MDS myelodysplastic syndrome; FPD/AML, familial platelet disorder with predisposition to acute myelogenous leukemia; MPV, mean platelet volume; PRP, platelet rich plasma; PPP, platelet poor plasma; PBS, phosphate buffered solution; MFI, mean fluorescence intensity; $M \pm S.D.$, mean \pm standard deviation; IQR, interquartile range.

Introduction

Platelets contain three types of secretory granules comprising dense (δ)-granules, α -granules and lysosomes, which are each characterized by their different contents.^{1, 2} Dense granules are rich in nucleotides (adenosine diphosphate [ADP] and adenosine triphosphate [ATP]), serotonin (5-hydroxytryptamine or 5-HT), pyrophosphate and calcium (mainly responsible for the electron density).^{3, 4} Alpha-granules contain a number of proteins of which platelet factor-4 and β -thromboglobulin are platelet-specific and the most abundant. Lysosomes retain predominantly acid hydrolase, cathepsins and lysosomal membrane proteins. CD63, also known as granulophysin, lysosomal integral membrane protein-CD63 (LIMP-CD63) and a 40-Kd platelet glycoprotein, belongs to the tetraspanin superfamily, and is expressed on dense granule membrane of resting platelets.⁵⁻⁷ Upon platelet activation, the contents of dense granules are released in a stepwise fashion and the CD63 molecule is translocated to the plasma membrane.

Non-syndromic platelet δ -granule disorders comprise by far the most common abnormalities of platelet function and are probably underestimated.⁸ They can be classified into two subtypes: δ -storage pool deficiency and δ -secretion defect.⁹⁻¹¹ δ -storage pool deficiency results from reduced or absent content of platelet dense granules, the latter comprising the so called “empty sack syndrome”;¹² whereas δ -secretion defect is associated with normal content but defective release due to impaired cellular activation or signal transduction.^{1, 11}

In the laboratory, several approaches have been developed to identify these disorders.¹³ Light transmission aggregometry (LTA) is a global test neither sensitive nor specific for δ -granule disorders.¹⁴ ATP determination by bioluminescent assay represents an important diagnostic tool assessing ATP released from dense granules during platelet activation.^{10, 15} These methods are currently the most often used in clinical laboratories to detect dense granule disorders.¹⁵ However, they are not always realizable due to insufficient blood sample or severe thrombocytopenia. Other methods, such as nucleotides determination by high performance liquid chromatography, serotonin uptake and release by radiolabeled method and electron microscopy, are only available in specialized laboratories equipped with the required technical expertise and equipment. Moreover, numerous disadvantages

have been well described for these techniques with the main one being a response delay for several days; thus, they are not appropriate for a clinical “real life” diagnosis and appropriate management of patients with bleeding. In view of these considerations, there is a need for a rapid, convenient and effective method in the clinical laboratory to investigate such patients.

In the current guidelines, mepacrine uptake/release assay by flow cytometry is highlighted among the tests being used in diagnosis of dense granule disorders.^{8,10} However, as far as we know, such flow cytometric assays have not yet been evaluated in series of patients with these disorders.

Mepacrine is a fluorescent acridine derivative that binds with high affinity to adenine nucleotides and selectively accumulates into platelet dense granules.¹⁶ Mepacrine-treated platelets from patients with dense granule abnormalities have been investigated with fluorescent microscopy to determine the number of dense granules.¹⁷ Flow cytometry offers the possibility of studying platelet dense granules with mepacrine in a simple and rapid way. The dense granule membrane protein CD63, the expression of which increases on activated platelet membranes, can also be determined by flow cytometry.

As discussed above, a clinically applicable approach for diagnosing a dense granule disorder is lacking. In the present study, we evaluated the contribution of the mepacrine assay in combination with CD63 assay by flow cytometry for optimization of dense granule disorder detection, thus facilitating appropriate real time management, of patients with suspected dense granule disorder. This flow cytometric method can be performed in all cases, even in patients with severe thrombocytopenia and a minimal sample volume (e.g. in children). Our findings demonstrate that this method was able to differentiate δ -storage pool deficiency from release defects. Thus, this combination provides a useful tool for diagnosis of dense granule disorder, so that physicians can appropriately treat patients more rapidly.

Patients and methods

This study was conducted in the hematology laboratory of Nancy Hospital (Nancy, France) between 2008 and 2013 in accordance with the Helsinki Declaration. The cases presented in this study have not been previously reported except two patients (P1 and P3).¹⁸

Patients and healthy controls

Patients were referred consecutively for investigation of bleeding symptoms that could not be explained by coagulation factor deficiency, von Willebrand disease or isolated thrombocytopenia, or were identified during family studies. Platelet function tests were performed in a second step after elimination of coagulopathies (normal results for prothrombin time, activated partial thromboplastin time and Clauss fibrinogen assay). Patients were included when they presented with reduced platelet ATP secretion in response to thrombin receptor activating peptides (TRAP) or collagen, and/or abnormal LTA phenotype suggestive of dense granule pathology: decreased response to collagen and/or arachidonic acid (AA), and/or ADP with absent second wave or reversible aggregation. After inclusion, mepacrine uptake/release assay and CD63 expression test by flow cytometry were performed to further investigate dense granule functionality. None of the patients had taken medications known to affect platelet function in the previous 2 weeks. In addition, defects in platelet glycoprotein expression (Bernard-Soulier syndrome, Glanzmann thrombasthenia), von Willebrand disease, platelet type (pseudo)-von Willebrand disease or abnormalities of ADP receptor P2Y₁₂ were excluded by glycoprotein determination by flow cytometry, von Willebrand factor (ristocetin cofactor and antigen) assays, Ristocetin-Induced Platelet Agglutination (RIPA) test and Vasodilator Stimulated Phosphoprotein (VASP) test, respectively. Hematological diseases such as chronic myelomonocytic leukemia, juvenile myelomonocytic leukemia and myelodysplastic syndrome were diagnosed according to the 2008 WHO classification of tumors of hematopoietic and lymphoid tissues. Causative mutations were identified in familial platelet disorder with predisposition to acute myelogenous leukemia and Wiskott-Aldrich syndrome by molecular genetic analysis. Fanconi anemia was diagnosed based on the chromosome breakage test.

Blood samples of healthy controls were obtained from volunteer donors. All blood donors were anonymous and were evaluated by a detailed interrogation and an elaborated questionnaire, including medication history and bleeding condition to determine their eligibility to donate blood. Participants were considered to be healthy if they had not previously required clinical consultation or investigation for excessive bleeding, did not

require long-term medical therapy, and had refrained from using drugs known to interfere with platelet function in the previous 2 weeks. Consequently, the bleeding score was estimated at zero for all the healthy controls.

Bleeding score evaluation

A bleeding assessment tool according to Tosetto et al (2007 and 2011)^{19, 20} was used for assessment of the patients' bleeding history by a specialist during consultation. The bleeding score was established prior to platelet function exploration, so that investigators were not influenced by laboratory results when assessing the bleeding symptoms. The score ranges from -3 to 45, based on a maximal score of 4 in 12 separate categories assessing different types of bleeding. It should be noted that the bleeding score was not considered as one of inclusion criteria in the present study.

Platelet count and mean platelet volume (MPV) determination

Platelet count and size were determined using an automated hematology analyzer (ADVIA2120[®], Siemens). Peripheral blood smears were stained with May-Grünwald Giemsa and examined using optical microscopy (Leica Microsystems).

Platelet preparation for platelet function tests

Blood from participants and healthy volunteer controls was drawn into anti-coagulated tubes containing 3.2% sodium citrate (BD Vacutainer, 0.105 M) and was maintained at room temperature. Platelet rich plasma (PRP) was prepared by centrifuging whole blood tubes at 150 g for 12 minutes (Jouan E96, Thermo Scientific). The PRP was aspirated from the tubes and platelet poor plasma (PPP) was prepared by subjecting the remaining blood to a further centrifugation at 2500 g for 15 minutes (Jouan GR4i, Thermo Scientific). Platelet functional assays were carried out within 3 hours after blood collection.

LTA

Platelet aggregation was measured using an aggregometer from Soderel Medical, with a panel of platelet agonists including 2 µg/mL and 10 µg/mL collagen (Nycomed, Paris, France), 5 µM and 10 µM ADP (HYPHEN BioMed, Neuville-Sur-Oise, France), 1.36 mM arachidonic acid (AA) (HYPHEN BioMed, Neuville-Sur-Oise, France) and 1.5 mg/mL ristocetin (HYPHEN BioMed, Neuville-Sur-Oise, France). Result report included maximal % aggregation and % disaggregation (for ADP response). Disaggregation percentage was

calculated as follows: [(maximal % aggregation - % aggregation at 6th minute)/maximal % aggregation] x 100%. Platelet aggregation results were expressed as percentage of maximal aggregation, unless otherwise specified. Since no remarkable differences in platelet aggregation were observed among age groups,²¹ the reference intervals established with healthy population controls were applied in both adult and pediatric patients.

ATP secretion assay

Platelet ATP secretion assay was performed at 37°C using a lumi-aggregometer (Chrono-log Corporation) with Chrono-lume kit (luciferin-luciferase reagent and ATP standard solution, Chrono-log Corporation, Kordia, Netherlands). In brief, 400 µL PPP was pipetted into a cuvette for calibration. In another cuvette, 380 µL PRP and 20 µL luciferin-luciferase reagent were added consecutively. ATP release was started by adding 20 µg/mL collagen or 25 µM TRAP (Thrombin Receptor Activating Peptide 14 AA, Polypeptide Group, Strasbourg, France). When ATP release reached maximum, 5 µL standard ATP was added (final concentration of 5 µM). The concentration of ATP (µM) released by activated platelets was calculated as follows: (peak amplitude of patient/peak amplitude of standard ATP) x final concentration of standard ATP. The results were normalized to platelet concentration (nmol/10⁹ platelets).^{21, 22}

Mepacrine uptake and release assay and CD63 expression test by FCM

Mepacrine uptake/release assay was adapted from the work by Wall et al²² and Gordon et al.¹⁶ To optimize the performances of both tests, a number of factors had been previously tested, such as sample dilution, concentration of platelet agonist, temperature and duration of incubation and final mepacrine concentration. The following conditions were considered to be the most optimal.²⁴

PRP was further diluted at 1:20 with PBS (Dulbecco's buffer, Eurobio, Courtaboeuf, France). Three hundred microliters of platelet suspension was incubated with 1.7 µM or 3.4 µM mepacrine (Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France), simultaneously with 10 µL R-phycoerythrin (PE)-CD41 mAb (Beckman Coulter), for 30 minutes at room temperature. Each tube was subsequently divided into two aliquots, incubated in the absence or presence of 60 µM TRAP for 15 minutes at room temperature.

In the CD63 assay, 50 µL of PRP was incubated with PBS or 60 µM TRAP for 5 minutes at room temperature. Then platelets were labeled with 20 µL PE-CD63 mAb (Beckman Coulter)

and 10 μ L R-phycoerythrin cyanin 7 (PC7)-CD41 mAb (Beckman Coulter) for 15 minutes at room temperature. Control tubes (isotypic controls) were prepared in parallel by incubating with matched isotype control antibody instead of CD63 antibody, for both resting and activated platelets.

Analyses were performed using a FACSCalibur™ cytometer (Becton Dickinson) equipped with the CELLQUEST software and daily calibrated with BD Calibrite™ 3 beads and the BD FACSComp™ software. The platelet population was identified by optical parameters (forward scatter and side scatter) combined with CD41 expression. The median fluorescence intensity (MFI) for positive cells was recorded (Figure 1).

For the mepacrine assay, uptake ratio was calculated as quotient of MFI of platelets incubated with mepacrine (MFI₁) divided by MFI of platelets without mepacrine (MFI₂), and secretion ratio as quotient of MFI of resting platelets (MFI₁) divided by MFI of stimulated platelets (MFI₃):

Uptake ratio = MFI₁/ MFI₂; Secretion ratio = MFI₁/ MFI₃.

CD63 expression ratio was calculated as follow:

$(\text{MFI}_{\text{stimulated}} - \text{MFI}_{\text{stimulated isotypic control}}) / (\text{MFI}_{\text{resting}} - \text{MFI}_{\text{resting isotypic control}})$.

Data analysis

Variables were analyzed for a normal distribution with the D'Agostino and Pearson test. Normally distributed continuous variables are presented as mean \pm standard deviation (M \pm S.D.), and non-normally distributed continuous variables as median (interquartile range [IQR]). Results of patients were compared with those of healthy controls. Statistical analysis was performed using Graphpad Prism software version 5.0 (San Diego, CA, USA). Differences between groups were tested with Student's *t*-test for normally distributed variables and with Mann-Whitney test for non-normally distributed variables. A two-sided *P*-value of < 0.05 was considered to be significant.

Results

Clinical data

Twenty-six patients were enrolled consecutively in the study (Table 1), comprised of 12 females and 14 males, among whom were 10 pediatric patients (age < 14 years, 3 females and 7 males). The median age of the patients was 42 years (IQR 11-56 years).

The associated disorders of the included patients are presented in Table 1. Familiar platelet

disorder with predisposition to acute myelogenous leukemia with *RUNXI* mutation was found in seven patients including 2 sporadic cases (P1 and P3) and five members from one pedigree (P11, P23-P26; mutation: c.506C>G). Wiskott-Aldrich syndrome was diagnosed in one patient (mutation: exon 10 c.1315C>T) and combined $\alpha\delta$ -storage pool deficiency in another patient as confirmed by ultrastructural morphometry. Several cases were identified in the context of hematological malignancies, one with chronic myelomonocytic leukemia, one with essential thrombocythemia, one with Fanconi anemia, two with myelodysplastic syndrome and one with juvenile myelomonocytic leukemia. Two cases were associated with vitamin C deficiency. Five patients presented with bleeding symptoms but without thrombocytopenia whereas the four remaining were found to be thrombocytopenic.

Observed bleeding symptoms were mainly mucocutaneous, including easy bruising, petechia, ecchymosis, epistaxis, gum bleeding, menorrhagia, post-partum hemorrhage, bleeding after surgery and cerebral hemorrhage. The bleeding score obtained from patients varied from zero to 16 (median 3.5, IQR 2-6; Table 1 and Figure 2). It was higher than that from healthy volunteers (median 0, IQR 0-0). According to previously published studies,^{25,26} a score of 4 was considered as a cut-off for bleeding severity. In most patients, the score ranged from zero to 4 (16/26, 62%), indicating that they presented with only mild to moderate bleeding features. However, 10 patients, with a score of 5 to 16, suffered from more severe hemorrhages, even life-threatening episodes. No statistical difference in bleeding score was observed between pediatric (median 2.5) and adult (median 4.5) populations ($P = 0.28$, Mann-Whitney test; data not shown).

Laboratory data

Platelet count and platelet size

Platelet count varied from $37 \times 10^9/L$ to $622 \times 10^9/L$ (mean $185.2 \times 10^9/L$) (Table 1). Ten patients had a normal platelet count ($150-450 \times 10^9/L$), 14 presented with thrombocytopenia including 2 with a platelet count less than $50 \times 10^9/L$, and 2 presented with thrombocytosis (platelet count $> 450 \times 10^9/L$). Analysis of MPV ($M \pm S.D. 8.7 \text{ fL} \pm 2.0 \text{ fL}$) (Table 1) and peripheral blood smear revealed normal platelet size and morphology in all of the patients except 3 with large platelets (P16, P19, P21) including one with α -granule deficiency (P19).

LTA

As shown in Figure 3A, no statistical difference was found in agglutination in presence of ristocetin between controls and patients ($M \pm S.D. 90 \pm 8$ versus 85 ± 19 ; $n=74$ for controls; $P =$

0.11, unpaired *t*-test). However, only a single, relatively high concentration of ristocetin (1.5 mg/mL) was utilized in this study. Eight patients showed slightly decreased response to ristocetin, which was considered to be related to a low platelet count of PRP.

Platelet aggregation in response to collagen was impaired in most of the cases (17/25, 68% with 2 µg/mL concentration; 16/25, 64% with 10 µg/mL concentration). Maximal aggregation was remarkably decreased in patients (M±S.D. 54±26 and 66±19) with both concentrations, in comparison to controls (M±S.D. 81±9 and 84±7) ($P < 0.0001$, unpaired *t*-test; Figure 3A).

Similarly, arachidonic acid-induced platelet aggregation was significantly reduced in patients (M±S.D. 55±23 versus 84±10 in controls; $P < 0.0001$, unpaired *t*-test; Figure 3A). An impaired response was observed in 17 out of 25 (68%) patients.

Investigated patients displayed impaired aggregation in response to ADP 5 µM (22/25, 88%; M±S.D. 46±19) and to ADP 10 µM (23/26, 88.5%; M±S.D. 51±17), in contrast to controls (M±S.D. 78±8 and 79±8 with 5 µM and 10 µM respectively) ($P < 0.0001$ for both concentrations, unpaired *t*-test; Figure 3A). Notably, the impaired platelet aggregation was almost always accompanied with reversible aggregation (22/25, 88% with 5 µM; 19/26, 73.1% with 10 µM). Moreover, it was observed that disaggregation was more pronounced for ADP 5 µM than for ADP 10 µM (% disaggregation: M±S.D. 32±29 versus 20±21, $P = 0.0448$, unpaired *t*-test; Table 1).

ATP secretion

The patients' ATP secretion was significantly decreased in response to collagen (15/19, M±S.D. 10.2±5.1 nmol/10⁹ platelets) and TRAP stimulation (17/19, M±S.D. 7.6±4.4 nmol/10⁹ platelets) respectively, in comparison with healthy controls (M±S.D. 19.9±7.3, 18.9±6.6 nmol/10⁹ platelets; n=74) ($P < 0.0001$ for both agonists, unpaired *t*-test; Figure 3B). Notably, in 7 out of the 26 patients, the test was not performed due to insufficient sample (n=4) and/or severe thrombocytopenia (n=3).

Mepacrine uptake/release assay and CD63 expression

The flow cytometric results of one representative patient are presented in Figure 4. As shown in Figure 3C, a significant difference was observed between patients and controls (n=74), in mepacrine uptake ratio (1.7 µM uptake ratio: M±S.D. 3.0±0.8 versus 4.5±1.1; 3.4 µM uptake ratio: M±S.D. 3.6±0.9 versus 5.3±1.3) as well as in mepacrine release ratio (1.7 µM release ratio: M±S.D. 1.6±0.3 versus 2.3±0.4; 3.4 µM release ratio: M±S.D. 1.7±0.3 versus 2.4±0.4),

regardless of mepacrine concentration ($P < 0.0001$, unpaired t -test). Similarly, the CD63 expression ratio was also markedly reduced in patients ($M \pm S.D.$ 4.7 ± 2.5) compared to controls ($M \pm S.D.$ 12.2 ± 3.3) ($P < 0.0001$, unpaired t -test; Figure 3D). It is interesting to note that two patterns of response were observed. In 18 patients (P1-P5, P7, P10, P11, P13, P15, P18-P20, P22-P26), mepacrine uptake and release and CD63 expression ratios were all decreased, whereas in another 7 patients (P8-P9, P12, P14, P16, P17, P21), mepacrine release ratio and CD63 expression ratio were reduced but associated with normal mepacrine uptake ratio.

Discussion

Dense granule disorder is one of the most common platelet function defects. Consequently, the detection of dense granule disorder is important for management of a number of bleeding patients. LTA and bioluminescent ATP secretion assay are currently the most used and recommended tests to diagnose dense granule disorders.^{8, 10, 27} However, these tests can not always be performed due to insufficient sample or severe thrombocytopenia.²⁸ Other demanding techniques require specialized expertise and yield delayed results. Consequently, patients with dense granule disorder are under-estimated and suffer from inappropriate management. Herein, we propose the utilization of flow cytometric assays in clinical laboratories, which may overcome most of these issues.

The present study evaluated the contribution and practical advantage of the flow cytometric mepacrine uptake/release combined with CD63 in the detection of dense granule disorders, in a pathologic population defined by using recommended methods as LTA and ATP secretion assays.

Clinically, common manifestations of mild bleeding were absent in some patients, mainly children, probably due to lack of hemostatic challenges until consultation. Note that 16 out of 26 cases had a maximum score of 4, including 4 patients with a score of zero. Therefore, a low bleeding score cannot exclude the diagnosis of dense granule disorder, which is in accordance with previous reports.²⁶

Investigated patients showed substantially impaired platelet aggregation. However, LTA patterns were very heterogeneous, with respect to degree of aggregation impairment and agonists, as shown in Table 1. Decreased and reversible response to ADP 5 μ M and 10 μ M was the most often observed. In the case of Wiskott-Aldrich syndrome, LTA was performed only with ristocetin and ADP 10 μ M due to insufficient sample obtained from the 5-month-old infant. The need for a significant sample volume represents one of the main

drawbacks of this technique, which led us to exclude some patients from the cohort. It is also not suitable for use in samples with very low platelet count and lipemic blood samples.^{10, 14}

The measurement of ATP is considered as assessment of dense granule secretion.^{10, 15} Up to now, bioluminescent determination is one of the most used methods in clinical laboratories to detect δ -granule secretion from platelets. In the tested samples (19 out of 26 patients), ATP secretion was found to be decreased in 78.9% (15/19) with collagen and in 89.4% (17/19) with TRAP respectively. However, the test was not performed in another 7 patients due to insufficient sample in pediatric cases and/or severe thrombocytopenia. This proved to be an additional methodological limitation for ATP secretion measurement.

It was noted that two patients (P8 and P16) showed normal results of ATP secretion with both agonists. However, the flow cytometric assay was able to identify both cases as δ -secretion defect as indicated by normal mepacrine uptake associated with decreased mepacrine release and CD63 expression. Another 2 patients (P9 and P23) showed discordant ATP secretion with normal secretion in response to collagen but impaired response to TRAP. Nevertheless, both patients presented with severe hemorrhage (bleeding score of 6 and 7 respectively, without severe thrombocytopenia), abnormal platelet aggregation curves and abnormal results in mepacrine and CD63 assay, consistent with δ -storage pool deficiency. Whereas the bioluminescent ATP secretion assay is widely recommended as a first step tool to diagnose dense granule disorder, it is not always realizable and is of relatively low sensitivity.

Flow cytometric analysis showed suggestive phenotype of dense granule disorder in all cases. Eighteen patients were found to have marked decrease in mepacrine uptake and release and impaired expression of CD63 on activated platelet surface, indicating a deficiency of dense granule content. Another 7 patients showed reduced mepacrine release and CD63 expression, but associated with conserved mepacrine uptake, consistent with defect in dense granule secretion rather than in granule content. Patients with familiar platelet disorder with predisposition to acute myelogenous leukemia syndrome were from 3 different pedigrees, but all were demonstrated to have δ -SPD, which was revealed by abnormal platelet aggregation, reduced ATP secretion and flow cytometric pattern (decreased mepacrine uptake and release and reduced CD63 expression). We did not find any significant difference between this sub-group and other patients in results of LTA, ATP secretion test or flow cytometric assay. A phenotype of δ -storage pool deficiency has also been found in two patients with vitamin C deficiency. Patients with vitamin C deficiency have been reported to have abnormal platelet function, which could be corrected by administration of vitamin C.^{29, 30} However, the

relationship between δ -storage pool deficiency and vitamin C deficiency remains to be fully elucidated.

The diagnosis could be established based on only the results from the mepacrine assay. However, it was noted that CD63 expression ratio was always clearly decreased in all patients even when the mepacrine uptake/release ratios were close to lower limit (Table 1). Therefore, the addition of CD63 expression test permits confirmation of dense granule disorder diagnosis.

Compared to other techniques, there are several advantages for the mepacrine assay combined with CD63 test by flow cytometry. First, it requires minimal amounts of blood sample, making it feasible for use in infants or children. Second, it can be performed for patients with low platelet count (i.e. severe thrombocytopenia) in which platelet aggregation and ATP secretion assays would be often not realizable and results unreliable. Third, this assay provides a rapid and accurate assessment of platelet dense granule defects allowing a real time diagnosis to facilitate more appropriate management of the patient's hemorrhagic syndrome, either by appropriate therapy (transfusion, local hemostasis, etc) or by leading to search for a genetic syndrome (e.g. a familiar platelet disorder with predisposition to acute myelogenous leukemia). Moreover, this combination allows establishment of the heterogeneous abnormalities of platelet dense granule disorders by distinguishing between storage and release defects.^{10, 31} In particular, the CD63 test may provide additional information in patients with "empty sack syndrome". In these rare cases, the number of dense granules may be normal but may still present with absent content. As a result, the flow cytometry assay would show a normal CD63 expression ratio but reduced mepacrine uptake ratio and release ratio.

Note that the combination of two concentrations of mepacrine, according to Wall et al,²³ seemed to provide a better sensitivity. In some cases, the defect was only revealed by abnormal result to a concentration of mepacrine, whereas the outcome to the other concentration was close to lower limit, thereby emphasizing the importance of studying samples with at least 2 mepacrine concentrations.

Conclusion

The combination of mepacrine assay and CD63 expression by flow cytometry allows diagnosing patients with dense granule disorders, in accordance with guidelines by Harisson et al¹⁰ and Podda et al⁸. The main advantages of this technique include its ability to distinguish between δ -storage pool deficiency and δ -secretion defect as well as being suitable

for pediatric population and/or thrombocytopenic patients. Moreover, this methodology is easily available in clinical laboratories equipped with a flow cytometer. Consequently, it constitutes a real help in the clinical diagnosis of these patients, which will in turn improve their management.

Acknowledgements

The contribution of all the technicians in the hematological laboratory and in cytometry platform (CHRU Nancy) in the technical assistance is gratefully acknowledged. The authors also thank Dr. Jean Devignes for his implication in platelet disorders and Dr. Shangqin Liu for helpful advice in the preparation of this manuscript. Huili Cai received a graduate studentship award from China Scholarship Council.

Declaration of interest

Huili Cai received a graduate studentship award from China Scholarship Council. Otherwise, the authors report no declarations of interest.

References

1. Reed GL. Chapter 15-Platelet secretion. In:Michelson A,editor. Platelets. Second Edition ed :Elsevier Science;2007.p 309-318.
2. Mirlashari MR, Ryningen A, Mikkelsen HM, Fukami MH. Differential secretion of blood platelet storage granules. Platelets 1996;7:313-320.
3. Rivera J, Lozano ML, Navarro-Nunez L, Vicente V. Platelet receptors and signaling in the dynamics of thrombus formation. Haematologica 2009;94:700-711.
4. White JG. Use of the electron microscope for diagnosis of platelet disorders. Semin Thromb Hemost 1998;24:163-168.
5. Israels SJ, McMillan-Ward EM. Palmitoylation supports the association of tetraspanin CD63 with CD9 and integrin alphaIIb beta3 in activated platelets. Thromb Res 2010;125:152-158.
6. McNicol A, Israels SJ. Platelet dense granules: structure, function and implications for haemostasis. Thromb Res 1999;95:1-18.
7. Nishibori M, Cham B, McNicol A, Shalev A, Jain N, Gerrard JM. 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 1993;91:1775-1782.
8. Podda G, Femia EA, Pugliano M, Cattaneo M. Congenital defects of platelet function. Platelets 2012;23:552-563.
9. Hayward CP. Diagnostic evaluation of platelet function disorders. Blood Rev 2011;25:169-173.
10. Harrison P, Mackie I, Mumford A, Briggs C, Liesner R, Winter M, Machin S. Guidelines for the laboratory investigation of heritable disorders of platelet function. Br J Haematol 2011;155:30-44.
11. Rao AK, Jalagadugula G, Sun L. Inherited defects in platelet signaling mechanisms. Semin Thromb Hemost 2004;30:525-535.
12. Mumford AD, Frelinger IAL, Gachet C, et al. A review of platelet secretion assays for the diagnosis of inherited platelet secretion disorders. Thromb Haemost 2015;114:(20150416)
13. McNicol A, Israels SJ, Robertson C, et al. The empty sack syndrome: a platelet storage pool deficiency associated with empty dense granules. Br J Haematol 1994;86:574-582
14. Cattaneo M, Cerletti C, Harrison P, et al. Recommendations for the Standardization of Light Transmission Aggregometry: A Consensus of the Working Party from the Platelet Physiology Subcommittee of SSC/ISTH. J Thromb Haemost 2013;
15. Cattaneo M. Light transmission aggregometry and ATP release for the diagnostic assessment of platelet function. Semin Thromb Hemost 2009;35:158-167
16. Gordon N, Thom J, Cole C, et al. Rapid detection of hereditary and acquired platelet storage pool deficiency by flow cytometry. Br J Haematol 1995;89:117-123
17. Rendu F, Nurden AT, Lebreton M, et al. Relationship between mepacrine-labelled dense

- body number, platelet capacity to accumulate 14C-5-HT and platelet density in the Bernard-Soulier and Hermansky-Pudlak syndromes. *Thromb Haemost* 1979;42:694-704
18. Beri-Dexheimer M, Latger-Cannard V, Philippe C, et al. Clinical phenotype of germline RUNX1 haploinsufficiency: from point mutations to large genomic deletions. *Eur J Hum Genet* 2008;16:1014-1018
 19. Tosetto A, Castaman G, Rodeghiero F. Assessing bleeding in von Willebrand disease with bleeding score. *Blood Rev* 2007;21:89-97
 20. Tosetto A, Castaman G, Plug I, et al. Prospective evaluation of the clinical utility of quantitative bleeding severity assessment in patients referred for hemostatic evaluation. *J Thromb Haemost* 2011;9:1143-1148
 21. Bonduel M, Frontroth JP, Hepner M, et al. Platelet aggregation and adenosine triphosphate release values in children and adults. *J Thromb Haemost* 2007;5:1782-1783
 22. Dawood BB, Wilde J, Watson SP. Reference curves for aggregation and ATP secretion to aid diagnose of platelet-based bleeding disorders: effect of inhibition of ADP and thromboxane A(2) pathways. *Platelets* 2007;18:329-345
 23. Wall JE, Buijs-Wilts M, Arnold JT, et al. A flow cytometric assay using mepacrine for study of uptake and release of platelet dense granule contents. *Br J Haematol* 1995;89:380-385
 24. Mullier F, Latger-Cannard V, Toussaint-Hacquard M, et al. Validation and assessment of mepacrine testing in delta storage pool disease: A 3-centre study. P-TH-089. *J Thromb Haemost* 2011;9 Suppl 2:1-970
 25. Tosetto A, Castaman G, Rodeghiero F. Bleeders, bleeding rates, and bleeding score. *J Thromb Haemost* 2013;11 Suppl 1:142-150
 26. Lowe GC, Lordkipanidze M, Watson SP. Utility of the ISTH bleeding assessment tool in predicting platelet defects in participants with suspected inherited platelet function disorders. *J Thromb Haemost* 2013;11:1663-1668
 27. Hayward CP, Moffat KA. Laboratory testing for bleeding disorders: strategic uses of high and low-yield tests. *Int J Lab Hematol* 2013;35:322-333
 28. Hayward CP, Moffat KA, Pai M, et al. An evaluation of methods for determining reference intervals for light transmission platelet aggregation tests on samples with normal or reduced platelet counts. *Thromb Haemost* 2008;100:134-145
 29. Born GV, Wright HP. Platelet adhesiveness in experimental scurvy. *Lancet* 1967;1:477-478
 30. Dey F, Moller A, Kemkes-Matthes B, et al. Reduced platelet aggregation in a boy with scurvy. *Klin Padiatr* 2012;224:448-452
 31. Weiss HJ, Lages B, Vicic W, et al. Heterogeneous abnormalities of platelet dense granule ultrastructure in 20 patients with congenital storage pool deficiency. *Br J Haematol* 1993;83:282-295

Figures and legends

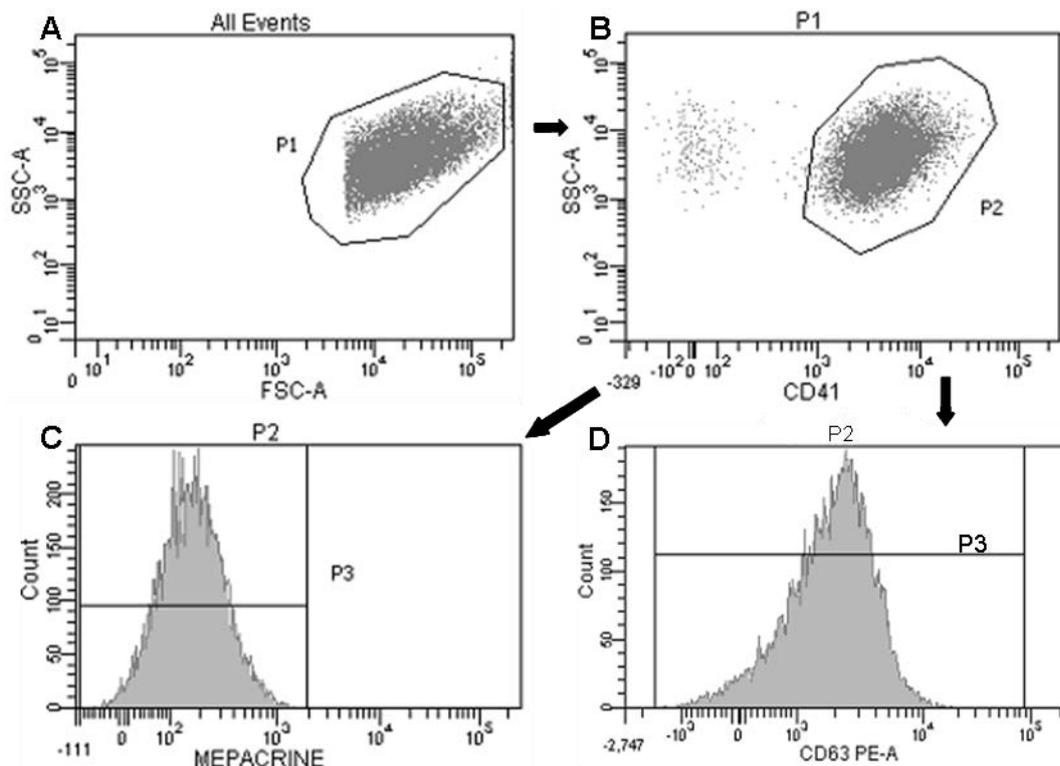


Figure 1 The gating strategy for flow cytometric mepacrine uptake/release assay and CD63 expression detection. The platelet population was identified firstly by physical parameters (forward scatter and side scatter) (A) and was then refined with CD41 expression (B). Antibodies anti-CD41 were conjugated with R-phycoerythrin (PE) in mepacrine assay and with R-phycoerythrin cyanin 7 (PC7) in CD63 test. This platelet population was further analyzed for the fluorescence intensity of mepacrine (C) or CD63-PE (D).

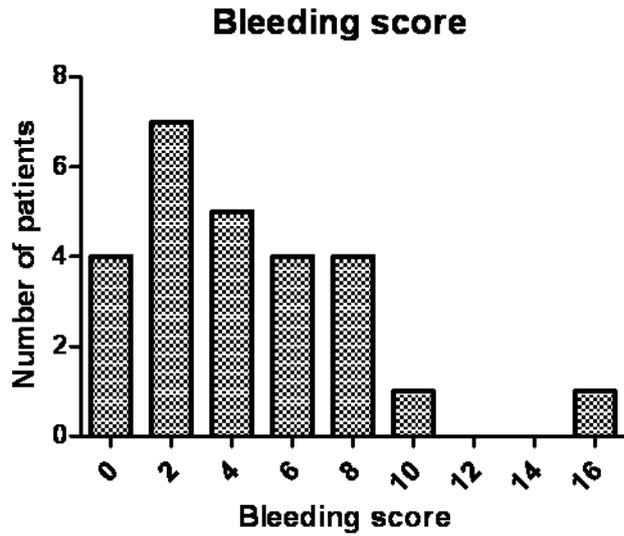


Figure 2 Distribution of bleeding scores.

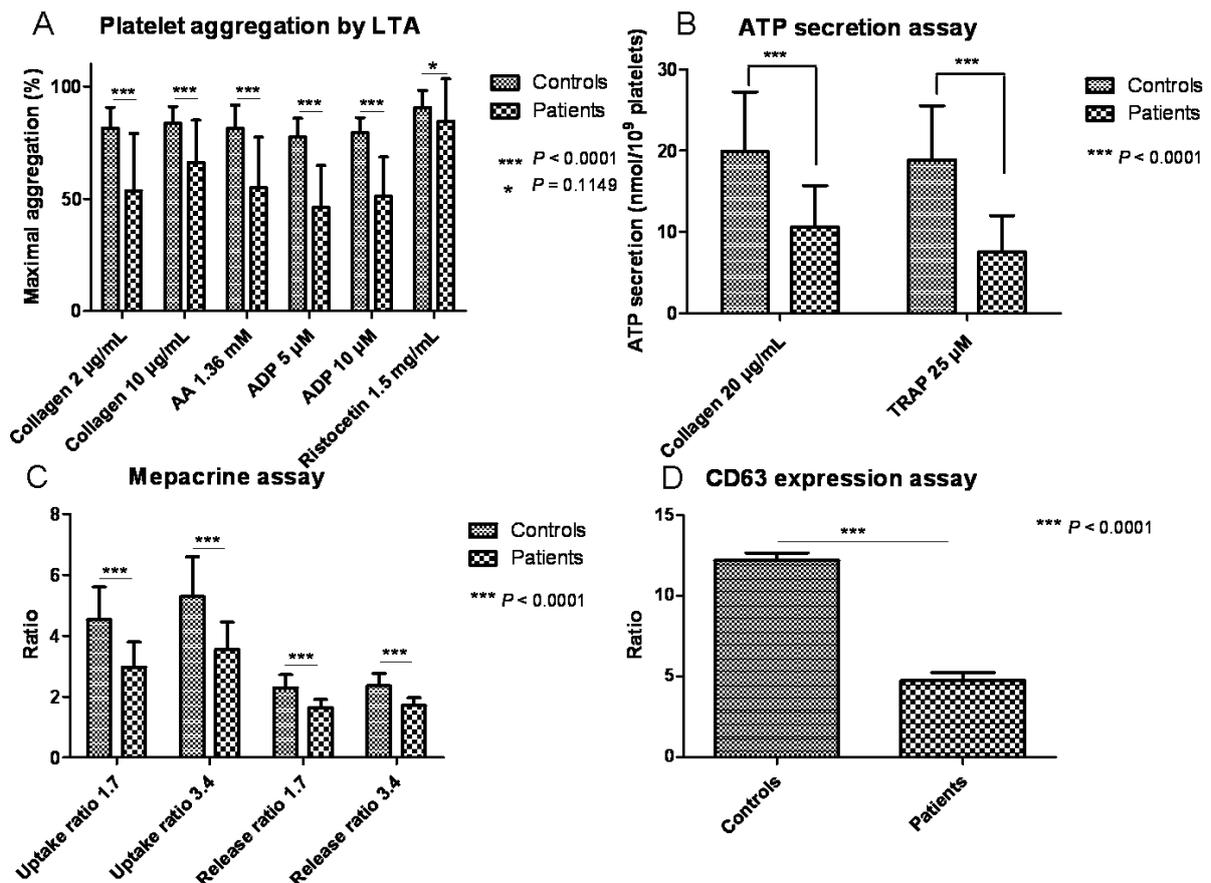


Figure 3 (A) Platelet aggregation by LTA. The agglutination response with ristocetin 1.5 mg/mL in patients was comparable to that in controls. However, patients showed a clearly

impaired platelet aggregation in response to other agonists, in comparison to controls. (B) Platelet ATP secretion determination. Results were normalized to 1×10^9 platelets. Both collagen $20 \mu\text{g/mL}$ and TRAP $25 \mu\text{M}$ induced significantly lower ATP secretion in patients than in healthy controls. (C) Mepacrine assay by flow cytometry. A significant difference was observed between patients and controls, in mepacrine uptake as well as in mepacrine release, regardless of mepacrine concentration. (D) CD63 expression by flow cytometry. The CD63 expression ratio was also markedly reduced in patients compared with controls.

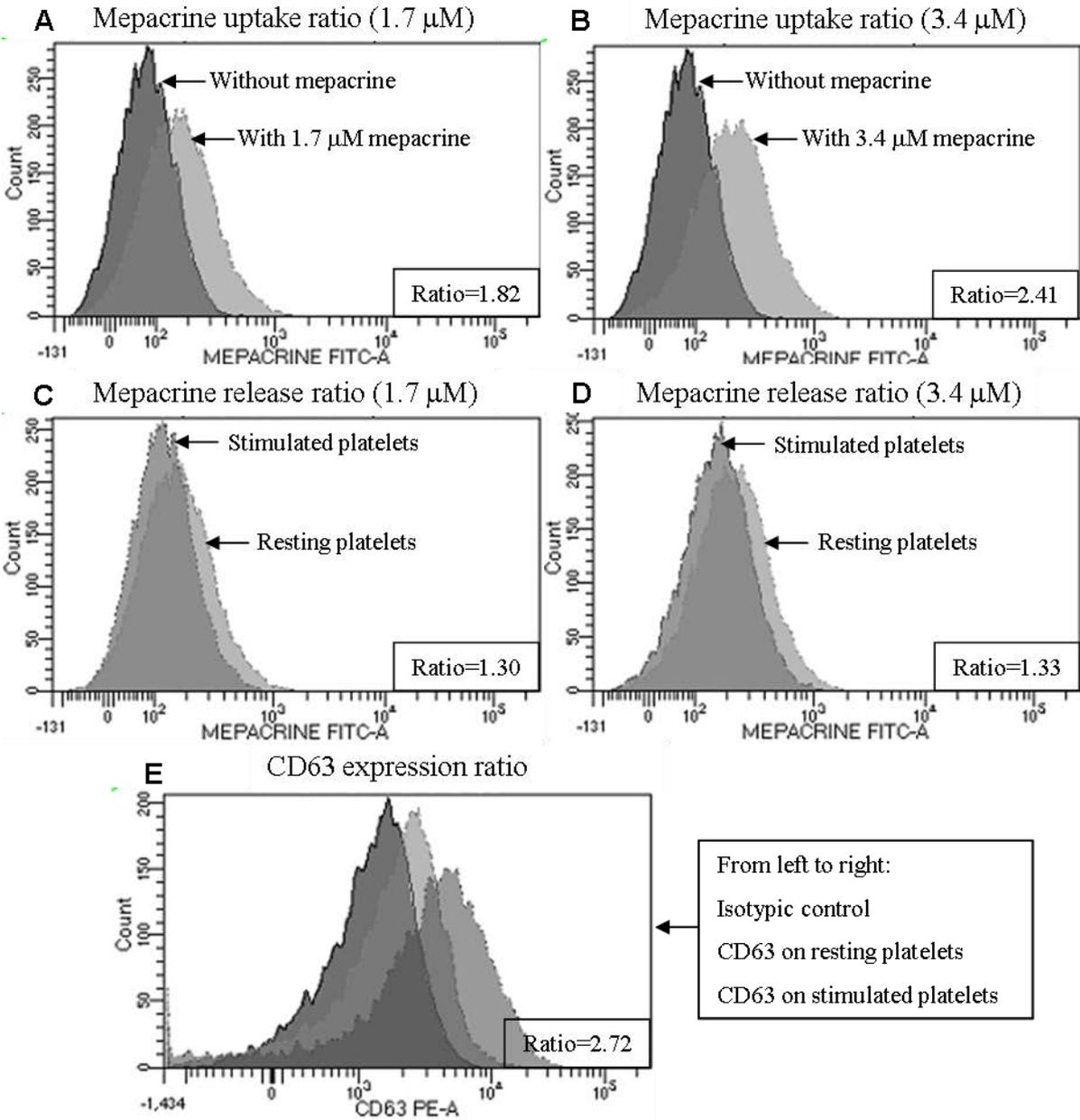


Figure 4 The flow cytometric results of a representative patient with δ -storage pool disease. Mepacrine uptake and release ratios and CD63 expression ratio were all decreased. The ratios were calculated as described in Patients and methods.

Table I. Clinico-biological characteristics of the investigated patients.

Patients	Diagnosis	Age / Sex	Bleeding score	Platelet count (x 10 ⁹ /L) / MPV(fL)	Light transmission aggregometry							ATP ^b secretion		Mepacrine assay				
					Collagen 2	Collagen 10	Arachidonic acid	ADP 5	ADP 5 % D	ADP 10	ADP 10 % D	Collagen	TRAP	Uptake ratio		Release ratio		CD63 ratio
														1.7	3.4	1.7	3.4	
P1	FPD/AML	13/F	1	94/7.6	37.6	64.9	33.1	42.3	40.0	45.8	21.0	7.6	6.7	2.84	3.28	1.60	1.6	1.1
																2	4	
P2	CMML	52/F	2	62/9.1	18.2	35.7	43.5	39.0	10.5	50.0	NA	1.7	0.9	1.90	2.25	1.40	1.4	1.2
																6	2	
P3	FPD/AML	9/M	3	160/7.7	57.5	80.6	70.9	39.1	47.0	54.2	32.5	4.5	5.3	2.42	3.32	1.60	1.7	1.0
																3	7	
P4	Essential thrombocythaemia	54/F	2	77/9.1	17.0	47.7	55.3	40.1	96.2	47.3	47.2	7.8	4.9	3.38	3.91	1.69	1.6	4.5
																6	2	
P5	Fanconi Anaemia	6/M	2	57/9.2	31.1	46.8	24.3	16.5	38.5	25.3	20.4	5.8	2.9	3.02	3.45	1.68	1.5	7.1
																7	6	
P6	Familial haemorrhagic syndrome	13/F	5	322/8.5	85.1	82.7	84.4	78.2	4.6	68.2	3.9	8.3	6.7	4.76	5.64	2.09	2.1	10.90
P7	Familial haemorrhagic syndrome	8/M	2	355/6.7	87.8	93.5	78.7	57.5	25.2	64.5	15.4	10.7	8.7	3.48	3.91	1.79	1.8	3.3
																5	4	
P8	Isolated haemorrhagic syndrome	54/M	1	250/9.8	57.2	75.9	70.9	23.9	88.3	21.2	83.1	17.3	15.7	3.78	4.45	1.87	1.9	3.3
																6	1	

P9	Isolated haemorrhagic syndrome	46/F	6	215/6.8	80.4	83.4	62.5	48.6	NA	82.1	NA	14.4	10.2	3.71	4.41	1.75	1.9	8.0
																	1	4
P10	MDS	73/M	8	539/7.9	64.4	69.1	61.7	41.6	75.8	41.5	55.4	9.7	4.3	3.02	3.53	1.67	1.8	4.8
																	2	9
P11 ^a	FPD/AML	22/F	5	37/9.0	45.8	59.7	44.1	52.2	6.2	52.3	2.1	12.7	11.3	2.77	3.11	1.50	1.4	3.4
																	9	1
P12	JMML	2/M	0	622/7.0	70.3	84.7	71.9	60.3	3.1	59.6	2.8	NR	NR	3.69	4.63	1.91	1.8	7.1
																	5	0
P13	Vitamin C deficiency	59/M	4	341/7.5	62.5	73.1	51.9	52.5	NA	73.5	NA	NR	NR	1.66	2.86	0.90	1.3	5.7
																	2	4
P14	Familial haemorrhagic syndrome	0/M	4	382/7.7	59.8	81.7	78.6	23.2	68.6	37.9	11.0	NR	NR	3.60	4.47	1.60	1.6	3.8
																	5	7
P15	MDS	68/M	9	142/8.9	3.1	31.1	14.7	50.8	44.9	43.6	14.7	4.1	2.1	2.22	2.79	1.40	1.4	2.6
																	7	2
P16	Familial thrombocytopenia	62/F	0	99/13.4	80.4	78.3	74.5	75.1	8.3	70.4	NA	18.7	17.0	3.86	4.44	1.83	1.9	7.3
																	6	9
P17	Isolated pre-operative thrombocytopenia	58/F	0	123/7.5	59.8	80.6	55.9	24.2	22.7	36.0	7.6	12.7	9.9	3.51	4.16	1.77	1.7	5.5
																	7	1
P18	Vitamin C deficiency	56/M	4	131/8.8	74.2	67.0	59.2	59.5	1.8	78.6	NA	12.1	9.3	2.84	3.34	1.55	1.6	5.8
																	7	0
P19	αδ-SPD	56/F	16	54/13.1	49.5	70.3	35.2	61.6	NA	50.6	NA	5.8	2.9	2.37	2.73	1.40	1.3	5.5
																	9	6
P20	Congenital thrombocytopenia	12/F	7	73/7.3	55.3	70.2	38.7	12.9	20.2	38.0	6.5	NR	NR	2.47	2.86	1.38	1.4	2.2
																	7	6
P21	Congenital thrombocytopenia	44/F	0	37/14.1	25.2	43.3	33.3	33.9	11.3	37.0	1.1	NR	NR	4.65	5.17	1.54	1.5	1.6
																	2	0

a																		
P22	Wiskott-Aldrich Syndrome	1/M	2	153/7.7	NR	NR	NR	NR	NA	29.1	9.2	NR	NR	2.76	3.20	1.98	1.8	7.6
P23 ^a	FPD/AML	40/M	7	110/7.5	73.9	73.0	81.3	78.4	16.2	66.2	5.1	21.5	10.5	2.33	2.77	1.80	1.9	4.0
P24 ^a	FPD/AML	53/M	6	54/8.8	6.2	22.1	0.0	25.9	44.3	26.2	17.7	NR	NR	1.82	2.41	1.30	1.3	2.7
P25 ^a	FPD/AML	13/M	3	154/8.0	83.7	73.9	73.4	60.1	18.4	66.8	19.8	8.6	10.3	2.49	2.90	1.81	1.9	7.1
P26 ^a	FPD/AML	23/F	8	171/7.0	75.3	78.8	75.1	59.0	2.3	67.2	NA	10.2	4.6	1.97	2.23	1.50	1.6	5.4
RI				150-400/7.0-10.0	72.1-90.7	76.1-91.1	71.2-91.7	69.3-85.8		72.7-86.1		12.7-27.2	12.3-25.5	3.49-5.59	4.00-6.58	1.89-2.73	1.9-7.2	8.8-6.1
																	2.7	5.4
																	9	8

^a These patients were from one pedigree (*RUNX1* mutation: c.506C>G). Values in bold and italic were decreased.

^b The unit of ATP secretion results is nmol/10⁹ platelets.

Abbreviations: MPV, mean platelet volume; FPD/AML, Familial platelet disorder with predisposition to acute myelogenous leukemia; CMML, Chronic myelomonocytic leukemia; JMML, Juvenile myelomonocytic leukemia; MDS, Myelodysplastic syndrome; SPD, storage pool disease; *MYH9*, myosin heavy chain 9; RIs, reference intervals; NR, Not realizable; NA, Not applicable when platelet aggregation was not reversible; % D, percentage of deaggregation;

ETUDE 3 : CARENCE EN VITAMINE C ET THROMBOPATHIE

RESUME

Contexte

Le risque de carence en vitamine C est sous-estimé dans les pays industrialisés. L'état de carence en vitamine C ne se révèle que très rarement, sous la forme sévère représentée par le scorbut. Celui-ci est caractérisé par une hyperkératose folliculaire, des purpuras périfolliculaires et des cheveux en forme de tire-bouchons. Le syndrome hémorragique, ainsi que d'autres symptômes, est, jusqu'à ce jour, essentiellement attribué à la synthèse anormale du collagène due à la carence en vitamine C. Peu de publications ont rapporté la fonction plaquettaire dans le scorbut.

Introduction

Au décours de l'exploration plaquettaire réalisée au laboratoire d'hématologie, nous avons identifiés la présence d'une thrombopathie de la voie des granules denses pour 2 patients suspects de scorbut et présentant un syndrome hémorragique de type purpura pétéchial. Nous avons donc cherché dans la littérature les relations potentielles entre la carence en vitamine C et les fonctions plaquettaires.

Méthodes

Les observations cliniques et les résultats biologiques pour les deux patients ont été documentés. Les fonctions des plaquettaires ont été évaluées avec le test d'agrégation plaquettaire, le test de sécrétion d'ATP, le test de capture/sécrétion de la mépacrine et la mesure de l'expression de CD63 par cytométrie en flux.

Résultats

Le diagnostic de scorbut, largement suggéré par les manifestations cliniques a été confirmé par le dosage de la vitamine C plasmatique qui était effondré. L'exploration fonctionnelle plaquettaire a mis en évidence une thrombopathie de type anomalie des granules denses avec un profil anormal d'agrégation plaquettaire, une sécrétion d'ATP diminuée, une capture et une sécrétion de la mépacrine réduites et une expression de CD63 basse.

Conclusion

Une thrombopathie est probablement impliquée dans la pathologie de scorbut, ce qui pourrait contribuer à la diathèse hémorragique de cette maladie. Cependant, la relation entre la thrombopathie et la carence en vitamine C nécessite des études complémentaires.

INTRODUCTION

Epidémiologie de la carence en vitamine C

Le scorbut est une maladie identifiée depuis l'antiquité, avec une image forte liée aux longs voyages maritimes du XIII^e et XVIII^e siècle. C'est une condition potentiellement mortelle mais curable, causée par un apport insuffisant en vitamine C.

De nos jours, il est rarement diagnostiqué dans les pays industrialisés, bien que des cas de scorbut aient été rapportés récemment^[356-359]. La prévalence de la carence en vitamine C a été estimée jusqu'à 17% des patients hospitalisés^[360]. Une hypovitaminose C a été rapportée dans une grande proportion (4 à 70%) des populations différentes y compris des échantillons communautaires^[361, 362], étudiants^[363] et des personnes âgées^[364, 365]. En France, le risque de carence en vitamine C chez l'adulte concerne 3 à 5% des femmes et 8 à 12% des hommes^[366]

Certaines populations présentent un risque plus élevé de développer un scorbut, par exemple, les personnes âgées vivant seules, les faddistes alimentaires, les patients en dialyse, les patients présentant des affections psychiatriques, les patients atteints de malabsorption chronique et au cours de la nutrition parentérale non supplémentée, les alcooliques et les fumeurs^[367-369].

Métabolisme de la vitamine C

La vitamine C ou acide ascorbique est un nutriment essentiel et nécessaire pour de nombreuses fonctions physiologiques dans le corps humain. La plupart des animaux n'ont pas besoin de la source exogène de vitamine C, car ils la synthétisent à partir du glucose par l'intermédiaire de divers systèmes enzymatiques^[370]. Les humains et quelques autres espèces, tels que les primates non humains, les cobayes (les cochons d'Inde), et certains oiseaux, ne possèdent pas cette capacité. Les sources de vitamine C chez l'homme sont uniquement exogènes. Elles se trouvent essentiellement dans les fruits, les légumes et certains aliments d'origine animale.

Le stockage de la vitamine C dans le corps est d'environ 1500 mg. Les besoins quotidiens en vitamine C sont estimés entre 60-100 mg^[371]. Après ingestion, la vitamine C est absorbée au niveau de l'intestin grêle. La vitamine C entre dans le plasma et puis s'accumule majoritairement dans les plaquettes et les leucocytes. La vitamine C est distribuée dans tous les tissus, mais essentiellement dans l'hypophyse, les glandes surrénales et dans le foie^[367]. Il est ensuite éliminé dans les urines.

Rôles physiologiques de la vitamine C

La vitamine C a un grand nombre de fonctions physiologiques^[372, 373] :

- Elle est un puissant réducteur capable de piéger et d'éliminer les radicaux libres et favorise la régénération de la vitamine E ;
- Elle est un cofacteur des enzymes (la prolylhydroxylase et la lysylhydroxylase) impliquées dans l'hydroxylation du collagène. Cette hydroxylation est indispensable à la formation en triple hélice des fibres de collagène mature qui permet de maintenir la structure des tissus et qui est indispensable aux processus de cicatrisation ;
- Elle facilite l'absorption du fer au niveau de la muqueuse gastro-duodénale en rendant le fer ferrique en fer ferreux ;
- Elle participe au métabolisme de la tyrosine et à la synthèse de la carnitine, la noradrénaline, la sérotonine et des hormones peptidiques ;
- Elle a également un rôle dans l'assimilation du calcium, dans les réponses immunitaire, dans le métabolisme des lipides et d'autres nombreux processus.

Présentation clinique du scorbut

Les symptômes de scorbut apparaissent généralement après une période d'un à trois mois de faible apport quotidien en vitamine C, ou lorsque la quantité stockée descend en dessous de 350 mg (normalement environ 1500 mg) ou lorsque le taux plasmatique de la vitamine C $< 0,2$ mg / dL.

Le scorbut est une maladie systémique qui se traduit par de nombreuses manifestations cliniques^[367, 369] :

- au niveau général : fatigue, anorexie, amaigrissement, céphalées, une forte sensibilité aux infections ;
- dermatologiques : ecchymoses, purpura pétéchial, purpura périfolliculaire, hyperkératose folliculaire, cheveux ternes et cassants, oedèmes et des troubles de cicatrisation ;
- dans la cavité buccale : des lésions des gencives qui saignent facilement (gingivite hypertrophique, gingivorragie), déchaussement des dents ;
- dans le système des os et des muscles : myalgie, asthénie musculaire, hématomes musculaires, ostéoporose ;

Un syndrome hémorragique est habituellement dominant dans le tableau clinique de scorbut. Les hémorragies sont souvent de type cutanéomuqueux avec des purpuras périfolliculaires

caractéristiques de scorbut, mais peuvent être aussi sévères (par exemple, des hématomes et des hémorragies digestives). La diathèse hémorragique, ainsi que la plupart des symptômes de scorbut, est attribuée à ce jour, essentiellement à la synthèse anormale du collagène qui est un composant majeur dans les tissus conjonctifs dans tout le corps. Dans le scorbut, l'absence de l'hydroxylation des résidues de proline et lysine rend le collagène instable et incapable de s'assembler en triples hélices rigides.

Cette anomalie affecte en particulier l'intégrité des vaisseaux sanguins en raison de l'altération de la biosynthèse des intimas, médias, adventices et des tissus conjonctifs périvasculaires. Il en résulte une discontinuité de l'endothélium, une hyperperméabilité vasculaire, un œdème périvasculaire et une extravasation des érythrocytes. Il a été rapporté que cette synthèse de collagène défectueuse pouvait expliquer les manifestations hémorragiques ainsi qu'une mauvaise cicatrisation^[374].

Carence en vitamine C et fonctions plaquettaires

L'association de la diathèse hémorragique au scorbut est connue depuis plusieurs siècles. Cependant, il les fonctions plaquettaires ont été peu rapportées dans la littérature dans ce domaine. La première étude par Cetingil *et al*^[375] (1958) a montré que les plaquettes de patients atteints de scorbut ne produisaient quasiment pas de « facteur plaquettaire 3 » (PF3) au contraire des plaquettes normales. Ils ont également observé une diminution de l'agrégation ainsi qu'une diminution de l'adhérence plaquettaire par microscopie à contraste de phase. Ensuite, Born et Wright^[376] (1967) ont observé une diminution de manière significative de l'adhérence plaquettaire *in vitro* au verre à partir de sang de cobayes dans un modèle animal de scorbut. Wilson *et al*^[377] (1967) ont confirmé une adhérence plaquettaire réduite chez les patients de scorbut, et qui pouvait être corrigé rapidement par l'administration de vitamine C. L'année suivante, l'agrégation plaquettaire a été trouvée diminuée dans le scorbut expérimental (cobayes)^[378]. Une autre étude animale a démontré que la vitesse d'agrégation plaquettaire était significativement abaissée avec des plaquettes provenant des cobayes scorbutiques par rapport à celles des cobayes sains, en réponse à l'ADP aux concentrations testées ($2 \text{ à } 5 \times 10^{-7} \text{ M}$) et en réponse au collagène, bien que l'amplitude d'agrégation maximale n'ait pas été rapportée^[379]. Une publication clinique récente^[380] rapporte chez un garçon âgé de 10 ans atteint de scorbut une agrégation plaquettaire diminuée en réponse au collagène ($4 \text{ } \mu\text{g/mL}$), à l'adrénaline ($2 \text{ et } 10 \text{ } \mu\text{M}$) et à l'acide arachidonique ($250 \text{ et } 500 \text{ } \mu\text{g/mL}$), diminuée et réversible à l'ADP ($5 \text{ et } 20 \text{ } \mu\text{M}$) mais associée

à une agglutination normale à la ristocétine. Toutes ces anomalies de l'agrégation plaquettaire ont regressé après traitement substitutif par la vitamine C. Ces observations, suggèrent qu'une thrombopathie est très probablement impliquée dans la pathologie du scorbut.

CAS CLINIQUES

Ici nous décrivons deux cas de scorbut associés à une thrombopathie de type δ -SPD. Les informations cliniques et biologiques sont détaillées dans l'article « Acquired platelet δ -storage pool disease in scorbutic patients » (voir plus loin). Brièvement, les deux patients présentaient une altération de l'état général, un syndrome hémorragique de type purpura pétéchial et une gingivite hypertrophique. Le scorbut a été diagnostiqué sur la détermination de la vitamine C plasmatique qui montrait un niveau de vitamine C effondré ou indétectable. Plusieurs tests ont été réalisés pour évaluer la fonction des plaquettes. L'agrégation montrait une réponse diminuée à tous les agonistes utilisés (collagène à 2 et 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, ADP à 5 et 10 μM , adrénaline à 5 μM , acide arachidonique à 1,39 mM) sauf la ristocétine à 1,5 mg/mL (Figure 16). La sécrétion d'ATP par les plaquettes était diminuée en présence d'un agoniste (collagène à 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ou TRAP à 25 μM). La capture et la sécrétion de la mépacrine des plaquettes sont diminuées ainsi que le ratio d'expression de CD63 après stimulation plaquettaire. Ces résultats orientent fortement vers le diagnostic d'une anomalie du contenu des granules denses.

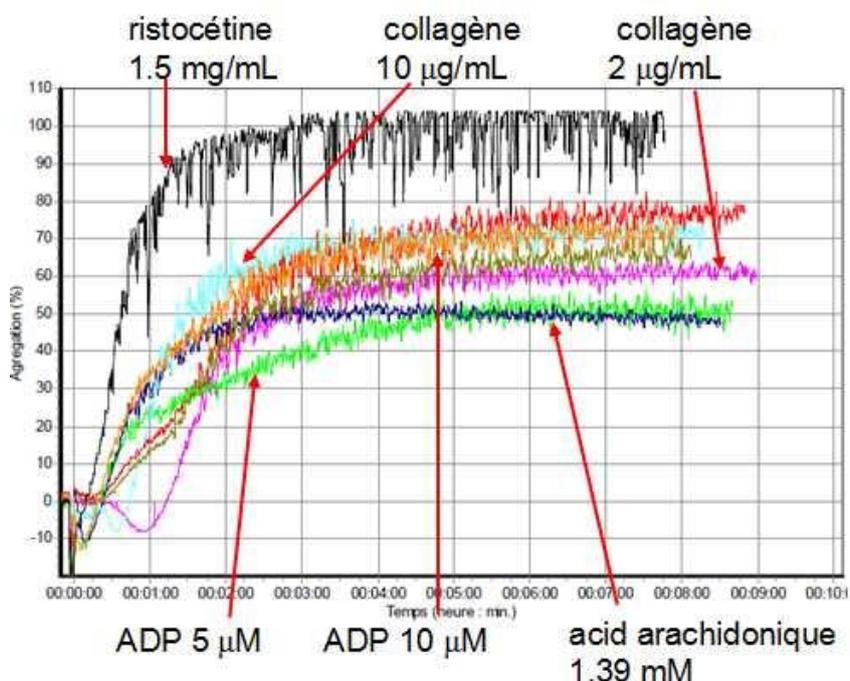


Figure 16. Courbes d'agrégation plaquettaire d'un patient atteint de scorbut.

DISCUSSION

Selon nos connaissances, cette thrombopathie n'a jamais été rapportée associée au scorbut ou à la carence en vitamine C, ce qui justifie des études complémentaires pour expliquer la relation entre l'anomalie des granules denses et la carence en vitamine C.

Comme présenté dans la synthèse bibliographique, cette anomalie des granules denses est caractérisée par un déficit en granules denses qui sont riches en nucléotides (ATP et ADP) et sérotonine. En effet, la vitamine C a un rôle impliqué dans le métabolisme de l'ATP et de la sérotonine.

Premièrement, la vitamine C est un cofacteur essentiel pour la synthèse de la carnitine, qui est nécessaire pour le transport des acides gras dans les mitochondries, où l'oxydation se produit et ainsi la génération de l'ATP^[381]. Une asthénie présente dans le scorbut est probablement liée à une réduction de carnitine musculaire qui provoque également des myalgies^[373, 382]. Les auteurs supposent que la carence en vitamine C entraîne une réduction du métabolisme énergétique et une diminution de l'accumulation d'ATP dans les plaquettes en particulier dans les granules denses, ce qui peut entraîner un déficit du contenu des granules denses .

Deuxièmement, la vitamine C participe également à la biosynthèse de nombreux neurotransmetteurs (ou neuromédiateurs), y compris la sérotonine. Le rôle essentiel de la vitamine C est de recycler la tétrahydrobioptérine, ce qui est nécessaire pour la biosynthèse de la dopamine, la noradrénaline et aussi pour la sérotonine^[373] (Figure 17). Il est bien connu que les patients atteints de scorbut peuvent présenter des symptômes psychiatriques, tels que la fatigue, la dépression, la lassitude et une irritabilité^[367, 373]. L'origine de ces troubles mentaux n'est pas tout à fait établie, mais probablement en relation avec des anomalies de la synthèse des neuromédiateurs. En effet, il a été montré que le niveau de la vitamine C a un effet significatif sur la gravité des symptômes dépressifs et d'autres paramètres de la personnalité^[383-386].

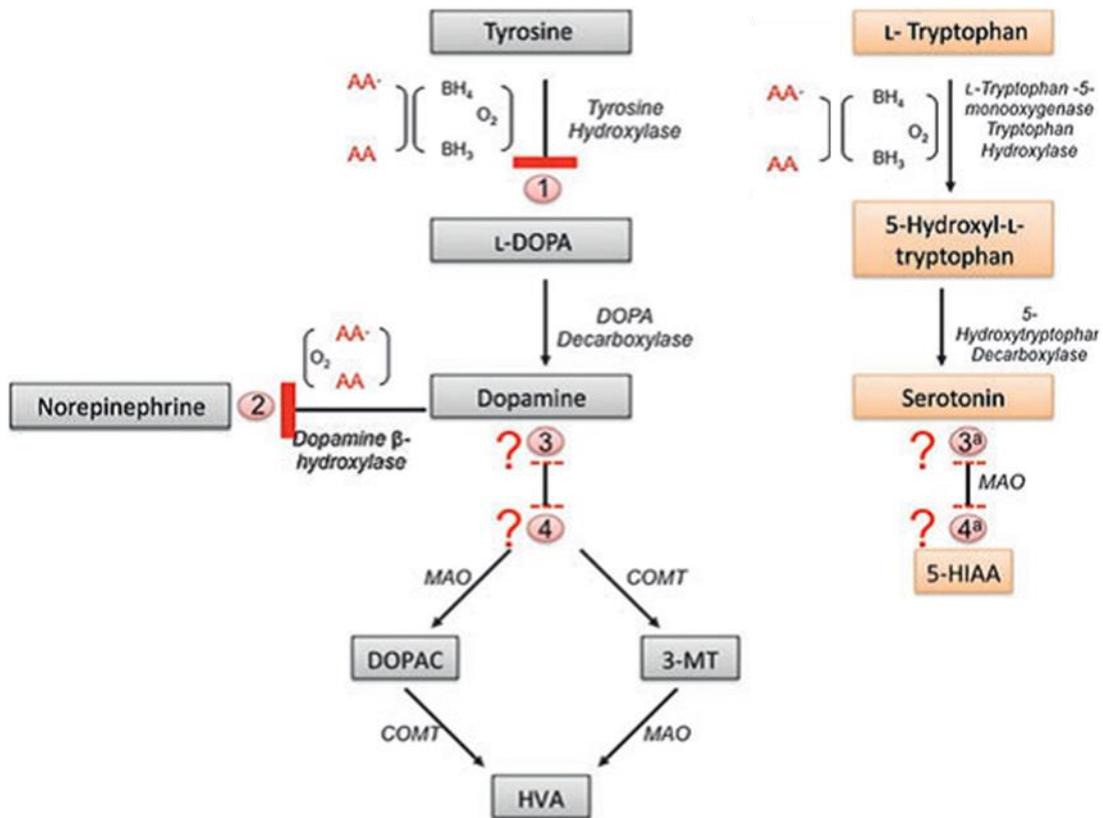


Figure 17. La vitamine C participe à la biosynthèse des neuromédiateurs dont la sérotonine par recycler la tétrahydrobioptérine^[373]. AA : acide ascorbique (vitamine C).

La biosynthèse de la sérotonine a lieu dans le foie, le tractus gastrointestinal, le cerveau et dans différents types cellulaires tels que les cellules entérochromaffines et les neurones. Les plaquettes, dépourvues des enzymes de synthèse, possèdent en revanche un système de capture et d'accumulation de la sérotonine dans les granules denses. Par conséquent, il est fort probable que la carence en vitamine C entraînerait une réduction de synthèse de la sérotonine et ainsi un déficit ou une diminution de la sérotonine dans les plaquettes. Notamment, une diminution d'un métabolite de la sérotonine, l'acide 5-hydroxy-indol-acétique (5-HIAA), a été rapporté associée à une carence en vitamine C^[387, 388]. De plus, ces observations, ainsi que la réduction de synthèse de la dopamine, ont été récemment confirmées chez les souris scorbutiques^[373].

Troisièmement, la concentration de la vitamine C des plaquettes est très élevée, beaucoup plus que celle des leucocytes^[377]. Le stockage de la vitamine C dans les plaquettes est également très réduite chez les patients atteints de scorbut. Cependant, le rôle de la vitamine C intraplaquettaire n'est pas encore bien illustré. Etant donné le rôle antioxydant de la vitamine C, elle joue un rôle dans le métabolisme des

lipides ; il est donc possible qu'elle soit impliquée dans la fonction plaquettaire en modifiant les phospholipides membranaires des plaquettes. Comme mentionné précédemment, il a été rapporté qu'il existait un déficit de production de PF3 sur les plaquettes des patients de scorbut. Il est bien documenté que le PF3 est l'activité procoagulante des plaquettes, qui résulte de l'exposition de la phosphatylsérine (PS) sur la surface des plaquettes lors de l'activation. Cependant, l'implication de la vitamine C dans le métabolisme des phospholipides reste à clarifier.

PERSPECTIVES

La relation entre la carence en vitamine C et l'anomalie des granules denses découvert pour nos patients atteints de scorbut, ainsi que le rôle de la vitamine C intraplaquettaire dans la fonction des plaquettes, constituent des axes futurs à développer. Des études complémentaires incluant le dosage de métabolites de la vitamine C (catécholamines, acyl-carnitine, phényl-alanine) permettant d'avancer dans la compréhension de cette voie sont en cours de réflexion (étude collaborative avec l'équipe de INSERM du Pr Jean-Louis GUEANT).

Article en cours de publication

ARTICLE : ACQUIRED PLATELET Δ-STORAGE POOL DISEASE IN SCORBUTIC PATIENTS

Running tile: Vitamin C deficiency associated platelet abnormality

Huili Cai^{1*}, Pierre Filhine-Tresarrieu^{1*}, Ma'atem Béatrice Fofou-Caillierez², Dominique de Korwin³,
Michel Maignan³, Rosa-Maria Guéant-Rodriguez^{2*}, Véronique Latger-Cannard^{1,4,5*}

¹Service d'Hématologie Biologique, CHRU Nancy, France

²Laboratoire de Biochimie, Biologie Moléculaire, Nutrition et Métabolisme, CHRU Nancy; Inserm U-954
Nutrition-Génétique-Exposition aux Risques Environnementaux, Faculté de Médecine Nancy, France

³Service de Médecine Interne et Immunologie Clinique, CHRU, Nancy

⁴Centre de Compétence Nord-Est des Pathologies Plaquettaires, France

⁵Plateforme de Cytométrie en flux, CHRU, Nancy

*Huili Cai and Pierre Filhine-Tresarrieu contributed equally to this work.

Rosa-Maria Gueant-Rodriguez and Véronique Latger-Cannard contributed equally to this work.

Huili Cai received a graduate studentship award from China Scholarship Council. Otherwise, the authors declare no conflict of interest.

Corresponding author: Véronique Latger-Cannard,

Service d'Hématologie Biologique, CHRU Nancy, rue de Morvan, 54500, Vandoeuvre-Lès-Nancy, Nancy, France.

Tel: +33 (0)3 83 15 37 64.

Fax: +33 (0)3 83 15 37 89.

E-mail: v.cannard@chu-nancy.fr

Abstract

Scurvy is a disease that results from vitamin C deficiency. Its characteristic manifestations including perifollicular petechiae, bruising and gingival bleeding, are assumed to be primarily related to abnormal collagen structure due to vitamin C deficiency. We report two patients with scurvy in which platelet function assays revealed impaired platelet aggregation, reduced ATP secretion, decreased mepacrine uptake and release and abnormal CD63 expression on activated platelets. These findings suggest that a platelet δ -storage pool disease (δ -SPD) is involved in this deficiency, which may additionally contribute to the hemorrhagic diathesis in scurvy.

Keywords: scurvy, vitamin C deficiency, platelet dysfunction, platelet delta-storage pool disease.

Introduction

Scurvy, or hypovitaminosis C, is a rare but still present occurrence in developed countries.¹ Haemorrhagic syndromes have been well reported in this disorder.² However, the physiopathology is still unclear and has been little investigated. Abnormal collagen synthesis resulting in vascular fragility was the hypothesis the most described,² but a few publications reported a potential role of platelets involved in this pathology.³⁻⁵ Herein, we report a platelet δ -SPD in two cases with vitamin C deficiency and bleeding.

Cases

First case was a 59-year-old male presenting with purpuric lesions along the upper limbs and torso with predominance in forearms and severe gingival hypertrophy. He was known for chronic alcoholism and smoking, and notably had a very restrictive diet that was deficient in fruits and vegetables. The second case consisted in a 56-year-old male with psychiatric bipolar disorder presenting with gingival haemorrhages and bilateral symmetric petechial purpura along all four extremities without necrosis or ulceration. Both patients denied recent medication ingestion.

The main laboratory results in two patients were presented in Table I and Table II. Vitamin C level was markedly reduced (Table I). Peripheral blood smear examination showed platelets of normal size and morphology. Platelet investigation by Light Transmission Aggregation (LTA, Soderel Medical) revealed a remarkably reduced response with 5 μ M ADP (HYPHEN BioMed, Neuville-Sur-Oise, France) as well as with 1.39 mM arachidonic acid (HYPHEN BioMed, Neuville-Sur-Oise, France), associated with a moderately impaired response with 2 μ g/mL and 10 μ g/mL collagen (Nycomed, Paris, France) (Table II). Platelet ATP secretion was found to be decreased, in response to either collagen (20 μ g/mL) or TRAP (Thrombin Receptor Activating Peptides 25 μ M, Polypeptide Group, Strasbourg, France), measured in PRP using a dual Chrono-log lumi-aggregometer. Flow cytometry (FCM, FACSCaliburTM cytometer, Becton Dickinson) analysis showed a strikingly reduced uptake and release of mepacrine (Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France), a fluorescent acridine derivative which binds with high affinity to adenine nucleotides and accumulates quickly and selectively into platelet dense granules,⁶⁽²⁾ associated with a low expression of CD63 (PE-CD63 mAb, Beckman Coulter), a membrane marker of dense granule,⁷ on platelets activated by TRAP (Table II). These investigations

confirmed a δ -SPD.

The purpura aetiology was attributed to vitamin C deficiency. The patients received vitamin C supplementation. The follow-up showed after one month a total resolution of clinical abnormalities such as haemorrhagic syndrome or psychiatric state and normalization of vitamin C levels.

Discussion

Vitamin C deficiency is more frequently encountered in developing countries. However, vitamin C deficiency and depletion are also found in lower-class and in middle class in developed countries.¹

Vitamin C is an essential dietary nutrient for a large number of physiologic functions, as an antioxidant and as a cofactor for many enzymes including procollagen praline/lysine hydroxylase.

This enzyme plays an essential role in synthesizing collagen, by facilitating the hydroxylation of collagen peptides to allow cross-linkages between fibrils for proper collagen formation. This abnormality in collagen structure affects a lot of organs: dystrophic or corkscrew hairs, gingival hyperplasia and fragile blood vessel walls are clinical symptoms frequently observed in scurvy. Increased capillary fragility can lead to haemorrhages, which can coalesce, leading to purpura or ecchymoses.

Scarce reports of impaired platelet functions associated with scurvy have been published up to date. In 1967, McNicol *et al.*³ and Born *et al.*⁸ reported, respectively in guinea-pigs and patients with scurvy, an impaired platelet adhesiveness to glass which was rapidly corrected by administration of vitamin C. Explorations by LTA have showed impaired response to ADP in guinea-pigs^{9, 10} and in a 9-year-old patient regressing with vitamin C supplementation.⁵ In the two investigated cases, we have performed more sophisticated analyses such as ATP release, mepacrine and CD63 FCM assays. These results were well correlated to abnormal platelet aggregation curves and confirmed the δ -SPD diagnosis.

δ -SPD results from decreased number and/or content of platelet dense granules, which are rich in nucleotides (ATP and ADP), serotonin, histamine, pyrophosphate and calcium. Nevertheless, defect of dense granule can be due to not only specific quantitative deficiency (δ -SPD) but also specific abnormality in secretion (secretion deficit).

We question about the relationship between δ -SPD and vitamin C deficiency. First of all, it is known that vitamin C facilitates carnitine biosynthesis, which is needed for ATP biosynthesis. Furthermore, the role of vitamin C to recycle tetrahydrobiopterin, is also used in the conversion of L-typtophan to 5-hydroxy-l-typtophan. The latter 5-hydroxytryptophan is decarboxylated to serotonin (5-hydroxytryptamine or 5-HT) by the enzyme aromatic-L-amino-acid decarboxylase with the help of vitamin B6. It is well known that serotonin is essentially synthesized in chromaffin cells, serotonergic neurons and osteoclasts. Serotonin is not synthesized in platelets but is actively taken up from the plasma and accumulated in dense granules where it is likely complexed with ATP and potentially with calcium.

Accordingly, we speculate that vitamin C deficiency could probably result in reduced synthesis of ATP and serotonin, thus leading to δ -SPD and platelet dysfunction. Notably, decreased serotonin metabolite, 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA), associated with vitamin C deficiency has been reported previously, and has been recently confirmed in *gulo*^{-/-} mice with vitamin C deprivation.

All these observations indicate that a δ -SPD is probably involved in scurvy and may additionally contribute to the haemorrhagic diathesis in this disease. To our best knowledge, there are no other reports of acquired platelet δ -SPD associated with scurvy. It is suggested that vitamin C deficiency should be considered in patients with an otherwise unexplained acquired platelet disorder.

Conflict of interest

Huili Cai received a graduate studentship award from China Scholarship Council. Otherwise, the authors declare no conflict of interest.

References

- 1 Schleicher RL, Carroll MD, Ford ES, Lacher DA. Serum vitamin C and the prevalence of vitamin C deficiency in the United States: 2003-2004 National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES). *Am J Clin Nutr* 2009;**90**:1252-63.
- 2 Popovich D, McAlhany A, Adewumi AO, Barnes MM. Scurvy: forgotten but definitely not gone. *J Pediatr Health Care* 2009;**23**:405-15.
- 3 McNicol GP, Douglas AS. Platelet abnormality in human scurvy. *Lancet* 1967;**1**:975-8.
- 4 Johnson GJ, Holloway DE, Hutton SW, Duane WC. Platelet function in scurvy and experimental human vitamin C deficiency. *Thromb Res* 1981;**24**:85-93.
- 5 Dey F, Moller A, Kemkes-Matthes B, *et al.* Reduced platelet aggregation in a boy with scurvy. *Klin Padiatr* 2012;**224**:448-52.
- 6 Wall JE, Buijs-Wilts M, Arnold JT, *et al.* A flow cytometric assay using mepacrine for study of uptake and release of platelet dense granule contents. *Br J Haematol* 1995;**89**:380-5.
- 7 Nishibori M, Cham B, McNicol A, Shalev A, Jain N, Gerrard JM. 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* 1993;**91**:1775-82.
- 8 Born GV, Wright HP. Platelet adhesiveness in experimental scurvy. *Lancet* 1967;**1**:477-8.
- 9 Born GV, Wright HP. Diminished platelet aggregation in experimental scurvy. *J Physiol* 1968;**197**:27P-28P.
- 10 Purcell IM, Constantine JW. Platelets and experimental scurvy. *Nature* 1972;**235**:389-91.

Table I. Laboratory data.

Variables	Patient 1	Patient 2	Reference Ranges
Hemoglobin (g/dL)	13.9	10	13.0-17.0
Mean Corpuscular Volume (fL)	111.5	87.7	82.0-98.0
Leucocyte (G/L)	5.7	3.5	4.0-10.0
Platelet (G/L)	366	131	150-350
Mean Platelet Volume (fL)	7.5	9.1	8.0-10.0
Albuminemia (g/L)	35.3	35	38.0-46.0
Prealbuminemia (g/L)	0.16	0.1	0.20-0.40
Vitamin C ($\mu\text{mol/L}$)	6.2	Undetectable	28.4-90.8

Table II. Investigations of platelet function.

Assays	Patient 1	Patient 2	Reference Ranges
Platelet aggregation % maximal			
Collagen 2 $\mu\text{g/mL}$	62.53%(NR)	74.23%(NR)	72.11-90.73
Collagen 10 $\mu\text{g/mL}$	73.11%(NR)	66.99%(NR)	76.13-91.08
Adrenaline 5 μM	77.87%(NR)	52.45%(BP)	72.39-91.63
Adrenaline 10 μM	68.91%(NR)	60.79%(BP)	70.99-87.51
ADP 5 μM	52.51%(BP,R)	59.47%(BP)	66.73-83.47
ADP 10 μM	73.52%(NR)	78.61%(BP)	72.75-86.09
Arachidonic acid 1.39 mM	51.87%(R)	59.17%(R)	71.21-91.69
Ristocetin 1.5 mg/mL	103.20%(NR)	93.71%(NR)	82.88-98.27
ATP secretion ($\mu\text{mol}/10^9$ platelets)			
in response to collagen 20 $\mu\text{g/mL}$	4.8	5.7	12.7-27.2
in response to TRAP 25 μM	3.5	4.3	12.3-25.5
Flow Cytometric assay			
Uptake ratio	2.86	3.34	4.00-6.58
Release ratio	1.32	1.67	1.97-2.79
CD63 ratio	5.74	5.8	8.86-15.48

NR: not reversible; BP: biphasic; R: reversible

ETUDE 4 : DETECTION DE LA SEROTONINE DANS LES GRANULES DENSES PLAQUETTAIRES PAR CYTOMETRIE EN FLUX

RESUME

Contexte

La sérotonine est synthétisée et sécrétée majoritairement par les cellules entérochromaffines du tube digestif, et puis captée et stockée dans les granules denses plaquettaires. La quantification de sérotonine intra-plaquettaire constitue un outil important dans le diagnostic des thrombopathies de type δ -SPD, la surveillance biologique des antidépresseurs de type inhibiteur sélectif de la recapture de la sérotonine (ISRS), et le dépistage et le suivi des tumeurs carcinoïdes. A ce jour, il n'existe pas de méthode de quantification de sérotonine intra-plaquettaire facile et rapide, utilisable en routine dans les laboratoires.

Objectif

Le but de cette étude a été d'utiliser la cytométrie en flux, technologie largement disponible dans les laboratoires d'analyses hématologiques pour mesurer la quantité de sérotonine intraplaquettaire, afin à la fois d'évaluer le pool intraplaquettaire et d'évaluer la capacité sécrétoire des granules denses plaquettaires après stimulation.

Méthodes

Les plaquettes sont fixées par du paraformaldéhyde (PAF) et perméabilisées par du TritonTM X-100. Après un marquage indirect avec un anticorps monoclonal anti-sérotonine (tube test) ou un anticorps isotypique (tube contrôle) et un anticorps secondaire conjugué au FITC, les plaquettes sont analysées sur un cytomètre. Un ratio est calculé en divisant l'intensité médiane de fluorescence (IMF) du « tube test » par celle de « tube contrôle ». Afin d'évaluer la sécrétion plaquettaire, les plaquettes sont activées en présence d'un agoniste fort, le TRAP. Pour évaluer la sérotonine de surface des plaquettes, ce test est réalisé sur les plaquettes sans perméabilisation.

Résultats

Nous avons optimisé les conditions de fixation et de perméabilisation et le titrage des anticorps. Les résultats obtenus à partir de huit donneurs sains montrent que le ratio présente une petite variation inter-individuelle (CV 23%) en comparaison avec l'IMF (CV 47%) et la différence de l'IMF entre tubes test et contrôle (CV 50%). Après l'activation plaquettaire, l'IMF est augmentée par rapport à celle des plaquettes à l'état basal, ce qui est très inattendu. Aucune différence significative est observée entre l'IMF des plaquettes activées et celle des plaquettes à l'état basal (toutes non perméabilisées).

Conclusion

Nous avons développé une méthode de cytométrie en flux pour la détection de sérotonine plaquettaire. Cette méthode peut être facilement appliquée dans la majorité de laboratoires cliniques équipés avec un cytomètre. Cependant, ce test ne peut pas être utilisé pour évaluer la capacité de sécrétion des plaquettes. L'augmentation de l'IMF après l'activation plaquettaire n'est pas causée par la fixation de sérotonine sur la surface des plaquettes.

INTRODUCTION

La sérotonine est synthétisée et sécrétée de façon prédominante par les cellules entérochromaffines de l'intestin grêle. Les plaquettes qui ne la synthétisent pas, mais la fixent à partir du plasma et la stockent au niveau des granules denses (pratiquement toute la sérotonine du sang), par l'intermédiaire de son transporteur (*serotonin transporter*, SERT). L'activation des plaquettes libère la sérotonine, qui potentialise en retour l'agrégation plaquettaire et provoque une vasoconstriction via le récepteur 5-HT_{2A} au niveau des vaisseaux lésés^[389]. La sérotonine est ainsi un composant majeur des granules denses et elle est diminuée ou absente dans la maladie de pool vide delta (δ -SPD). Le diagnostic de celle-ci peut être établi par le dosage des nucléotides (ATP, ADP) totaux ou libérés par les plaquettes, et l'analyse morphologique par microscopie électronique. Toutefois, dans certaines formes de δ -SPD, la diminution de la sérotonine n'est pas toujours parallèle avec celle des nucléotides et du calcium. Par exemple, les médicaments ISRSs inhibent la capture de la sérotonine par les plaquettes, ce qui en résulte une diminution sélective de la sérotonine dans les granules denses^[390]. Une étude récente a rapporté que certains patients avec δ -SPD constitutionnel étaient associés à un niveau normal de la sérotonine mais une teneur des nucléotides réduite due probablement à un défaut de la protéine ABCC4 (*ATP-binding cassette, sub-family C, member 4 protein*)^[391]. Pour ces patients, la détection de la sérotonine plaquettaire est indispensable pour préciser le diagnostic.

Au niveau du système nerveux central, la sérotonine, ne passant pas la barrière hémato-encéphalique, est synthétisée *in situ* par les neurones sérotoninergiques. La sérotonine, libérée par les neurones au niveau des fentes synaptiques est, en grande partie, recaptée par eux. Les effets de la sérotonine au niveau du système nerveux central sont nombreux et complexes, encore mal connus mais d'une importance considérable sur le plan pharmacologique car de nombreux médicaments agissent par son intermédiaire. Les ISRSs augmentent le taux de la sérotonine au niveau des fentes synaptiques en inhibant sa recapture par les neurones *via* son transporteur SERT^[392]. Ces médicaments sont largement utilisés pour le traitement de la dépression, de l'anxiété et de trouble obsessionnel compulsif^[393]. Néanmoins, les plaquettes expriment le même SERT que les neurones^[394] et ainsi les ISRSs

inhibent également la recapture de la sérotonine dans les granules denses (δ -SPD), ce qui en résulte une altération de la fonction plaquettaire et un risque hémorragique en particulier digestif^[395, 396]. En outre, le polymorphisme du gène SLC6A4 codant pour SERT joue un rôle dans la régulation du taux de sérotonine intracellulaire ainsi que les effets thérapeutiques^[397], ce qui justifie aussi une surveillance clinique et biologique. Le dosage de la sérotonine plaquettaire représente un bon paramètre biologique.

De plus, la prolifération des cellules entérochromaffines du tube digestif entraîne une hypersécrétion de sérotonine, responsable des manifestations de « flush » (diarrhées, asthme, troubles cardiaques...). Le diagnostic biologique de ces tumeurs repose sur l'augmentation de la concentration de sérotonine dans le sang et de l'excrétion des métabolites de la sérotonine (par exemple, 5-HIAA) dans les urines. L'élévation du taux plaquettaire de la sérotonine semble se révéler plus précoce et plus sensible^[398].

En résumé, il existe de nombreuses applications du dosage de la sérotonine plaquettaire, y compris le principal intérêt dans le diagnostic des thrombopathies de type δ -SPD, la surveillance biologique des thrombopathies iatrogènes en lien avec la prise d'ISRSs, et aussi le dépistage et le suivi des tumeurs carcinoïdes.

Actuellement, les dosages de sérotonine sont pour l'essentiel réalisés par la chromatographie liquide haute performance (HPLC) avec une détection électrochimique ou fluorimétrique^[399, 400], et des essais immunoenzymatiques (ELISA)^[186, 390, 401]. Les avantages majeurs pour ces méthodes sont qu'elles sont sensibles et spécifiques et que les prélèvements peuvent être congelés et envoyés après un prétraitement nécessaire (par exemple, préparation du plasma riche en plaquettes). Cependant, la HPLC, une technique exigeante et complexe, n'est disponible que dans quelques laboratoires spécialisés et elle ne permet pas une réponse rapide (souvent quelques jours à semaines de délai)^[129, 399]. Des trousse ELISA commerciales pour le dosage de sérotonine sont disponibles, mais elles doivent être réalisées en série pour réduire le coût et les processus sont aussi longs^[390]. Du fait de ces contraintes techniques, ces analyses ne sont pas adaptées à l'exploration d'une thrombopathie des granules denses dans un contexte d'urgence représenté par la prise en charge d'un syndrome hémorragique avec répercussion clinique.

La disponibilité de l'anticorps monoclonal anti-sérotonine et l'implantation de cytométrie en

flux dans la majorité des laboratoires impliqués dans l'exploration plaquettaire nous ont incités à développer une technique de détection de la sérotonine plaquettaire par cette méthodologie. Dans la littérature, la détection de la sérotonine par cytométrie en flux a été rapportée par deux équipes^[187, 188, 402].

Dans ce travail, nous présentons les différentes étapes d'optimisation de la quantification par cytométrie en flux, de la sérotonine intra-plaquettaire, à l'état basal et après stimulation plaquettaire afin d'évaluer le contenu en sérotonine plaquettaire et la capacité sécrétoire des granules denses.

MATERIELS ET METHODES

Donneurs sains et prélèvements

Tous les prélèvements ont été effectués chez les donneurs sains, dans le cadre d'une collaboration entre le Service d'Hématologie Biologique (Hôpital Brabois, CHRU Nancy) et l'Etablissement Français du Sang à Nancy et en accord avec les recommandations de la Déclaration d'Helsinki.

Les participants ne présentent pas des saignements excessifs ni d'autres maladies connues, et n'ont pas pris de médicaments pouvant interférer avec la fonction plaquettaire ou la coagulation. Pour faciliter la présentation des données, les donneurs sont numérotés de façon consécutive, par exemple, D1, D2, D3...

Les prélèvements de sang veineux périphérique sont recueillis dans tubes contenant 3.2% de citrate de sodium (Vacutainer 0.105 M, Becton Dickinson, Le Pont de Claix, France) avec des précautions de minimiser l'activation plaquettaire. Le délai entre le prélèvement et la prise en charge technique est limité à quelques minutes.

Préparation du plasma riche en plaquettes (PRP)

Une centrifugation est effectuée à la vitesse de 150 g pendant 12 minutes à température ambiante. Cette centrifugation permet la séparation d'un surnageant contenant du plasma riche en plaquettes (PRP) et d'un culot contenant les leucocytes et les érythrocytes. Le PRP est récupéré à l'aide d'une pipette et transféré dans un tube à hémolyse. Un comptage de plaquettes est réalisé pour chaque échantillon PRP à l'aide de l'hématimètre Sysmex XN

(Sysmex), puis la concentration plaquettaire est ajustée à $300 \times 10^9/L$ avec du PBS (Phosphate Buffered Saline Dulbecco, Eurobio, Courtaboeuf, France) si elle est supérieure à $300 \times 10^9/L$.

Activation des plaquettes

Afin d'évaluer la sécrétion plaquettaire, les plaquettes activées sont préparées en parallèle avec celles à l'état basal. Le PRP est incubé en présence de TRAP (TRAP 14AA, Polypeptide Group, Strasbourg) à une concentration finale de $60 \mu M$ pendant 15 minutes à température ambiante. Les plaquettes à l'état basal sont préparées en incubant avec du PBS au lieu de TRAP. Après une concentration à $500 g$ pendant 5 minutes à température ambiante, les plaquettes sont resuspendues dans du PBS avec le même volume que celui initial.

Immunomarquage de la sérotonine plaquettaire

Les étapes de marquage sont schématisées dans la Figure 18. Brièvement, les plaquettes activées ou à l'état basal sont fixées en incubant avec du PAF (Sigma-Aldrich Co. LLC, Missouri, Etats-Unis) pendant 45 minutes à température ambiante, puis perméabilisées avec du Triton™ X-100 (Sigma-Aldrich Co. LLC, Missouri, Etats-Unis) pendant 30 minutes à $37^\circ C$. Ensuite, les plaquettes sont lavées une fois avec du tampon PBS et resuspendues dans du tampon PBS. Chaque tube est divisé en deux aliquotes égales, nommées « tube test » et « tube contrôle ». Le « tube test » est incubé avec d'anticorps monoclonal de souris anti-5 HT humaine (anticorps primaire, A1) (Clone 5HT-H209, DAKO, Courtaboeuf, France), alors que le « tube contrôle » avec l'anticorps isotypique IgG1 (DAKO, Courtaboeuf, France) à la même concentration, pendant 5 minutes à $37^\circ C$. A la suite d'un lavage avec du PBS, les plaquettes resuspendues dans du PBS sont incubées avec l'anticorps F(ab')₂ de chèvre conjugué à FITC anti-IgG(H+L) de souris (anticorps secondaire, A2) (CEDARLANE, France) pendant 30 minutes à l'obscurité. Enfin, les plaquettes marquées sont diluées avec du PBS à 1 :100 avant l'analyse par cytométrie en flux.

Afin d'optimiser les conditions de marquage, nous avons testé deux concentrations de fixatif PFA (1%, 2%), 3 concentrations de réactif perméabilisant Triton™ X-100 (0.2%, 0.5%, 1%) (concentration finale pour tous les deux réactifs) et de nombreuses combinaisons de ratios entre l'anticorps primaire et secondaire. Nous avons également testé une trousse commercialisée de fixation/perméabilisation (PerFix-nc, Immunotech, Beckman Coulter).

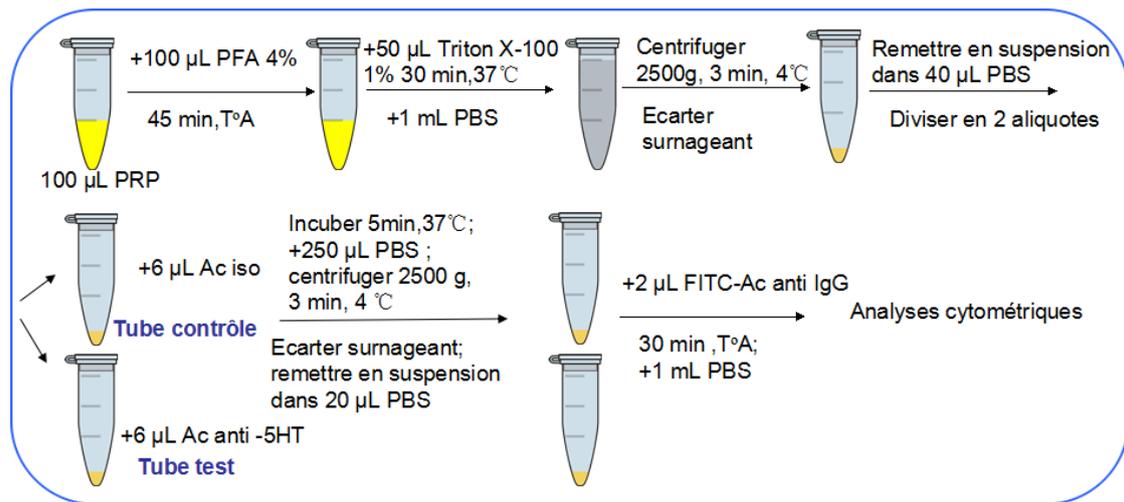


Figure 18. Le schéma des étapes du marquage immunologique.

Analyse par cytométrie en flux

A la fin de l'immunomarquage, les plaquettes sont analysées à l'aide d'un cytomètre FACSCanto™ II (BD). Un tube contenant des plaquettes non marquées est utilisé pour faire les réglages (voltages, gains) des photomultiplicateurs (PMTs). Le nombre d'évènements acquis est fixé à 10 000. Les analyses des données sont réalisées à l'aide du logiciel FACS Diva v6.1.3. La population plaquettaire est identifiée sur l'histogramme biparamétrique (taille versus structure, ou *Forward Scatter* versus *Side Scatter*). L'histogramme monoparamétrique de la fluorescence est conditionné sur cette population plaquettaire. La teneur de sérotonine dans les plaquettes est représentée par un ratio Test/Contrôle qui est calculé en divisant l'intensité de fluorescence moyenne (IMF) du « tube test » par celle de « tube contrôle ». Ce ratio représente donc d'autant plus élevé que la teneur de sérotonine est importante. Une différence de l'IMF (Test-Contrôle) est également calculée.

RESULTATS

Faisabilité de la détection de sérotonine plaquettaire par cytométrie en flux

La Figure 19 montre des cytogrammes trouvés pour les donneurs sains. Sur l'histogramme biparamétrique FSC/SSC, les plaquettes respectent une distribution habituelle des plaquettes non agrégées (fenêtre « Plaquettes »). L'intensité de fluorescence liée à l'immunomarquage anti-sérotonine est ensuite analysée sur cette population plaquettaire à l'aide de l'histogramme monoparamétrique de fluorescence. La fixation non-spécifique est évaluée dans le « tube

contrôle », correspondant à la fixation du contrôle isotypique. Le « tube test » montre une augmentation de l'intensité de fluorescence par rapport au « tube contrôle » (le pic de fluorescence déplaçant vers à droite), qui est provoquée par le marquage spécifique de la sérotonine plaquettaire.

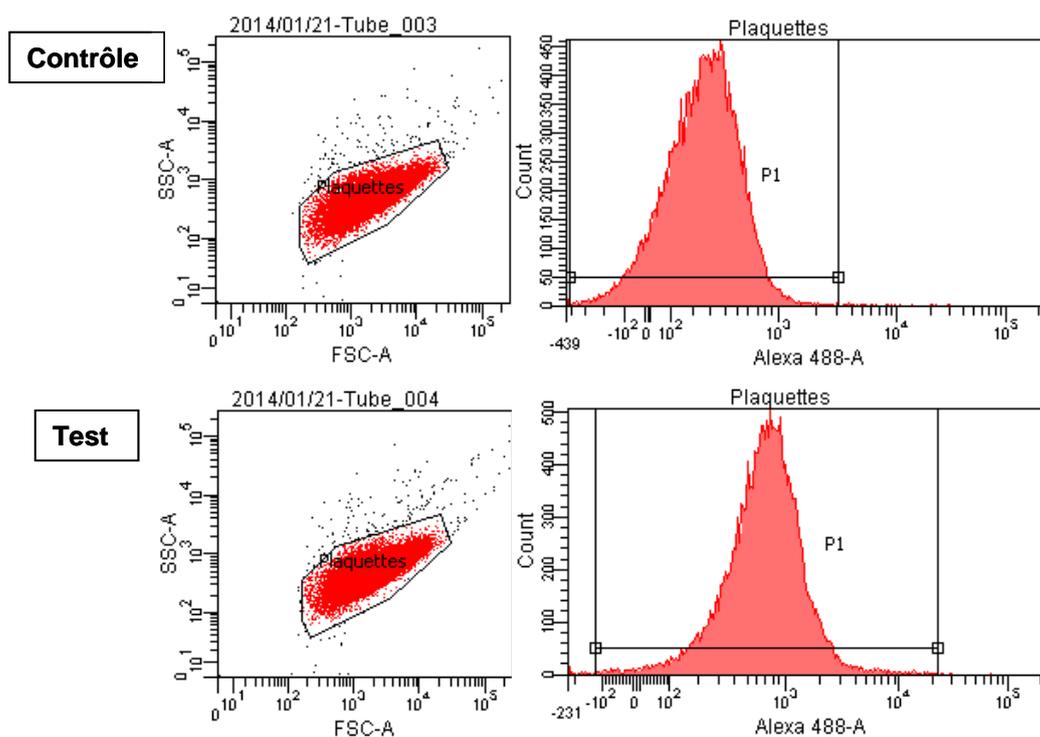


Figure 19. Histogrammes représentatifs de la détection de sérotonine des plaquettes à l'état basal. Le panel en haut provient du tube contrôle, et celui en bas obtenu du tube test.

Variations des conditions de fixation et de perméabilisation

Afin d'optimiser la détection de sérotonine plaquettaire, nous avons fait varier les conditions de fixation et de perméabilisation. Nous avons testé deux concentrations de PFA (1%, 2%) et trois concentrations de Triton™ X-100 (0,2%, 0,5%, 1%). Les résultats montraient que la fixation avec 2% PFA aboutait à un ratio plus élevé que celle avec 1% PFA (ratio 2,94 versus 1,40). La perméabilisation avec 0,2% Triton X-100 est la meilleure en terme de ratio (2,94 versus 2,19 et 1,70 pour 0,5% et 1% respectivement) (Tableau XVII). Ainsi les conditions associant 2% PFA et 0,2% Triton X-100 ont été utilisés pour la suite de nos expérimentations. La trousse PerFix-nc a été également testée, mais elle ne présentait pas de meilleure performance dans ce test en terme de ratio et l'IMF (Tableau XVIII)

Tableau XVII. Comparaison de la performance de la fixation et de la perméabilisation à concentrations différentes (sur le donneur D1).

Combinaisons	1	2	3	4
PFA (concentration finale)	2%	2%	2%	1%
Triton X-100 (concentration finale)	0,2%	0,5%	1%	0,2%
Ratio	3,06	2,36	1,95	1,45

Tableau XVIII. Comparaison de la performance de la fixation et de la perméabilisation avec réactifs différents.

Réactifs	2%PFA et 0,2% Triton X-100			PerFix-nc (Beckman Coulter)		
	IMF	IMF Test	Ratio	IMF	IMF Test	Ratio
	Contrôle		Test/Contrôle	Contrôle		Test/Contrôle
D21	265	1348	5,09	259	331	1,28
D22	267	1187	4,45	133	324	2,44

Titration des anticorps (A1 et A2)

Afin de déterminer les meilleures concentrations des anticorps, nous avons fait varier les concentrations d'anticorps primaire et secondaire (Tableaux XIX A, B, C, D). L'intensité de fluorescence et le ratio ont augmenté proportionnellement à l'augmentation des concentrations d'anticorps. Cependant, l'analyse du ratio A1/A2 montre une saturation de fluorescence avec les concentrations 6 μ L d'A1 et 3 μ L d'A2 (la combinaison de 8 μ L d'A1 et 4 μ L d'A2 n'augmentait quasiment pas l'intensité de fluorescence et le ratio) (donneurs D6-D8) (Tableaux XIX C). Ce résultat a été confirmé par une autre série de titrage d'anticorps (Tableaux XIX D). En conclusion, la combinaison de 6 μ L A1 et 2 μ L A2 a été considérée comme la plus optimale en fonction de ratio Test/Contrôle (ou ratio signal/bruit de fond) et de saturation de fluorescence. Cette combinaison a été utilisée dans la suite de nos expérimentations.

Tableaux XIX. Titrage des anticorps.

A.

Combinaisons	1	2	3	4	5	6
Anticorps primaire	2 μ L	2 μ L	4 μ L	4 μ L	6 μ L	6 μ L
Anticorps secondaire	1 μ L	2 μ L	2 μ L	4 μ L	3 μ L	6 μ L
Ratio sur le donneur D3	1,99	1,65	1,97	2,01	2,80	1,62

B.

Combinaisons	1	2
Anticorps primaire	2 μ L	6 μ L
Anticorps secondaire	1 μ L	3 μ L
Ratio sur donneur D4	4,83	5,57
Ratio sur donneur D5	1,93	2,19

C.

Combinaisons	1	2
Anticorps primaire	6 μ L	8 μ L
Anticorps secondaire	3 μ L	4 μ L
Ratio sur donneur D6	5,6	5,92
Ratio sur donneur D7	5,39	5,41
Ratio sur donneur D8	6,50	6,17

D.

Combinaisons	1	2	3	4	5
Anticorps primaire	6 μ L	6 μ L	6 μ L	8 μ L	8 μ L
Anticorps secondaire	1 μ L	2 μ L	3 μ L	2 μ L	4 μ L
Ratio sur le donneur D9	4,57	3,96	3,46	4,44	3,45
Ratio sur le donneur D10	4,05	4,43	3,55	3,69	4,06

Résultats de quantification de sérotonine plaquettaire à l'état basal

Des échantillons de sang de huit donneurs ont été analysés avec les conditions déterminées précédemment ; les résultats sont présentés dans le Tableau XX.

Les résultats ont été exprimés en différence d'IMF entre le tube Test et le tube Contrôle ou en ratio d'IMF Test/ Contrôle. La différence entre l'IMF du Test, considérée comme la fixation totale de l'anticorps et l'IMF du Contrôle isotypique, considérée comme la fixation aspécifique, correspond à la fixation spécifique. Les résultats sont exprimés également en ratio entre l'IMF du Test par rapport à celle du Contrôle.

Les variations inter-individuelles importante sont notées pour l'IMF et la différence. L'expression des résultats en ratio donne un meilleur CV (Tableau XX).

Tableau XX. Quantification de la sérotonine plaquettaire à l'état basal chez des donneurs sains.

Donneurs	IMF Contrôle	IMF Test	Différence (T-C)	Ratio Test/Contrôle
D1	200	779	579	3,90
D19	824	2187	1363	2,65
D20	543	2731	2188	5,03
D21	265	1348	1083	5,09
D22	267	1187	920	4,45
D23	584	2545	1961	4,36
D24	282	877	595	3,11
D25	401	1321	920	3,29
M±S.D.	421±214	1622±758	1021±598	3,99±0,9
CV	51%	47%	50%	23%

L'évaluation de la capacité de sécrétion plaquettaire

Afin d'évaluer la capacité sécrétoire des granules denses plaquettaires, les plaquettes sont activées par un puissant agoniste TRAP et analysées en parallèle avec les plaquettes à l'état basal. Les résultats sont présentés dans le Tableau XXI. Le donneur D16 n'a pas été inclus à cause d'un problème technique. L'analyse des graphes taille/structure montre une répartition

très hétérogène du nuage plaquettaire beaucoup plus prononcée qu'à l'état basal (Figure 20). En théorie, la plaquette activée libère le contenu des granules, et donc la sérotonine dans le milieu extracellulaire, ce qui doit entraîner une diminution de la teneur de sérotonine, reflétée par une diminution de l'intensité de fluorescence en lien avec le marquage de la sérotonine. Or les résultats montrent une augmentation de l'IMF liée à la fixation de l'anticorps anti-sérotonine des plaquettes activées pour les échantillons testés. Cependant, les résultats ont montré une augmentation de l'IMF des plaquettes activées dans tous les échantillons testés. De plus, le ratio de l'IMF Test/Contrôle est plus élevé (dans la majorité des cas) que ou similaire à celui à l'état basal, ce qui est contraire à nos attentes (Tableau XXI).

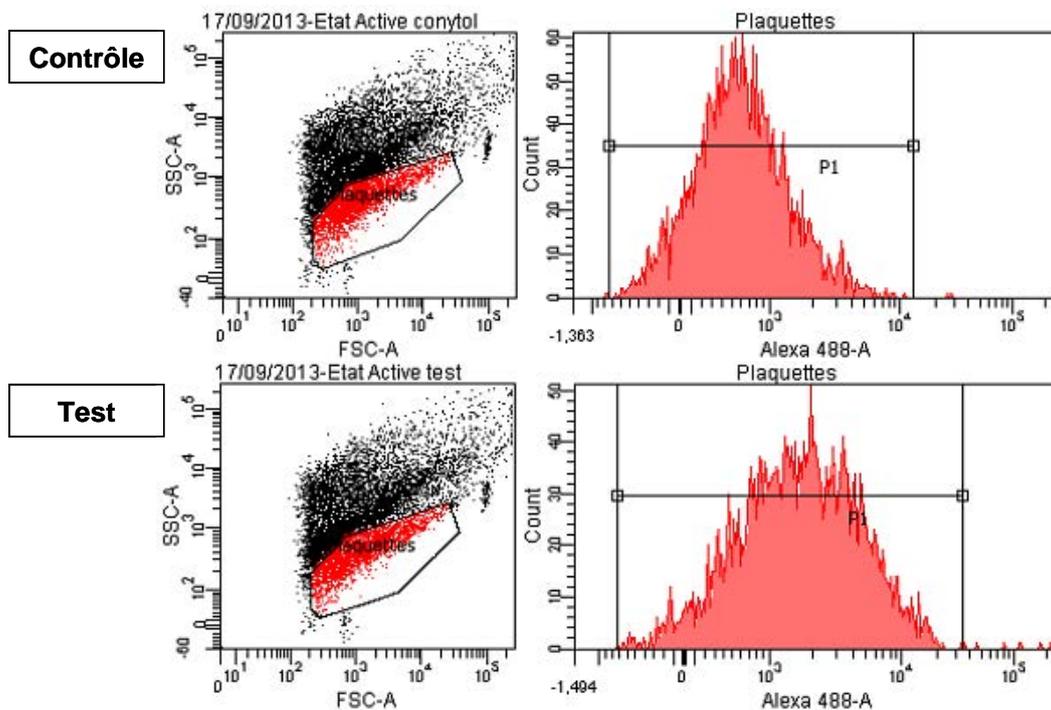


Figure 20. Histogrammes représentatifs de la détection de sérotonine des plaquettes activées. Le panel en haut représente le tube contrôle, et celui en bas représente le tube test.

Tableau XXI. Comparaison des résultats à l'état basal et à l'état activé.

Donneurs	Etat basal			Etat activé		
	IMF	IMF Test	Ratio	IMF	IMF Test	Ratio
	Contrôle		Test/Contrôle	Contrôle		Test/Contrôle
D11	279	1515	5,43	824	4122	5,00
D12	200	1851	9,25	322	2968	9,21
D13	288	2284	7,93	553	6823	12,34
D14	208	1449	6,97	423	3002	7,10
D15	581	1743	3,00	409	2040	4,99
D17	571	1363	2,39	813	2967	3,75
D18	1036	4899	4,73	2211	8829	3,99
D26	278	1150	4,14	411	2300	5,60

La détection de sérotonine sur la surface des plaquettes

Afin de déterminer si l'augmentation de l'IMF des plaquettes activées serait due à la fixation de la sérotonine sur la surface des plaquettes, nous avons réalisé ce test avec et sans perméabilisation. Les résultats sont résumés dans le Tableau XXII.

En l'absence de perméabilisation, les anticorps ne peuvent pas pénétrer dans les plaquettes. Ainsi, la fluorescence ne représente que le marquage de la sérotonine de surface. L'analyse des histogrammes de distribution de fluorescence liée à l'immuno-marquage de sérotonine à l'état basal et sans perméabilisation a montré une distribution bi-modale, et ce pour 3 échantillons de donneurs sains (Figure 21). Cette distribution correspond à la présence de deux populations plaquettaires, l'une ne présentant pas de sérotonine de surface et l'autre présentant une expression de sérotonine de surface à l'état basal.

De plus, toujours en l'absence de perméabilisation, aucune différence significative n'a été observée entre l'IMF des plaquettes activées et celle des plaquettes à l'état basal. Donc l'activation plaquettaire n'entraînait pas d'augmentation de la quantité de sérotonine sur la surface des plaquettes.

En comparant avec les plaquettes non perméabilisées, les plaquettes perméabilisées

présentaient une IMF augmentée en raison du marquage intracellulaire, que ce soit à l'état basal ou à l'état activé.

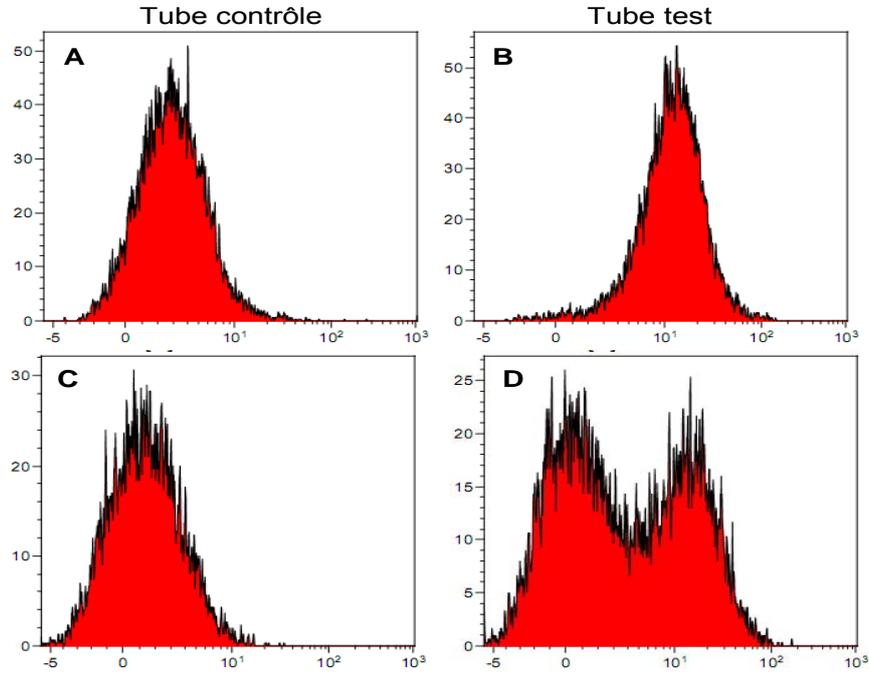


Figure 21. Comparaison des plaquettes perméabilisées (A et B) et non perméabilisées (C et D) sur un donneur.

Tableau XXII. Détection de la sérotonine sur la surface des plaquettes.

	Etat basal				Etat activé			
	Sans		Avec		Sans		Avec	
	perméabilisation		perméabilisation		perméabilisation		perméabilisation	
	Contrôle	Test	Contrôle	Test	Contrôle	Test	Contrôle	Test
Donneur	417	2029	1036	4899	458	1962	2211	8829
D18								
Donneur	346	1967	940	3911	515	1929	1185	11627
D27								
Donneur	354	1304	754	1566	614	1228	1898	7655
D28								

DISCUSSION

Dans cette étude, nous présentons une nouvelle approche de détection de la sérotonine plaquettaire, développée à partir d'une méthode décrite par Maurer-Spurej^[187]. Nous avons optimisé les conditions méthodologiques, telles que la fixation, la perméabilisation et le titrage des anticorps primaire et secondaire.

Notre approche consiste en un marquage immunologique indirecte avec perméabilisation et la détection par cytométrie en flux. Il est à noter qu'il n'existe pas à ce jour, d'anticorps anti-sérotonine fluorescent commercial, ce qui explique la méthodologie indirecte. De façon alternative, des anticorps non marqués peuvent être conjugué au FITC avec une trousse commerciale, par exemple « QuickTag FITC conjugation kit » (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN)^[201]. D'autres sociétés offrent la possibilité de réaliser ce couplage, ce qui pourrait être une voie de développement de ce test.

Dans notre étude, la teneur de sérotonine dans les plaquettes est déterminée par une analyse de cytométrie semi-quantitative. Les résultats de huit donneurs sains ont montré une considérable variation inter-individuelle (CV 47%) lorsque l'IMF du tube test a été prise en compte. Par contre, les ratios calculés à partir des tubes contrôle et test apparaissent beaucoup plus « homogène » avec un CV à 23%, ce qui consiste un avantage pour définir les intervalles de référence. Une question se pose que si le ratio est en corrélation avec la quantité de sérotonine dans plaquettes. Une étude comparative avec le dosage de sérotonine par HPLC sera nécessaire pour résoudre la question.

Après avoir optimisé les conditions de préparation cellulaire et d'immunomarquage à l'état basal, nous avons étudié la capacité de ce test à explorer la phase de sécrétion des granules denses plaquettaire en activant les plaquettes. Après activation, le nuage plaquettaire est apparu beaucoup plus hétérogène avec beaucoup de débris, ce qui est une situation attendue. En effet, il est connu que les plaquettes activées peuvent générer des microparticules ou des fragments cellulaires, qui peuvent apparaître sur le cytogramme FSC/SSC^[193, 403]. Par conséquent, l'utilisation d'un anticorps monoclonal spécifique de la lignée plaquettaire permettrait d'améliorer l'identification des plaquettes^[70]. Cette proposition n'a pas été appliquée du fait des résultats décevants de la phase sécrétoire.

Théoriquement, la sérotonine est libérée dans le milieu extra-cellulaire par les plaquettes activées et la détection de sérotonine intraplaquettaire devrait être diminuée. Cependant, nous avons observés une augmentation de l'IMF liée à l'immunomarquage de la sérotonine après activation des plaquettes par le TRAP. Dans la littérature, il a été rapporté que la sérotonine peut se fixer sur la surface des plaquettes activées et est capable de capter des protéines procoagulantes, ce qui résulte une sous-population plaquettaire appelée « *COAT platelets* » ou « *Coated-platelet* »^[404]. De plus, les plaquettes expriment le récepteur de la sérotonine de type 5-HT2A^[405]. Donc, notre hypothèse est que l'augmentation de l'IMF du marquage pourrait être causée par la fixation de sérotonine sécrétée à la surface des plaquettes activées.

Afin d'évaluer cette proportion de sérotonine sur la surface des plaquettes, ce test a été effectué sans perméabilisation à partir de 3 échantillons. Nous avons constaté deux pics sur l'histogramme momoparamétrique de fluorescence liée au marquage de sérotonine sur les plaquettes à l'état basal. La présence de deux pics correspond à deux sous-populations distinctes des plaquettes à l'état basal, une exprimant la sérotonine sur leur surface et l'autre non. A nos connaissances, ce phénomène n'a jamais été rapporté dans la littérature. Il peut correspondre à une vraie présence *in vivo* de sérotonine à la surface plaquettaire, soit une conséquence artéfactuelle en rapport avec la manipulation plaquettaire.

L'effet de l'activation plaquettaire sur l'expression de sérotonine de surface des plaquettes a été étudié en comparant l'IMF des plaquettes activée avec celle des plaquettes à l'état basal (sans perméabilisation), mais aucune différence significative n'a été observée. Ces données nous ont permis de conclure que l'activation plaquettaire n'entraînait pas d'augmentation de la fixation de sérotonine sur la surface des plaquettes. Ainsi, les IMFs élevées ne peuvent pas être expliquées par une fixation augmentée de sérotonine sur la surface. Une autre hypothèse est que l'activation rende les plaquettes (en particulier les granules denses) plus accessibles pour les anticorps. La microscopie confocale devrait être idéale pour vérifier cette hypothèse ainsi que la localisation de fluorescence.

En conclusion, nous avons développé une méthode de cytométrie en flux semi-quantitative pour la détection de sérotonine plaquettaire. Cette méthode peut être facilement appliquée dans la majorité des laboratoires cliniques impliqués dans l'exploration plaquettaire. Cependant, ce test ne peut pas être utilisé pour évaluer la capacité de sécrétion des granules

denses plaquettaires.

ETUDE 5 : DOSAGE DE LA SÉROTONINE PLAQUETTAIRE TOTALE ET SECRÉTÉE PAR HPLC

RESUME

Objectif

L'objectif de ce travail a été de développer un test de dosage de la sérotonine plaquettaire totale et de la sérotonine sécrétée par HPLC, en collaboration avec l'équipe du Laboratoire de Biochimie, pour la confirmation du diagnostic des pathologies des granules denses plaquettaires.

Méthodes

Le lysat plaquettaire et le surnageant de sécrétion des plaquettes activées ont été préparés et utilisés respectivement pour le dosage de la sérotonine plaquettaire totale et de la sérotonine sécrétée. La sérotonine est déterminée de façon quantitative par la HPLC couplée à une détection électrochimique.

Résultats préliminaires

Jusqu'à présent, quatre témoins et quatre patients atteints de pathologie des granules denses plaquettaires ont été inclus dans notre étude. Les valeurs de la sérotonine totale chez les témoins sont comparables à celles rapportées dans la littérature, ainsi que la sérotonine sécrétée. Les résultats de la sérotonine totale et la sérotonine sécrétée, obtenus à partir des patients, sont diminués par rapport aux témoins.

Conclusion

Les résultats présentés sont très préliminaires. Les conditions de technique sont à optimiser. Nous évaluerons les performances de ce test pour un plus grand nombre de témoins et de patients.

INTRODUCTION

Comme présenté précédemment, la pathologie des granules denses est classée en deux sous-types, la maladie du pool vide delta (δ -SPD) et le déficit de sécrétion. Les méthodes les plus utilisées sont le test d'agrégation plaquettaire et le test de sécrétion d'ATP. Cependant, ces tests ne sont ni sensibles ni spécifiques pour le diagnostic de la pathologie des granules denses plaquettaires. De plus, les deux tests ne permettent pas différencier les deux sous-types. Ainsi le diagnostic de cette pathologie nécessite une confirmation par une technique plus performante^[67, 123].

La sérotonine, un composant majeur des granules denses plaquettaires, est un marqueur biologique spécifique utilisé dans le diagnostic de la pathologie des granules denses. La technique HPLC, couplée à une détection électrochimique^[185, 400, 406] ou fluorescente^[407-409], a été utilisée pour le dosage de la sérotonine dans le sérum, dans les plaquettes et la quantité de sérotonine sécrétée dans le surnageant après stimulation plaquettaire^[399, 401, 410]. Etant donné que l'HPLC présente une bonne spécificité, sensibilité et précision, elle est considérée actuellement comme le test de référence pour le diagnostic de la pathologie des granules denses plaquettaires et elle permet de distinguer les sous-types^[411].

Par conséquent, l'objectif de ce travail est de développer et d'implanter au CHRU de Nancy, un test de dosage de la sérotonine plaquettaire par HPLC, à l'état basal et après stimulation plaquettaire, afin de disposer d'un test de confirmation pour le diagnostic de la pathologie des granules denses plaquettaires.

MATERIELS ET METHODES

Donneurs sains

Les prélèvements de donneurs sains volontaires sont obtenus grâce à l'Etablissement Français du Sang de Nancy en accord avec les recommandations de la Déclaration d'Helsinki. Les participants ne présentent pas des saignements ni d'autres maladies, et n'ont pas pris de médicaments pouvant interférer avec la fonction plaquettaire ou la coagulation.

Patients

Quatre patients atteints de la pathologie des granules denses (δ -SPD) ont été inclus dans cette étude préliminaire. Le diagnostic de δ -SPD a été établi à l'aide de tests fonctionnels plaquettaires qui

montrent un phénotype d'agrégation plaquettaire anormal (une réponse diminuée au collagène et/ou l'acide arachidonique, une réponse réduite et réversible à l'ADP), une diminution de sécrétion d'ATP (test de sécrétion d'ATP par luminescence), une capture et une sécrétion de la mépacrine toutes diminuées ainsi qu'une diminution de l'expression de CD63 par cytométrie en flux. Pour 3 patients, le diagnostic de FPD/AML (*familial platelet disorder with predisposition to acute myelogenous leukemia*) a été confirmé par une étude génétique moléculaire qui a mis en évidence une mutation *RUNX1*. Un $\alpha\delta$ -SPD est identifié chez un patient atteint du syndrome des plaquettes grise par l'examen morphologique en microscopie optique sur le frottis sanguin coloré au MGG associé à une étude en IF (collaboration avec Dr Arnaud Dupuis, unité de recherche INSERM949), et par son histoire clinique (prise de médicament de type inhibiteur sélectif de la recapture de la sérotonine, Sertraline®) ainsi que les tests fonctionnels plaquettaires.

Prélèvements

Les prélèvements de sang veineux périphérique ont été recueillis dans des tubes contenant 3.2% de citrate de sodium (Vacutainer 0.105 M, Becton Dickinson, Le Pont de Claix, France) avec des précautions pour minimiser l'activation plaquettaire. Le délai entre le prélèvement et la prise en charge technique est limité à quelques minutes.

Préparation du plasma riche en plaquettes (PRP) et du plasma pauvre en plaquette (PPP)

Une centrifugation a été effectuée à la vitesse de 150 g pendant 12 minutes à température ambiante. Le surnageant (plasma riche en plaquettes, PRP) a été récupéré à l'aide d'une pipette et transféré dans un tube à hémolyse. Ensuite, le même tube de prélèvement a subi une deuxième centrifugation (2500 g, 15 min, température ambiante) pour obtenir du PPP. Un comptage de plaquettes est réalisé pour chaque échantillon PRP à l'aide de l'hématimètre Sysmex XN (Sysmex), puis la concentration plaquettaire a été ajustée à $300 \times 10^9/L$ par ajout du PPP autologue si elle était supérieure à $300 \times 10^9/L$.

Préparation de lysat plaquettaire

Cinq-cents microlitres de PRP ajusté a été centrifugé à une vitesse de 6000 tours/min pendant 15 minutes à température ambiante. Le culot plaquettaire est resuspendu dans 0,5 mL d'eau extrapure et a été congelé à $-20^\circ C$. Le prélèvement a été décongelé pour obtenir le lysat plaquettaire avant l'analyse

par HPLC.

Préparation de surnageant de sécrétion des plaquettes

Afin d'évaluer la sécrétion plaquettaire, le PRP a été incubé en présence de 10 µg/mL de collagène (Nycomed, Paris, France) pendant 15 minutes à 37 degrés sous agitation (1100 tours/minute) dans un agrégomètre (Soderel Medical). Après une concentration à une vitesse de 6000 tours/min pendant 15 minutes à température ambiante, le surnageant a été récupéré et congelé à -20°C.

Détermination quantitative de la sérotonine plaquettaire et sécrétée par les plaquettes activées par HPLC

Le dosage a été réalisé par HPLC couplée à une détection électrochimique en utilisant une trousse commerciale (Kit chromsystems 3030, Chromsystems Instruments & Chemicals GmbH, Gräfelfing, Allemagne) au Laboratoire de Biochimie (Hôpital Brabois, CHRU Nancy). Le système est constitué d'un injecteur (Injecteur Hitachi Autosampler L 2200), d'une pompe (LC 20 AD Shimadzu), d'une colonne (Chromsystems 3130) et d'un détecteur (Electrochemical detector Chromsystems CLC 100). Les échantillons ont été préparés selon les instructions du fournisseur commercial. Quarante microlitres d'échantillons est injecté dans le colonne HPLC (Chromsystems 3130) et puis ont été soumis à une élution par la phase mobile (Chromsystems 3131) à un débit de 1.0 mL/min. Les courbes de calibration sont générées en utilisant une gamme de dilution de l'étalon de calibration (Chromsystems 3033). Les résultats ont été normalisés au nombre des plaquettes.

RESULTATS

Faisabilité du dosage de la sérotonine plaquettaire totale et de la sérotonine sécrétée par HPLC

Comme illustré dans le chromatogramme (Figure 22), deux pics sont détectés et identifiés comme la sérotonine et l'étalon interne. La sérotonine a un temps de retention d'environ 4,28 minutes, l'étalon interne de 5,35 minutes. Les chromatogrammes d'un échantillon PPP, d'un échantion de lysat plaquettaire et d'un échantillon de sécrétion plaquettaire d'un témoin sont représentés dans la Figure 21. La capacité de sécrétion plaquettaire est évaluée par le pourcentage de la sérotonine sécrétée par rapport à la sérotonine plaquettaire totale.

Les résultats à partir de quatre témoins sont résumés dans le Tableau XXIII. En normalisation au nombre des plaquettes, les valeurs sont très proches, sauf le témoin T3 dont un problème technique ne peut pas être

éliminé car ce test n'a pas pu être répété chez le témoin pour le confirmer.

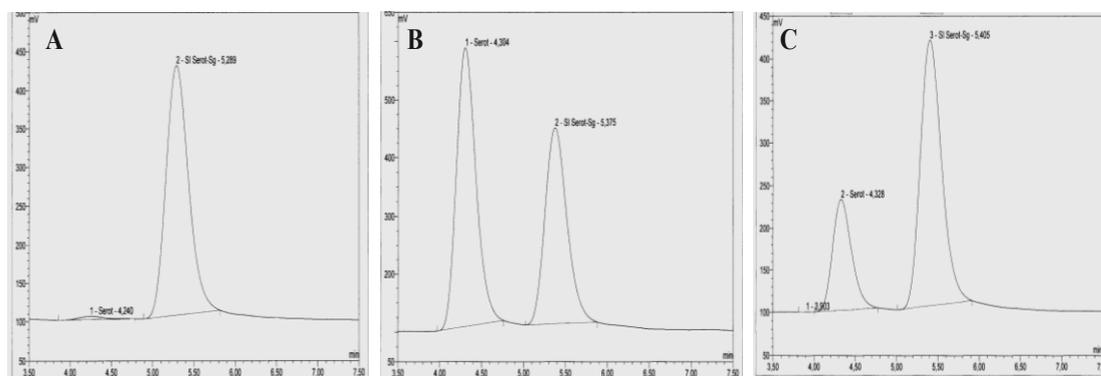


Figure 22. Chromatogrammes de PPP (A), de lysat plaquettaire (B) et de surnageant de sécrétion plaquettaire après stimulation par le collagène (C) chez un témoin. Pic à gauche : la sérotonine ; pic à droite : l'étalon interne.

Tableau XXIII. Dosage de la sérotonine plaquettaire totale et sécrétée après stimulation plaquettaire chez quatre témoins par HPLC.

Témoins	Sérotonine totale (ng/10 ⁹ platelets)	Sérotonine sécrétée (ng/10 ⁹ platelets)	% sécrétion
T1	927.67	356.67	38.45%
T2	942.33	306.67	32.54%
T3	370.33	66.67	18.00%
T4	851.30	620.29	72.86%

Dosage de la sérotonine plaquettaire totale et sécrétée chez patients atteints de δ -SPD

Nous avons également réalisé ce test chez quatre patients atteints de la pathologie des granules denses plaquettaires de type δ -SPD. Les résultats montrent que la sérotonine totale et sécrétée sont diminuées par rapport aux valeurs des témoins excepté le témoin T3, mais il ne semble pas exister de grande différence sur le pourcentages de sécrétion entre les témoins et les patients (Tableau XXIV).

Tableau XXIV. Dosage de la sérotonine plaquettaire totale et sécrétée chez patients atteints de δ -SPD

Patients	Sérotonine totale (ng/10 ⁹ platelets)	Sérotonine sécrétée (ng/10 ⁹ platelets)	% sécrétion
P1 (FPD/AML)	330.00	118.75	35.98
P2 (FPD/AML)	682.76	183.91	26.94
P3 (FPD/AML)	406.64	146.92	36.13
P4 ($\alpha\delta$ -SPD)	48.35	43.96	90.91

DISCUSSION

L'objectif de ce travail a été de développer, en collaboration avec l'équipe du Laboratoire de Biochimie, un test de dosage de la sérotonine plaquettaire et de la sérotonine sécrétée pour le diagnostic de la pathologie des granules denses plaquettaire. Nous présentons ici les résultats très préliminaires.

Sur le chromatogramme ont été détecté deux pics, la sérotonine et l'étalon interne (Figure 21). Il a été rapporté que plusieurs métabolites de la sérotonine tels que N-méthylsérotonine (NMS), 5-hydroxytryptophol (5-HTOL) et 5-hydroxyindole-acetic acid (5-HIAA) et son précurseur 5-hydroxytryptophan (5HTP) sont mis en évidence et quantifiés par HPLC^[412]. Bien que la quantité de ces indolamines soit beaucoup moins importante que la sérotonine, leur interférence potentielle avec la sérotonine dans notre test reste à évaluer.

Jusqu'à présent, ce test a été réalisé seulement pour 4 témoins et 4 patients atteints de δ -SPD (constitutionnel ou acquis). Les valeurs de la sérotonine totale trouvée pour les témoins sont comparables à celles rapportées dans la littérature^[412, 402], ainsi que la sérotonine sécrétée^[413]. Les résultats de la sérotonine totale et de la sérotonine sécrétée, obtenus à partir des patients, sont diminués par rapport aux témoins (excepté le témoin 3), alors que les pourcentages de sécrétion semblent similaires entre les deux groupes. Les résultats trouvés pour les patients atteints de FPD/AML sont cohérents avec ceux trouvés par les tests cytométriques (mépacrine et CD63) qui montrent un défaut de contenu des granules denses.

En conclusion, les résultats présentés ici sont très préliminaires. Les conditions de technique sont à optimiser, par exemple, il est envisagé de faire une gamme de concentrations de collagène ou de tester d'autres agonistes puissants tels que le TRAP pour une meilleure activation des plaquettes. Nous évaluerons les

performances de ce test (CV inter-individuelle et intra-individuelle, etc) pour un plus grand nombre de témoins et de patients.

CONCLUSION GENERALE

La pathologie des granules denses plaquettaires est une des thrombopathies les plus fréquentes. Cette entité est très hétérogène, pouvant être acquise ou constitutionnelle. Elle peut être classée en deux sous-types : le déficit du contenu des granules denses dont la forme majeure est le syndrome de sac vide, et le déficit de sécrétion ou déficit de l'exocytose. Les tests fonctionnels plaquettaires les plus utilisés pour le diagnostic sont le test d'agrégation plaquettaire et le test de sécrétion d'ATP à la luciférine-luciférase. Toutefois, des études ont montré que le test d'agrégation plaquettaire n'est ni sensible ni spécifique. D'ailleurs, ces deux tests nécessitent une grande quantité de sang et non réalisables en cas de thrombopénie importantes. De plus, ils ne permettent pas de différencier les sous-types de la pathologies des granules denses. La confirmation du diagnostic par des tests plus spécifiques est souvent nécessaire. Or, ces tests spécifiques sont rarement disponibles dans la majorité des laboratoires cliniques, ou présentent un délai majeur de réponse ce qui est inadapté pour la prise en charge des patients hémorragiques.

La cytométrie en flux est une technique relativement simple et rapide. Des avantages sont évidents : nécessité de faible volume d'échantillon, réalisable dans tous les cas voire en cas de thrombopénie importantes, une puissance statistique excellente du fait d'un grand nombre de cellules analysées. De nos jours, la cytométrie en flux est largement disponible dans les laboratoires d'hématologie. Elle représente un outil important dans l'exploration biologique des plaquettes, pour laquelle de nombreuses applications ont été développées, y compris la détection des anomalies des granules denses.

Ainsi, l'objectif de ce travail de thèse a été d'optimiser le diagnostic de la pathologie des granules denses plaquettaires, surtout par développement des méthodes par cytométrie en flux.

Tout d'abord, nous avons évalué l'apport de la combinaison du test à la mépacrine et de la mesure de l'expression de CD63 dans la détection des anomalies des granules denses. Cette combinaison permet d'améliorer le diagnostic de la pathologie des granules denses plaquettaires, en particulier en cas de thrombopénie et/ou de faible quantité de sang, ce qui représente un avantage important par rapport au test d'agrégation plaquettaire et au test de sécrétion d'ATP. Par ailleurs, cette combinaison permet de distinguer les sous-types de cette pathologies. Pendant cette étude, nous avons identifié deux patients

atteints de scorbut (maladie due à une carence en vitamine C) associé à une pathologie des granules denses qui est mise en évidence par ces tests fonctionnels plaquettaires. Une discussion sur la relation potentielle entre la carence en vitamine C et la pathologie des granules denses a été abordée. En effet, la vitamine C joue un rôle essentiel dans la biosynthèse de l'ATP et de la sérotonine, deux composants majeurs des granules denses plaquettaires. Par conséquent, il est probable que la carence en vitamine C entraînerait une diminution de l'ATP et de la sérotonine des granules denses plaquettaires, contribuant à la diathèse hémorragique dans le scorbut. Ensuite nous présentons nos efforts sur le développement d'un test de détection de la sérotonine intraplaquettaire par cytométrie en flux. Cette méthode consiste en une fixation par paraformaldéhyde, une perméabilisation par Triton X-100, un immunomarquage par un anticorps anti-sérotonine et un anticorps secondaire fluorescent et enfin une analyse par cytométrie en flux. Les résultats sont exprimés en ratio d'IMF du tube test sur le tube contrôle. Nos résultats montrent que cette méthodologie par cytométrie en flux permet de détecter de façon semi-quantitatif la sérotonine intraplaquettaire à l'état basal. Cependant, elle ne permet pas d'évaluer la capacité de sécrétion des granules denses plaquettaires.

Il faut noter que ces tests par cytométrie en flux présentent également des inconvénients. Ces tests sont considérés comme des méthodes indirectes et apportent des résultats semi-quantitatifs. Ils présentent notamment une difficulté de standardisation étant donné que de nombreux facteurs peuvent influencer les résultats. Ainsi, notre réflexion s'est portée vers une technique plus sensible et plus spécifique, l'HPLC, qui permet une quantification absolue des constituants des granules denses comme la sérotonine. Nos résultats sur le dosage de la sérotonine plaquettaire totale et sécrétée par HPLC sont très préliminaires mais prometteurs, ce qui lui confère un statut de méthode de référence possible. En outre, étant donné que le déficit de la sérotonine et celui de l'ATP/ADP peuvent se dissocier, la mise en place d'un test de dosage de l'ATP/ADP est à envisager.

Jusqu'à présent, il n'existe pas de consensus international pour l'exploration des granules denses. Ici, nous proposons une stratégie diagnostique de la pathologie des granules denses plaquettaires, comme illustré dans la Figure 23. Pour tout patient présentant un syndrome hémorragique, on fait d'abord un interrogatoire complet et un examen clinique, qui permettent une orientation diagnostique, d'éliminer des étiologies acquises ou d'avoir une notion de maladie héréditaire. Ensuite, on fait une exploration primaire : une numération sanguine et un frottis sanguin, mais également les tests de coagulations et les tests du facteur von Willebrand pour éliminer une anomalie de la coagulation ou la maladie de von

Willebrand. Puis, pour les patients suspects d'une thrombopathie, le test d'agrégation et le test de sécrétion d'ATP sont réalisés. En fonction des résultats, une pathologie des granules denses peut être évoquée. A cette étape-là, on peut faire appel à des tests spécifiques considérés actuellement comme tests de référence : la microscopie électronique, le test de sécrétion de sérotonine radiomarkée ou l'étude de biologie moléculaire. Toutefois, ces tests sont rarement disponibles dans la majorité des laboratoires, et chaque test présente des inconvénients. Par exemple, la microscopie électronique donne des résultats non quantitatifs ou semi-quantitatifs ; le test de sécrétion de sérotonine radiomarkée est radioactif, et il ne mesure que la sécrétion mais pas la teneur de sérotonine ; l'étude de biologie moléculaire n'est réalisable que dans certaines formes particulières avec une mutation génétique connue. Ainsi, nous proposons des tests par cytométrie en flux, qui peuvent être implantés dans les laboratoires équipés d'un cytomètre pour améliorer la détection des anomalies des granules denses. Pour les centres plus spécialisés, les tests de dosage des constituants des granules denses par HPLC sont plus conseillés car ils sont plus sensibles et plus spécifiques pouvant utilisés comme tests de référence, mais une expertise sur cette technique est nécessaire.

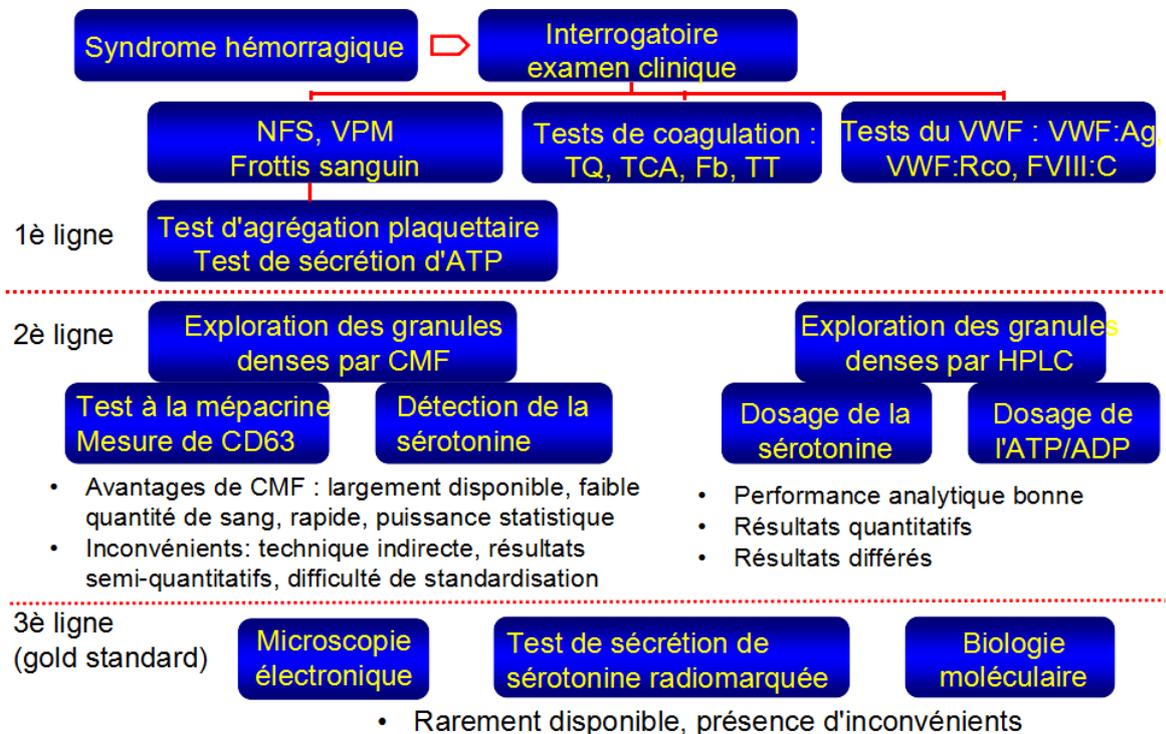


Figure 23. Stratégie d'exploration des granules denses plaquettares.

Durant cette période de thèse de 4 ans, j'ai été accueillie dans plusieurs laboratoires du CHRU de Nancy, à savoir, la plate-forme de Cytométrie en Flux (coordonnée par Dr Véronique Latger-Cannard), le laboratoire d'Immunologie (coordonné par Pr Marcelo De Carvalho), la plate-forme Nancytomique (coordonnée par Pr Gilbert Faure), le service d'hématologie biologique (coordonné par Mr Jean Devignes) et le laboratoire de Biochimie (coordonné par Pr Jean-Louis Guéant). J'ai pu me former à de très nombreuses techniques disponibles dans ces services comme la cytométrie en flux (FC500 et Navios équipés du logiciel CXP, Canto II équipé du logiciel FACSDiva, logiciels d'analyse comme Kaluza et Infinicyt), ELISA, la microscopie à fluorescence, HPLC, CellSearch et Amnis. A travers des projets de recherches comme « Décroissance des blastes dans les leucémies aiguës », « Phénotypage des plasmocytes myélomateux et exploration de l'hypercoagulabilité chez les patients atteints de myélome multiple » et puis les études sur les pathologies plaquettaires qui sont présentées dans la thèse, à travers de la formation en cytologie sanguine et médullaire au service d'Hématologie biologique, à travers des réunions et cours dans le service d'Hématologie clinique, j'ai pu approfondir mes connaissances sur les pathologies hématologiques. Je me suis surtout investie dans l'exploration des pathologies plaquettaires : ce travail s'inscrit dans le cadre de la collaboration Nancy/Wuhan en terme de transfert de connaissances, de progression dans l'exploration biologique et d'optimisation de la prise en charge dans le domaine des pathologies plaquettaires.

AUTRES PUBLICATIONS PENDANT LA THESE

1. Massin F, **Cai H**, Decot V, Stoltz JF, Bensoussan D, Latger-Cannard V. Validation of a single-platform method for hematopoietic CD34+ stem cells enumeration according to accreditation procedure. *Biomed Mater Eng.* 2015. 25(1 Suppl): 27-39.
2. Tu Q, Bittencourt MC, **Cai H**, *et al.* Case Report: Detection and quantification of tumor cells in peripheral blood and ascitic fluid from a metastatic esophageal cancer patient using the CellSearch ((R)) technology. *F1000Res.* 2014. 3: 12.
3. Le Rhun E, Tu Q, De Carvalho Bittencourt M, Farre I, Mortier L, **Cai H**, Kohler C, Faure GC. Detection and quantification of CSF malignant cells by the CellSearch technology in patients with melanoma leptomeningeal metastasis. *Med Oncol.* 2013. 30(2): 538.
4. Wang Y, Qian C, **Cai H**, Laroye C, De Carvalho M, Clement L, Stoltz J, Decot V, Bensoussan D. Virus-specific T cells in human peripheral blood and after IFNg immunomagnetic selection: identification of naive and memory subsets. En cours de publication.

Communication

1. Phénotypage plasmocytaire multiparamétrique et angiogenèse dans le myélome : intérêt des cellules endothéliales circulantes. Huili CAI, Julien PERRIN, Cyrille HULIN, Gilbert Charles FAURE, Marcelo DE CARVALHO BITTENCOURT, V éronique LATGER-CANNARD. 9^{ème} Journée de recherches biomédicale. 2014 Mar 21 ; Nancy. Numéro de résumé C4.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] Harrison P. Platelet function analysis. *Blood Rev.* 2005. 19(2): 111-23.
- [2] Picker SM. In-vitro assessment of platelet function. *Transfus Apher Sci.* 2011. 44(3): 305-19.
- [3] Graham SS, Traub B, Mink IB. Automated platelet-sizing parameters on a normal population. *Am J Clin Pathol.* 1987. 87(3): 365-9.
- [4] Stevens RF, Alexander MK. A sex difference in the platelet count. *Br J Haematol.* 1977. 37(2): 295-300.
- [5] Butkiewicz AM, Kemoni H, Dymicka-Piekarska V, Matowicka-Karna J, Radziwon P, Lipska A. Platelet count, mean platelet volume and thrombocytopoietic indices in healthy women and men. *Thromb Res.* 2006. 118(2): 199-204.
- [6] Biino G, Balduini CL, Casula L, et al. Analysis of 12,517 inhabitants of a Sardinian geographic isolate reveals that predispositions to thrombocytopenia and thrombocytosis are inherited traits. *Haematologica.* 2011. 96(1): 96-101.
- [7] Santimone I, Di CA, De Curtis A, et al. White blood cell count, sex and age are major determinants of heterogeneity of platelet indices in an adult general population: results from the MOLLI-SANI project. *Haematologica.* 2011. 96(8): 1180-8.
- [8] Bain BJ. Ethnic and sex differences in the total and differential white cell count and platelet count. *J Clin Pathol.* 1996. 49(8): 664-6.
- [9] Segal JB, Moliterno AR. Platelet counts differ by sex, ethnicity, and age in the United States. *Ann Epidemiol.* 2006. 16(2): 123-30.
- [10] Biino G, Gasparini P, D'Adamo P, et al. Influence of age, sex and ethnicity on platelet count in five Italian geographic isolates: mild thrombocytopenia may be physiological. *Br J Haematol.* 2012. 157(3): 384-7.
- [11] Cong YL, Jin DM, Wang HL, et al. Investigating Chinese platelet parameter in vein blood. *Chin J Lab Med.* 2004. 27(06): 368-370.
- [12] Lin JH, Xu GH, Ke LJ. Valeurs de référence et utilité clinique des paramètres plaquettaires. *Chongqing Med.* 2006. 35(23): 2164-2165.
- [13] Biino G, Santimone I, Minelli C, et al. Age- and sex-related variations in platelet count in Italy: a proposal of reference ranges based on 40987 subjects' data. *PLoS One.* 2013. 8(1): e54289.
- [14] Maes M, Scharpe S, Cooreman W, et al. Components of biological, including seasonal, variation in hematological measurements and plasma fibrinogen concentrations in normal humans. *Experientia.* 1995. 51(2): 141-9.
- [15] Buckley MF, James JW, Brown DE, et al. A novel approach to the assessment of variations in the human platelet count. *Thromb Haemost.* 2000. 83(3): 480-4.
- [16] George JN. Platelets. *Lancet.* 2000. 355(9214): 1531-9.
- [17] Patel SR, Hartwig JH, Italiano JE Jr. The biogenesis of platelets from megakaryocyte proplatelets. *J Clin Invest.* 2005. 115(12): 3348-54.
- [18] Drachman JG. Inherited thrombocytopenia: when a low platelet count does not mean ITP. *Blood.* 2004. 103(2): 390-8.
- [19] Shivdasani RA. Molecular and transcriptional regulation of megakaryocyte differentiation. *Stem Cells.* 2001. 19(5): 397-407.
- [20] Vainchenker W, Debili N, Mouthon MA, Wendling F. Megakaryocytopoiesis: cellular aspects and regulation. *Crit Rev Oncol Hematol.* 1995. 20(1-2): 165-92.
- [21] Jobin F. L'hémostase. 1995. Québec. Presses Université Laval.
- [22] Long MW. Megakaryocyte differentiation events. *Semin Hematol.* 1998. 35(3): 192-9.
- [23] Chen Z, Naveiras O, Balduini A, et al. The May-Hegglin anomaly gene MYH9 is a negative regulator of platelet biogenesis modulated by the Rho-ROCK pathway. *Blood.* 2007. 110(1): 171-9.
- [24] Bender M, Eckly A, Hartwig JH, et al. ADF/n-cofilin-dependent actin turnover determines platelet formation and sizing. *Blood.* 2010. 116(10): 1767-75.

- [25] Zhang Y, Conti MA, Malide D, et al. Mouse models of MYH9-related disease: mutations in nonmuscle myosin II-A. *Blood*. 2012. 119(1): 238-50.
- [26] Italiano JE Jr, Bergmeier W, Tiwari S, et al. Mechanisms and implications of platelet discoid shape. *Blood*. 2003. 101(12): 4789-96.
- [27] M Jandrot-Perrus PN. Des fonctions plaquettaires aux implications thérapeutiques. *Rev Med Interne*. 2010 .
- [28] Kaushansky K. The molecular mechanisms that control thrombopoiesis. *J Clin Invest*. 2005. 115(12): 3339-47.
- [29] Deutsch VR, Tomer A. Megakaryocyte development and platelet production. *Br J Haematol*. 2006. 134(5): 453-66.
- [30] Kelemen E, Cserhati I, Tanos B. Demonstration and some properties of human thrombopoietin in thrombocythaemic sera. *Acta Haematol*. 1958. 20(6): 350-5.
- [31] Jelkmann W. The role of the liver in the production of thrombopoietin compared with erythropoietin. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2001. 13(7): 791-801.
- [32] Nagata Y, Shozaki Y, Nagahisa H, Nagasawa T, Abe T, Todokoro K. Serum thrombopoietin level is not regulated by transcription but by the total counts of both megakaryocytes and platelets during thrombocytopenia and thrombocytosis. *Thromb Haemost*. 1997. 77(5): 808-14.
- [33] Shinjo K, Takeshita A, Nakamura S, et al. Serum thrombopoietin levels in patients correlate inversely with platelet counts during chemotherapy-induced thrombocytopenia. *Leukemia*. 1998. 12(3): 295-300.
- [34] Qian H, Buza-Vidas N, Hyland CD, et al. Critical role of thrombopoietin in maintaining adult quiescent hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell*. 2007. 1(6): 671-84.
- [35] Yoshihara H, Arai F, Hosokawa K, et al. Thrombopoietin/MPL signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence and interaction with the osteoblastic niche. *Cell Stem Cell*. 2007. 1(6): 685-97.
- [36] Alexander WS, Roberts AW, Nicola NA, Li R, Metcalf D. Deficiencies in progenitor cells of multiple hematopoietic lineages and defective megakaryocytopoiesis in mice lacking the thrombopoietic receptor c-Mpl. *Blood*. 1996. 87(6): 2162-70.
- [37] Kimura S, Roberts AW, Metcalf D, Alexander WS. Hematopoietic stem cell deficiencies in mice lacking c-Mpl, the receptor for thrombopoietin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998. 95(3): 1195-200.
- [38] Ballmaier M, Germeshausen M, Krukemeier S, Welte K. Thrombopoietin is essential for the maintenance of normal hematopoiesis in humans: development of aplastic anemia in patients with congenital amegakaryocytic thrombocytopenia. *Ann N Y Acad Sci*. 2003. 996: 17-25.
- [39] Balduini CL, Pecci A, Savoia A. Recent advances in the understanding and management of MYH9-related inherited thrombocytopenias. *Br J Haematol*. 2011. 154(2): 161-74.
- [40] Nurden P, Nurden AT. Congenital disorders associated with platelet dysfunctions. *Thromb Haemost*. 2008. 99(2): 253-63.
- [41] Kim YK, Lee SS, Jeong SH, et al. Efficacy and safety of eltrombopag in adult refractory immune thrombocytopenia. *Blood Res*. 2015. 50(1): 19-25.
- [42] Tijssen MR, Cvejic A, Joshi A, et al. Genome-wide analysis of simultaneous GATA1/2, RUNX1, FLI1, and SCL binding in megakaryocytes identifies hematopoietic regulators. *Dev Cell*. 2011. 20(5): 597-609.
- [43] Cantor AB. GATA transcription factors in hematologic disease. *Int J Hematol*. 2005. 81(5): 378-84.
- [44] Chagraoui H, Kassouf M, Banerjee S, et al. SCL-mediated regulation of the cell-cycle regulator p21 is critical for murine megakaryopoiesis. *Blood*. 2011. 118(3): 723-35.
- [45] Hart A, Melet F, Grossfeld P, et al. Fli-1 is required for murine vascular and megakaryocytic development and is hemizygotously deleted in patients with thrombocytopenia. *Immunity*. 2000. 13(2): 167-77.
- [46] Huang H, Yu M, Akie TE, et al. Differentiation-dependent interactions between RUNX-1 and FLI-1 during megakaryocyte development. *Mol Cell Biol*. 2009. 29(15): 4103-15.
- [47] Kruse EA, Loughran SJ, Baldwin TM, et al. Dual requirement for the ETS transcription factors Fli-1 and Erg in hematopoietic stem cells and the megakaryocyte lineage. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009. 106(33): 13814-9.

- [48] Pencovich N, Jaschek R, Tanay A, Groner Y. Dynamic combinatorial interactions of RUNX1 and cooperating partners regulates megakaryocytic differentiation in cell line models. *Blood*. 2011. 117(1): e1-14.
- [49] McNicol A, Israels SJ. Platelet dense granules: structure, function and implications for haemostasis. *Thromb Res*. 1999. 95(1): 1-18.
- [50] Thon JN, Italiano JE. Platelets: production, morphology and ultrastructure. *Handb Exp Pharmacol*. 2012. (210): 3-22.
- [51] David T. Cartographie fonctionnelle des domaines intracellulaires du complexe plaquettaire GPIb-V-IX et identification d'un nouveau partenaire cytoplasmique. 2006 .
- [52] Bevers EM, Comfurius P, Zwaal RF. Changes in membrane phospholipid distribution during platelet activation. *Biochim Biophys Acta*. 1983. 736(1): 57-66.
- [53] Skeaff CM, Holub BJ. Altered phospholipid composition of plasma membranes from thrombin-stimulated human platelets. *Biochim Biophys Acta*. 1985. 834(2): 164-71.
- [54] Heemskerk JW, Bevers EM, Lindhout T. Platelet activation and blood coagulation. *Thromb Haemost*. 2002. 88(2): 186-93.
- [55] Suzuki J, Umeda M, Sims PJ, Nagata S. Calcium-dependent phospholipid scrambling by TMEM16F. *Nature*. 2010. 468(7325): 834-8.
- [56] Bevers EM, Comfurius P, Zwaal RF. Platelet procoagulant activity: physiological significance and mechanisms of exposure. *Blood Rev*. 1991. 5(3): 146-54.
- [57] Bodin S, Tronchere H, Payrastre B. Lipid rafts are critical membrane domains in blood platelet activation processes. *Biochim Biophys Acta*. 2003. 1610(2): 247-57.
- [58] Rivera J, Lozano ML, Navarro-Nunez L, Vicente V. Platelet receptors and signaling in the dynamics of thrombus formation. *Haematologica*. 2009. 94(5): 700-11.
- [59] Clemetson KJ CJM. Platelet receptors. In: Michelson AD ed. *Platelets*. 2007. San Diego, CA. Elsevier/Academic Press. 117-143.
- [60] Shattil SJ, Kashiwagi H, Pampori N. Integrin signaling: the platelet paradigm. *Blood*. 1998. 91(8): 2645-57.
- [61] Lopez JA, Andrews RK, Afshar-Kharghan V, Berndt MC. Bernard-Soulier syndrome. *Blood*. 1998. 91(12): 4397-418.
- [62] Andrews RK, Gardiner EE, Shen Y, Whisstock JC, Berndt MC. Glycoprotein Ib-IX-V. *Int J Biochem Cell Biol*. 2003. 35(8): 1170-4.
- [63] R Celikel RAM, Roberts JR. Modulation of α -thrombin function by distinct interactions with platelet glycoprotein Iba. *Science*. 2003 .
- [64] Lanza F. Bernard-Soulier syndrome (hemorrhagic paroxysmal thrombocytopenic purpura). *Orphanet J Rare Dis*. 2006. 1: 46.
- [65] Du X, Ginsberg MH. Integrin α IIb β 3 and platelet function. *Thromb Haemost*. 1997. 78(1): 96-100.
- [66] B Boneu JPC. Introduction à l'étude de l'hémostase et de la thrombose. 1997. 2ed. Reims. Boehringer Ingelheim.
- [67] Podda G, Femia EA, Pugliano M, Cattaneo M. Congenital defects of platelet function. *Platelets*. 2012. 23(7): 552-63.
- [68] Nieswandt B, Watson SP. Platelet-collagen interaction: is GPVI the central receptor. *Blood*. 2003. 102(2): 449-61.
- [69] Smethurst PA, Joutsu-Korhonen L, O'Connor MN, et al. Identification of the primary collagen-binding surface on human glycoprotein VI by site-directed mutagenesis and by a blocking phage antibody. *Blood*. 2004. 103(3): 903-11.
- [70] Schmitz G, Rothe G, Ruf A, et al. European Working Group on Clinical Cell Analysis: Consensus protocol for the flow cytometric characterisation of platelet function. *Thromb Haemost*. 1998. 79(5): 885-96.
- [71] Martin V, Bredoux R, Corvazier E, Papp B, Enouf J. Platelet Ca(2+)ATPases : a plural, species-specific, and multiple hypertension-regulated expression system. *Hypertension*. 2000. 35(1 Pt 1): 91-102.
- [72] Fox JE. Linkage of a membrane skeleton to integral membrane glycoproteins in human platelets. Identification of one of the glycoproteins as glycoprotein Ib. *J Clin Invest*. 1985. 76(4): 1673-83.
- [73] Hartwig JH. The platelet: form and function. *Semin Hematol*. 2006. 43(1 Suppl 1): S94-100.
- [74] Harrison P, Savidge GF, Cramer EM. The origin and physiological relevance of alpha-granule adhesive proteins. *Br J Haematol*. 1990. 74(2): 125-30.

- [75] Sixma JJ, Slot JW, Geuze HJ. Immunocytochemical localization of platelet granule proteins. *Methods Enzymol.* 1989. 169: 301-11.
- [76] Sandrock K, Zieger B. Current Strategies in Diagnosis of Inherited Storage Pool Defects. *Transfus Med Hemother.* 2010. 37(5): 248-258.
- [77] Reed GL. Chapter 15-Platelet secretion. In:Michelson A ed. *Platelets.* 2007. Elsevier Science. 309-318.
- [78] Gunay-Aygun M, Huizing M, Gahl WA. Molecular defects that affect platelet dense granules. *Semin Thromb Hemost.* 2004. 30(5): 537-47.
- [79] Cardigan R, Turner C, Harrison P. Current methods of assessing platelet function: relevance to transfusion medicine. *Vox Sang.* 2005. 88(3): 153-63.
- [80] Rendu F, Brohard-Bohn B. The platelet release reaction: granules' constituents, secretion and functions. *Platelets.* 2001. 12(5): 261-73.
- [81] Di MM, Thys C, Waelkens E, et al. An integrated proteomics and genomics analysis to unravel a heterogeneous platelet secretion defect. *J Proteomics.* 2011. 74(6): 902-13.
- [82] Rao AK, Jalagadugula G, Sun L. Inherited defects in platelet signaling mechanisms. *Semin Thromb Hemost.* 2004. 30(5): 525-35.
- [83] Sixma JJ. Interaction of blood platelets with the vessel wall. In:AL Bloom CDF, DP Thomas ET eds. *Haemostasis and thrombosis.* 1994. Edinburgh. Churchill Livingstone. p 259.
- [84] Andrews RK, Shen Y, Gardiner EE, Dong JF, Lopez JA, Berndt MC. The glycoprotein Ib-IX-V complex in platelet adhesion and signaling. *Thromb Haemost.* 1999. 82(2): 357-64.
- [85] Ruggeri ZM. Structure and function of von Willebrand factor. *Thromb Haemost.* 1999. 82(2): 576-84.
- [86] Goto S, Ikeda Y, Saldivar E, Ruggeri ZM. Distinct mechanisms of platelet aggregation as a consequence of different shearing flow conditions. *J Clin Invest.* 1998. 101(2): 479-86.
- [87] Savage B, Almus-Jacobs F, Ruggeri ZM. Specific synergy of multiple substrate-receptor interactions in platelet thrombus formation under flow. *Cell.* 1998. 94(5): 657-66.
- [88] Tsuji S, Sugimoto M, Miyata S, Kuwahara M, Kinoshita S, Yoshioka A. Real-time analysis of mural thrombus formation in various platelet aggregation disorders: distinct shear-dependent roles of platelet receptors and adhesive proteins under flow. *Blood.* 1999. 94(3): 968-75.
- [89] Savage B, Ruggeri ZM. Selective recognition of adhesive sites in surface-bound fibrinogen by glycoprotein IIb-IIIa on nonactivated platelets. *J Biol Chem.* 1991. 266(17): 11227-33.
- [90] Santoro SA. Molecular basis of platelet adhesion to collagen. *Prog Clin Biol Res.* 1988. 283:291-314.
- [91] Clemetson KJ. Platelet collagen receptors: a new target for inhibition. *Haemostasis.* 1999. 29(1): 16-26.
- [92] Cattaneo M. Light transmission aggregometry and ATP release for the diagnostic assessment of platelet function. *Semin Thromb Hemost.* 2009. 35(2): 158-67.
- [93] Grant JA, Scrutton MC. Positive interaction between agonists in the aggregation response of human blood platelets: interaction between ADP, adrenaline and vasopressin. *Br J Haematol.* 1980. 44(1): 109-25.
- [94] Steen VM, Holmsen H. Synergism between thrombin and epinephrine in human platelets: different dose-response relationships for aggregation and dense granule secretion. *Thromb Haemost.* 1985. 54(3): 680-3.
- [95] Yang J, Wu J, Kowalska MA, et al. Loss of signaling through the G protein, Gz, results in abnormal platelet activation and altered responses to psychoactive drugs. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000. 97(18): 9984-9.
- [96] Burgoyne RD, Morgan A. Secretory granule exocytosis. *Physiol Rev.* 2003. 83(2): 581-632.
- [97] Flaumenhaft R, Dilks JR, Rozenvayn N, Monahan-Earley RA, Feng D, Dvorak AM. The actin cytoskeleton differentially regulates platelet alpha-granule and dense-granule secretion. *Blood.* 2005. 105(10): 3879-87.
- [98] Sollner T, Whiteheart SW, Brunner M, et al. SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature.* 1993. 362(6418): 318-24.
- [99] Weber T, Zemelman BV, McNew JA, et al. SNAREpins: minimal machinery for membrane fusion. *Cell.* 1998. 92(6):

759-72.

- [100] Haas A. NSF--fusion and beyond. *Trends Cell Biol.* 1998. 8(12): 471-3.
- [101] Hanson PI, Roth R, Morisaki H, Jahn R, Heuser JE. Structure and conformational changes in NSF and its membrane receptor complexes visualized by quick-freeze/deep-etch electron microscopy. *Cell.* 1997. 90(3): 523-35.
- [102] Zerial M, McBride H. Rab proteins as membrane organizers. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001. 2(2): 107-17.
- [103] Ruggeri ZM, Dent JA, Saldivar E. Contribution of distinct adhesive interactions to platelet aggregation in flowing blood. *Blood.* 1999. 94(1): 172-8.
- [104] Law DA, DeGuzman FR, Heiser P, Ministri-Madrid K, Killeen N, Phillips DR. Integrin cytoplasmic tyrosine motif is required for outside-in alphaIIb beta3 signalling and platelet function. *Nature.* 1999. 401(6755): 808-11.
- [105] Schwarz UR, Walter U, Eigenthaler M. Taming platelets with cyclic nucleotides. *Biochem Pharmacol.* 2001. 62(9): 1153-61.
- [106] Cavallini L, Coassin M, Borean A, Alexandre A. Prostacyclin and sodium nitroprusside inhibit the activity of the platelet inositol 1,4,5-trisphosphate receptor and promote its phosphorylation. *J Biol Chem.* 1996. 271(10): 5545-51.
- [107] Rynningen A, Olav JB, Holmsen H. Elevation of cyclic AMP decreases phosphoinositide turnover and inhibits thrombin-induced secretion in human platelets. *Biochim Biophys Acta.* 1998. 1394(2-3): 235-48.
- [108] Barry OP, FitzGerald GA. Mechanisms of cellular activation by platelet microparticles. *Thromb Haemost.* 1999. 82(2): 794-800.
- [109] Smith JA, Henderson AH, Randall MD. Endothelium-derived relaxing factor, prostanoids and endothelins. In: *Haemostasis and Thrombosis.* 3rd edition. AL Bloom, CD Forbes, DP Thomas and E.G.D. Tuddenham (eds). 1994. Edinburgh. Churchill Livingstone. p 183-197.
- [110] Majerus PW. Arachidonate metabolism in vascular disorders. *J Clin Invest.* 1983. 72(5): 1521-5.
- [111] Loscalzo J, Welch G. Nitric oxide and its role in the cardiovascular system. *Prog Cardiovasc Dis.* 1995. 38(2): 87-104.
- [112] Mellion BT, Ignarro LJ, Ohlstein EH, Pontecorvo EG, Hyman AL, Kadowitz PJ. Evidence for the inhibitory role of guanosine 3', 5'-monophosphate in ADP-induced human platelet aggregation in the presence of nitric oxide and related vasodilators. *Blood.* 1981. 57(5): 946-55.
- [113] Walsh PN. Platelet coagulation-protein interactions. *Semin Thromb Hemost.* 2004. 30(4): 461-71.
- [114] Janeway CM, Rivard GE, Tracy PB, Mann KG. Factor V Quebec revisited. *Blood.* 1996. 87(9): 3571-8.
- [115] Mezzano D, Quiroga T, Pereira J. The level of laboratory testing required for diagnosis or exclusion of a platelet function disorder using platelet aggregation and secretion assays. *Semin Thromb Hemost.* 2009. 35(2): 242-54.
- [116] Davi G, Patrono C. Platelet activation and atherothrombosis. *N Engl J Med.* 2007. 357(24): 2482-94.
- [117] Collier BS. Platelets and thrombolytic therapy. *N Engl J Med.* 1990. 322(1): 33-42.
- [118] Antman EM, Giugliano RP, Gibson CM, et al. Abciximab facilitates the rate and extent of thrombolysis: results of the thrombolysis in myocardial infarction (TIMI) 14 trial. The TIMI 14 Investigators. *Circulation.* 1999. 99(21): 2720-32.
- [119] Prandoni P. Links between arterial and venous disease. *J Intern Med.* 2007. 262(3): 341-50.
- [120] Furie B, Furie BC. Mechanisms of thrombus formation. *N Engl J Med.* 2008. 359:938-49.
- [121] Peterson P, Hayes TE, Arkin CF, Bovill EG, Fairweather RB, Rock WA Jr, Triplett DA, Brandt JT. The preoperative bleeding time test lacks clinical benefit: College of American Pathologists' and American Society of Clinical Pathologists' position article. *Arch Surg.* 1998. 133(2): 134-9.
- [122] Marion M, Azam U, McCarthy D, Webb L, Chapman ES, Okrongly D, Zelmanovic D, Newland A. Evaluation of the anticoagulants EDTA and citrate, theophylline, adenosine, and dipyridamole (CTAD) for assessing platelet activation on the ADVIA 120 hematology system. *Clin Chem.* 2002. 48(6): 891-9.
- [123] Harrison P, Mackie I, Mumford A, et al. Guidelines for the laboratory investigation of heritable disorders of platelet function. *Br J Haematol.* 2011. 155(1): 30-44.
- [124] Klouche M. Diagnostic methods for platelet function analysis. *Transfus Med Hemother.* 2007.34:20-32.
- [125] Briggs C, Harrison P, Machin SJ. Continuing developments with the automated platelet count. *Int J Lab Hematol.* 2007.

29(2): 77-91.

- [126] Harrison P, Horton A, Grant D, Briggs C, MacHin S. Immunoplatelet counting: a proposed new reference procedure. *Br J Haematol.* 2000. 108(2): 228-35.
- [127] Salignac S, Latger-Cannard V, Schlegel N, Lecompte TP. Platelet counting. *Methods Mol Biol.* 2013. 992: 193-205.
- [128] Onder O, Weinstein A, Hoyer LW. Pseudothrombocytopenia caused by platelet agglutinins that are reactive in blood anticoagulated with chelating agents. *Blood.* 1980. 56(2): 177-82.
- [129] Hayward CP. Diagnostic evaluation of platelet function disorders. *Blood Rev.* 2011. 25(4): 169-73.
- [130] Hoffmann JJ. Reference range of mean platelet volume. *Thromb Res.* 2012. 129(4): 534-5.
- [131] Latger-Cannard V, Hoarau M, Salignac S, Baumgart D, Nurden P, Lecompte T. Mean platelet volume: comparison of three analysers towards standardization of platelet morphological phenotype. *Int J Lab Hematol.* 2012. 34(3): 300-10.
- [132] O'Malley T, Ludlam CA, Fox KA, Elton RA. Measurement of platelet volume using a variety of different anticoagulant and antiplatelet mixtures. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 1996. 7(4): 431-6.
- [133] Latger-Cannard V, Fenneteau O, Salignac S, Lecompte TP, Schlegel N. Platelet morphology analysis. *Methods Mol Biol.* 2013. 992: 207-25.
- [134] Bolton-Maggs PH, Perry DJ, Chalmers EA, et al. The rare coagulation disorders--review with guidelines for management from the United Kingdom Haemophilia Centre Doctors' Organisation. *Haemophilia.* 2004. 10(5): 593-628.
- [135] Laffan M, Brown SA, Collins PW, et al. The diagnosis of von Willebrand disease: a guideline from the UK Haemophilia Centre Doctors' Organization. *Haemophilia.* 2004. 10(3): 199-217.
- [136] Rodgers RP, Levin J. A critical reappraisal of the bleeding time. *Semin Thromb Hemost.* 1990. 16(1): 1-20.
- [137] de Santé-Service évaluation des actes professionnels HA. *BIOLOGIE DES ANOMALIES DE L'HÉMOSTASE :Haute autorité de santé,2011.*
- [138] Hayward CP, Moffat KA, Raby A, et al. Development of North American consensus guidelines for medical laboratories that perform and interpret platelet function testing using light transmission aggregometry. *Am J Clin Pathol.* 2010. 134(6): 955-63.
- [139] Kundu SK, Heilmann EJ, Sio R, Garcia C, Davidson RM, Ostgaard RA. Description of an in vitro platelet function analyzer--PFA-100. *Semin Thromb Hemost.* 1995. 21 Suppl 2: 106-12.
- [140] Harrison P, Robinson MS, Mackie IJ, et al. Performance of the platelet function analyser PFA-100 in testing abnormalities of primary haemostasis. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 1999. 10(1): 25-31.
- [141] Heilmann EJ, Kundu SK, Sio R, Garcia C, Gomez R, Christie DJ. Comparison of four commercial citrate blood collection systems for platelet function analysis by the PFA-100 system. *Thromb Res.* 1997. 87(1): 159-64.
- [142] Jilma B. Platelet function analyzer (PFA-100): a tool to quantify congenital or acquired platelet dysfunction. *J Lab Clin Med.* 2001. 138(3): 152-63.
- [143] Bolton-Maggs PH, Chalmers EA, Collins PW, et al. A review of inherited platelet disorders with guidelines for their management on behalf of the UKHCDO. *Br J Haematol.* 2006. 135(5): 603-33.
- [144] Favaloro EJ. Clinical utility of the PFA-100. *Semin Thromb Hemost.* 2008. 34(8): 709-33.
- [145] Lippi G, Franchini M, Brocco G, Manzato F. Influence of the ABO blood type on the platelet function analyzer PFA-100. *Thromb Haemost.* 2001. 85(2): 369-70.
- [146] Favaloro EJ. The utility of the PFA-100 in the identification of von Willebrand disease: a concise review. *Semin Thromb Hemost.* 2006. 32(5): 537-45.
- [147] Baumgartner HR, Muggli R, Tschopp TB, Turitto VT. Platelet adhesion, release and aggregation in flowing blood: effects of surface properties and platelet function. *Thromb Haemost.* 1976. 35(1): 124-38.
- [148] Cazenave JP, Packham MA, Guccione MA, Mustard JF. Inhibition of platelet adherence to damaged surface of rabbit aorta. *J Lab Clin Med.* 1975. 86(4): 551-63.
- [149] Cranmer SL, Ulsemer P, Cooke BM, et al. Glycoprotein (GP) Ib-IX-transfected cells roll on a von Willebrand factor matrix under flow. Importance of the GPIb/actin-binding protein (ABP-280) interaction in maintaining adhesion under high

shear. *J Biol Chem*. 1999. 274(10): 6097-106.

[150] Sakariassen KS, Aarts PA, de Groot PG, Houdijk WP, Sixma JJ. A perfusion chamber developed to investigate platelet interaction in flowing blood with human vessel wall cells, their extracellular matrix, and purified components. *J Lab Clin Med*. 1983. 102(4): 522-35.

[151] Jilma-Stohlawetz P, Horvath M, Eichelberger B, Koren D, Jilma B, Panzer S. Platelet function under high-shear conditions from platelet concentrates. *Transfusion*. 2008. 48(1): 129-35.

[152] Savion N, Varon D. Impact--the cone and plate(let) analyzer: testing platelet function and anti-platelet drug response. *Pathophysiol Haemost Thromb*. 2006. 35(1-2): 83-8.

[153] Shenkman B, Savion N, Dardik R, Tamarin I, Varon D. Testing of platelet deposition on polystyrene surface under flow conditions by the cone and plate(let) analyzer: role of platelet activation, fibrinogen and von Willebrand factor. *Thromb Res*. 2000. 99(4): 353-61.

[154] Born GVR. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature*. 1962. 194: 927-9.

[155] O'Brien JR. The adhesiveness of native platelets and its prevention. *J Clin Pathol*. 1961. 14: 140-9.

[156] Cattaneo M, Hayward CP, Moffat KA, Pugliano MT, Liu Y, Michelson AD. Results of a worldwide survey on the assessment of platelet function by light transmission aggregometry: a report from the platelet physiology subcommittee of the SSC of the ISTH. *J Thromb Haemost*. 2009. 7(6): 1029.

[157] Cattaneo M, Cerletti C, Harrison P, et al. Recommendations for the Standardization of Light Transmission Aggregometry: A Consensus of the Working Party from the Platelet Physiology Subcommittee of SSC/ISTH. *J Thromb Haemost*. 2013.[Epub ahead of print].

[158] Bednar B, Condra C, Gould RJ, Connolly TM. Platelet aggregation monitored in a 96 well microplate reader is useful for evaluation of platelet agonists and antagonists. *Thromb Res*. 1995. 77(5): 453-63.

[159] Cardinal DC, Flower RJ. The electronic aggregometer: a novel device for assessing platelet behavior in blood. *J Pharmacol Methods*. 1980. 3(2): 135-58.

[160] De Cuyper IM, Meinders M, van de Vijver E, et al. A novel flow cytometry-based platelet aggregation assay. *Blood*. 2013. 121(10): e70-80.

[161] Toth O, Calatzis A, Penz S, Losonczy H, Siess W. Multiple electrode aggregometry: a new device to measure platelet aggregation in whole blood. *Thromb Haemost*. 2006. 96(6): 781-8.

[162] Hayward CP, Rao AK, Cattaneo M. Congenital platelet disorders: overview of their mechanisms, diagnostic evaluation and treatment. *Haemophilia*. 2006. 12 Suppl 3: 128-36.

[163] Feinman RD, Lubowsky J, Charo I, Zabinski MP. The lumi-aggregometer: a new instrument for simultaneous measurement of secretion and aggregation by platelets. *J Lab Clin Med*. 1977. 90(1): 125-9.

[164] Ingerman CM, Smith JB, Silver MJ. Direct measurement of platelet secretion in whole blood. *Thromb Res*. 1979. 16(3-4): 335-44.

[165] Jung G, Hénon P. Méthode quantitative de mesure de l'ATP plaquettaire libérée in vitro en présence de différents agents agrégants. *Path Biol*. 1984. 32(7):772-8.

[166] Miller JL. Platelet function testing: an improved approach utilizing lumi-aggregation and an interactive computer system. *Am J Clin Pathol*. 1984. 81(4): 471-6.

[167] Higashi T, Isomoto A, Tyuma I, Kakishita E, Uomoto M, Nagai K. Quantitative and continuous analysis of ATP release from blood platelets with firefly luciferase luminescence. *Thromb Haemost*. 1985. 53(1): 65-9.

[168] McGlasson DL, Fritsma GA. Whole blood platelet aggregometry and platelet function testing. *Semin Thromb Hemost*. 2009. 35(2): 168-80.

[169] Dawood BB, Wilde J, Watson SP. Reference curves for aggregation and ATP secretion to aid diagnose of platelet-based bleeding disorders: effect of inhibition of ADP and thromboxane A(2) pathways. *Platelets*. 2007. 18(5): 329-45.

[170] Bonduel M, Frontroth JP, Hepner M, Sciuccati G, Feliu-Torres A. Platelet aggregation and adenosine triphosphate release values in children and adults. *J Thromb Haemost*. 2007. 5(8): 1782-3.

- [171] Skaer RJ, Flemans RJ, McQuilkan S. Mepacrine stains the dense bodies of human platelets and not platelet lysosomes. *Br J Haematol.* 1981. 49(3): 435-8.
- [172] L Corash YM, Rheinschmidt M. Analysis of platelet function using subcellular and surface-associated fluorescent probes. *Applications of Fluorescence in the Biomedical Sciences.* 1986 : 567-584.
- [173] Gordon N, Thom J, Cole C, Baker R. Rapid detection of hereditary and acquired platelet storage pool deficiency by flow cytometry. *Br J Haematol.* 1995. 89(1): 117-23.
- [174] Rendu F, Nurden AT, Lebreton M, Caen JP. Relationship between mepacrine-labelled dense body number, platelet capacity to accumulate ¹⁴C-5-HT and platelet density in the Bernard-Soulier and Hermansky-Pudlak syndromes. *Thromb Haemost.* 1979. 42(2): 694-704.
- [175] Wall JE, Buijs-Wilts M, Arnold JT, et al. A flow cytometric assay using mepacrine for study of uptake and release of platelet dense granule contents. *Br J Haematol.* 1995. 89(2): 380-5.
- [176] Ramstrom AS, Fagerberg IH, Lindahl TL. A flow cytometric assay for the study of dense granule storage and release in human platelets. *Platelets.* 1999. 10(2-3): 153-8.
- [177] Nishibori M, Cham B, McNicol A, Shalev A, Jain N, Gerrard JM. 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.* 1993. 91(4): 1775-82.
- [178] JG White MK. Some contributions of electron microscopy to knowledge of human platelets. *Thromb Haemost.* 2007. 98(1): 69-72.
- [179] Weiss HJ, Lages B, Vivic W, Tsung LY, White JG. Heterogeneous abnormalities of platelet dense granule ultrastructure in 20 patients with congenital storage pool deficiency. *Br J Haematol.* 1993. 83(2): 282-95.
- [180] White JG. The dense bodies of human platelets: inherent electron opacity of the serotonin storage particles. *Blood.* 1969. 33(4): 598-606.
- [181] JG Richards MDP. Uranaffin reaction: a new cytochemical technique for the localization of adenine nucleotides in organelles storing biogenic amines. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry.* 1977. 25(12): 1322-1336.
- [182] The BSfHBHaTTF. Guidelines on platelet function testing. *J Clin Pathol.* 1988. 41(12): 1322-30.
- [183] Caranobe C, Sie P, Nouvel C, Laurent G, Pris J, Boneu B. Platelets in myeloproliferative disorders. II. Serotonin uptake and storage: correlations with mepacrine labelled dense bodies and with platelet density. *Scand J Haematol.* 1980. 25(4): 289-95.
- [184] Axelson DA, Perel JM, Birmaher B, et al. Platelet serotonin reuptake inhibition and response to SSRIs in depressed adolescents. *Am J Psychiatry.* 2005. 162(4): 802-4.
- [185] Kumar AM, Kumar M, Deepika K, Fernandez JB, Eisdorfer C. A modified HPLC technique for simultaneous measurement of 5-hydroxytryptamine and 5-hydroxyindoleacetic acid in cerebrospinal fluid, platelet and plasma. *Life Sci.* 1990. 47(19): 1751-9.
- [186] Koch CA, Lasho TL, Tefferi A. Platelet-rich plasma serotonin levels in chronic myeloproliferative disorders: evaluation of diagnostic use and comparison with the neutrophil PRV-1 assay. *Br J Haematol.* 2004. 127(1): 34-9.
- [187] Maurer-Spurej E, Pittendreigh C, Wu JK. Diagnosing platelet delta-storage pool disease in children by flow cytometry. *Am J Clin Pathol.* 2007. 127(4): 626-32.
- [188] Gobbi G, Mirandola P, Tazzari PL, et al. Flow cytometry detection of serotonin content and release in resting and activated platelets. *Br J Haematol.* 2003. 121(6): 892-6.
- [189] Holmsen H, Dangelmaier CA. Measurement of secretion of adenine nucleotides. *Methods Enzymol.* 1989. 169: 195-205.
- [190] Summerfield GP, Keenan JP, Brodie NJ, Bellingham AJ. Bioluminescent assay of adenine nucleotides: rapid analysis of ATP and ADP in red cells and platelets using the LKB luminometer. *Clin Lab Haematol.* 1981. 3(3): 257-71.
- [191] Edenbrandt CM, Murphy S. Adenine and guanine nucleotide metabolism during platelet storage at 22 degrees C. *Blood.* 1990. 76(9): 1884-92.

- [192] Clauser S, Cramer-Borde E. Role of platelet electron microscopy in the diagnosis of platelet disorders. *Semin Thromb Hemost.* 2009. 35(2): 213-23.
- [193] Hézard N, Simon G, Droullé A, Nguyen P. La cytométrie en flux dans un laboratoire d'hémostase. *Revue Francophone des Laboratoire*, juin 2007. N° 393.
- [194] Nurden P and Nurden A. Diagnostic assessment of platelet function. In: *Quality in laboratory hemostasis and thrombosis*. Kitchen S, Olson JD and Preston FE (eds). Wiley-Blackwell. 2009. p:110-124.
- [195] Aleil B, Meyer N, Cazenave JP, Mossard JM, Gachet C. High stability of blood samples for flow cytometric analysis of VASP phosphorylation to measure the clopidogrel responsiveness in patients with coronary artery disease. *Thromb Haemost.* 2005. 94(4): 886-7.
- [196] Schwarz UR, Geiger J, Walter U, Eigenthaler M. Flow cytometry analysis of intracellular VASP phosphorylation for the assessment of activating and inhibitory signal transduction pathways in human platelets--definition and detection of ticlopidine/clopidogrel effects. *Thromb Haemost.* 1999. 82(3): 1145-52.
- [197] Hezard N, Metz D, Garnotel R, et al. Platelet VASP phosphorylation assessment in clopidogrel-treated patients: lack of agreement between Western blot and flow cytometry. *Platelets.* 2005. 16(8): 474-81.
- [198] Weiss HJ. Impaired platelet procoagulant mechanisms in patients with bleeding disorders. *Semin Thromb Hemost.* 2009. 35(2): 233-41.
- [199] Gupta PK, Charan VD, Saxena R. Spectrum of Von Willebrand disease and inherited platelet function disorders amongst Indian bleeders. *Ann Hematol.* 2007. 86(6): 403-7.
- [200] Ault KA. The clinical utility of flow cytometry in the study of platelets. *Semin Hematol.* 2001 .
- [201] Michelson AD, Barnard MR, Krueger LA, Frelinger AL 3rd, Furman MI. Evaluation of platelet function by flow cytometry. *Methods.* 2000. 21(3): 259-70.
- [202] Hezard N, Potron G, Schlegel N, Amory C, Leroux B, Nguyen P. Unexpected persistence of platelet hyporeactivity beyond the neonatal period: a flow cytometric study in neonates, infants and older children. *Thromb Haemost.* 2003. 90(1): 116-23.
- [203] Hezard N, Metz D, Nazeyrollas P, Droulle C, Potron G, Nguyen P. PFA-100 and flow cytometry: can they challenge aggregometry to assess antiplatelet agents, other than GPIIb/IIIa blockers, in coronary angioplasty. *Thromb Res.* 2002. 108(1): 43-7.
- [204] Lowe GC, Lordkipanidze M, Watson SP. Utility of the ISTH bleeding assessment tool in predicting platelet defects in participants with suspected inherited platelet function disorders. *J Thromb Haemost.* 2013. 11(9): 1663-8.
- [205] Rodeghiero F, Tosetto A, Abshire T, et al. ISTH/SSC bleeding assessment tool: a standardized questionnaire and a proposal for a new bleeding score for inherited bleeding disorders. *J Thromb Haemost.* 2010. 8(9): 2063-5.
- [206] Noris P, Balduini CL. Inherited thrombocytopenias in the era of personalized medicine. *Haematologica.* 2015. 100(2): 145-8.
- [207] Nurden AT, Freson K, Seligsohn U. Inherited platelet disorders. *Haemophilia.* 2012. 18 Suppl 4: 154-60.
- [208] Balduini CL, Savoia A, Seri M. Inherited thrombocytopenias frequently diagnosed in adults. *J Thromb Haemost.* 2013. 11(6): 1006-19.
- [209] Balduini CL, Savoia A. Genetics of familial forms of thrombocytopenia. *Hum Genet.* 2012. 131(12): 1821-32.
- [210] Rao AK, AUID- Oho, Songdej N. Inherited thrombocytopenias: the beat goes on. *Blood.* 2015. 125(5): 748-50.
- [211] Leverger G, Petit A, Fasola S, Landman-Parker J, Favier R. Les thrombopénies génétiques. *Archives de pédiatrie.* 2010. 17(8):1185-91.
- [212] Geddis AE, Kaushansky K. Inherited thrombocytopenias: toward a molecular understanding of disorders of platelet production. *Curr Opin Pediatr.* 2004. 16(1): 15-22.
- [213] Geddis AE. Inherited thrombocytopenias: an approach to diagnosis and management. *Int J Lab Hematol.* 2013. 35(1): 14-25.
- [214] Balduini CL, Cattaneo M, Fabris F, et al. Inherited thrombocytopenias: a proposed diagnostic algorithm from the Italian

- Gruppo di Studio delle Piastrine. *Haematologica*. 2003. 88(5): 582-92.
- [215] Penny LA, Dell'Aquila M, Jones MC, et al. Clinical and molecular characterization of patients with distal 11q deletions. *Am J Hum Genet*. 1995. 56(3): 676-83.
- [216] Favier R, Douay L, Esteva B, et al. A novel genetic thrombocytopenia (Paris-Trousseau) associated with platelet inclusions, dysmegakaryopoiesis and chromosome deletion AT 11q23. *C R Acad Sci III*. 1993. 316(7): 698-701.
- [217] Favier R, Jondeau K, Boutard P, et al. Paris-Trousseau syndrome : clinical, hematological, molecular data of ten new cases. *Thromb Haemost*. 2003. 90(5): 893-7.
- [218] Breton-Gorius J, Favier R, Guichard J, et al. A new congenital dysmegakaryopoietic thrombocytopenia (Paris-Trousseau) associated with giant platelet alpha-granules and chromosome 11 deletion at 11q23. *Blood*. 1995. 85(7): 1805-14.
- [219] Raslova H, Komura E, Le CJP, et al. FLI1 monoallelic expression combined with its hemizygous loss underlies Paris-Trousseau/Jacobsen thrombopenia. *J Clin Invest*. 2004. 114(1): 77-84.
- [220] A Kinouchi KM, M Ando AT. Facial appearance of patients with conotruncal anomalies. *Pediatr Jpn*. 1976.
- [221] Shimizu T, Takao A, Ando M, Hirayama A. Conotruncal face syndrome: its heterogeneity and association with thymus involution. In: Nora JJ, Takao A eds. *Congenital Heart Disease: Causes and Processes*. 1984. Mount Kisco, N. Y. Futura Publishing. p. 29-41.
- [222] Takao A, Ando M, Cho K, Kinouchi A, Murakami Y. Etiologic categorization of common congenital heart disease. In: Van Praagh R, Takao A eds. *Etiology and Morphogenesis of Congenital Heart Disease*. 1980. Mount Kisco, N. Y. Futura Publishing Company. p. 253-269.
- [223] Wilson DI, Burn J, Scambler P, Goodship J. DiGeorge syndrome: part of CATCH 22. *J Med Genet*. 1993. 30(10): 852-6.
- [224] Burn J. Closing time for CATCH22. *J Med Genet*. 1999. 36(10): 737-8.
- [225] Kunishima S, Naoe T, Kamiya T, Saito H. Novel heterozygous missense mutation in the platelet glycoprotein Ib beta gene associated with isolated giant platelet disorder. *Am J Hematol*. 2001. 68(4): 249-55.
- [226] Van Geet C, Devriendt K, Eyskens B, Vermeylen J, Hoylaerts MF. Velocardiofacial syndrome patients with a heterozygous chromosome 22q11 deletion have giant platelets. *Pediatr Res*. 1998. 44(4): 607-11.
- [227] Lawrence S, McDonald-McGinn DM, Zackai E, Sullivan KE. Thrombocytopenia in patients with chromosome 22q11.2 deletion syndrome. *J Pediatr*. 2003. 143(2): 277-8.
- [228] Greenhalgh KL, Howell RT, Bottani A, et al. Thrombocytopenia-absent radius syndrome: a clinical genetic study. *J Med Genet*. 2002. 39(12): 876-81.
- [229] Hedberg VA, Lipton JM. Thrombocytopenia with absent radii. A review of 100 cases. *Am J Pediatr Hematol Oncol*. 1988. 10(1): 51-64.
- [230] Camitta BM, Rock A. Acute lymphoid leukemia in a patient with thrombocytopenia/absent radii (Tar) syndrome. *Am J Pediatr Hematol Oncol*. 1993. 15(3): 335-7.
- [231] Letestu R, Vitrat N, Masse A, et al. Existence of a differentiation blockage at the stage of a megakaryocyte precursor in the thrombocytopenia and absent radii (TAR) syndrome. *Blood*. 2000. 95(5): 1633-41.
- [232] Strippoli P, Savoia A, Iolascon A, et al. Mutational screening of thrombopoietin receptor gene (c-mpl) in patients with congenital thrombocytopenia and absent radii (TAR). *Br J Haematol*. 1998. 103(2): 311-4.
- [233] Albers CA, Paul DS, Schulze H, et al. Compound inheritance of a low-frequency regulatory SNP and a rare null mutation in exon-junction complex subunit RBM8A causes TAR syndrome. *Nat Genet*. 2012. 44(4): 435-9, S1-2.
- [234] Klopocki E, Schulze H, Strauss G, et al. Complex inheritance pattern resembling autosomal recessive inheritance involving a microdeletion in thrombocytopenia-absent radius syndrome. *Am J Hum Genet*. 2007. 80(2): 232-40.
- [235] Rosenfeld JA, Traylor RN, Schaefer GB, et al. Proximal microdeletions and microduplications of 1q21.1 contribute to variable abnormal phenotypes. *Eur J Hum Genet*. 2012. 20(7): 754-61.
- [236] Arias S, Penchaszadeh VB, Pinto-Cisternas J, Larrauri S. The IVIC syndrome: a new autosomal dominant complex

- pleiotropic syndrome with radial ray hypoplasia, hearing impairment, external ophthalmoplegia, and thrombocytopenia. *Am J Med Genet.* 1980. 6(1): 25-59.
- [237] Paradisi I, Arias S. IVIC syndrome is caused by a c.2607delA mutation in the SALL4 locus. *Am J Med Genet A.* 2007. 143(4): 326-32.
- [238] Thompson AA, Nguyen LT. Amegakaryocytic thrombocytopenia and radio-ulnar synostosis are associated with HOXA11 mutation. *Nat Genet.* 2000. 26(4): 397-8.
- [239] Thompson AA, Woodruff K, Feig SA, Nguyen LT, Schanen NC. Congenital thrombocytopenia and radio-ulnar synostosis: a new familial syndrome. *Br J Haematol.* 2001. 113(4): 866-70.
- [240] Althaus K, Greinacher A. MYH-9 Related Platelet Disorders: Strategies for Management and Diagnosis. *Transfus Med Hemother.* 2010. 37(5): 260-267.
- [241] Heath KE, Campos-Barros A, Toren A, et al. 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.* 2001. 69(5): 1033-45.
- [242] Seri M, Pecci A, Di BF, et al. MYH9-related disease: May-Hegglin anomaly, Sebastian syndrome, Fechtner syndrome, and Epstein syndrome are not distinct entities but represent a variable expression of a single illness. *Medicine (Baltimore).* 2003. 82(3): 203-15.
- [243] Balduini A, Pallotta I, Malara A, et al. Adhesive receptors, extracellular proteins and myosin IIA orchestrate proplatelet formation by human megakaryocytes. *J Thromb Haemost.* 2008. 6(11): 1900-7.
- [244] Kunishima S, Matsushita T, Kojima T, et al. Immunofluorescence analysis of neutrophil nonmuscle myosin heavy chain-A in MYH9 disorders: association of subcellular localization with MYH9 mutations. *Lab Invest.* 2003. 83(1): 115-22.
- [245] Savoia A, De Rocco D, Panza E, et al. Heavy chain myosin 9-related disease (MYH9 -RD): neutrophil inclusions of myosin-9 as a pathognomonic sign of the disorder. *Thromb Haemost.* 2010. 103(4): 826-32.
- [246] Zhu Q, Zhang M, Blaes RM, et al. The Wiskott-Aldrich syndrome and X-linked congenital thrombocytopenia are caused by mutations of the same gene. *Blood.* 1995. 86(10): 3797-804.
- [247] Sabri S, Foudi A, Boukour S, et al. Deficiency in the Wiskott-Aldrich protein induces premature proplatelet formation and platelet production in the bone marrow compartment. *Blood.* 2006. 108(1): 134-40.
- [248] Imai K, Morio T, Zhu Y, et al. Clinical course of patients with WASP gene mutations. *Blood.* 2004. 103(2): 456-64.
- [249] Fox NE, Chen R, Hitchcock I, Keates-Baleeiro J, Frangoul H, Geddis AE. Compound heterozygous c-Mpl mutations in a child with congenital amegakaryocytic thrombocytopenia: functional characterization and a review of the literature. *Exp Hematol.* 2009. 37(4): 495-503.
- [250] Ballmaier M, Germeshausen M, Schulze H, et al. c-mpl mutations are the cause of congenital amegakaryocytic thrombocytopenia. *Blood.* 2001. 97(1): 139-46.
- [251] van den Oudenrijn S, Bruin M, Folman CC, et al. Mutations in the thrombopoietin receptor, Mpl, in children with congenital amegakaryocytic thrombocytopenia. *Br J Haematol.* 2000. 110(2): 441-8.
- [252] Drachman JG, Jarvik GP, Mehaffey MG. Autosomal dominant thrombocytopenia: incomplete megakaryocyte differentiation and linkage to human chromosome 10. *Blood.* 2000. 96(1): 118-25.
- [253] Pippucci T, Savoia A, Perrotta S, et al. 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.* 2011. 88(1): 115-20.
- [254] Noris P, Perrotta S, Seri M, et al. Mutations in ANKRD26 are responsible for a frequent form of inherited thrombocytopenia: analysis of 78 patients from 21 families. *Blood.* 2011. 117(24): 6673-80.
- [255] Latger-Cannard V, Philippe C, Jonveaux P, Lecompte T, Favier R. 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.* 2011. 33(7):e264-6.
- [256] Song WJ, Sullivan MG, Legare RD, et al. Haploinsufficiency of CBFA2 causes familial thrombocytopenia with propensity to develop acute myelogenous leukaemia. *Nat Genet.* 1999. 23(2): 166-75.

- [257] Beri-Dexheimer M, Latger-Cannard V, Philippe C, et al. Clinical phenotype of germline RUNX1 haploinsufficiency: from point mutations to large genomic deletions. *Eur J Hum Genet.* 2008. 16(8): 1014-8.
- [258] Savoia A, Balduini CL, Savino M, et al. Autosomal dominant macrothrombocytopenia in Italy is most frequently a type of heterozygous Bernard-Soulier syndrome. *Blood.* 2001. 97(5): 1330-5.
- [259] Nichols KE, Crispino JD, Poncz M, et al. Familial dyserythropoietic anaemia and thrombocytopenia due to an inherited mutation in GATA1. *Nat Genet.* 2000. 24(3): 266-70.
- [260] Tubman VN, Levine JE, Campagna DR, et al. X-linked gray platelet syndrome due to a GATA1 Arg216Gln mutation. *Blood.* 2007. 109(8): 3297-9.
- [261] Yu C, Niakan KK, Matsushita M, Stamatoyannopoulos G, Orkin SH, Raskind WH. X-linked thrombocytopenia with thalassemia from a mutation in the amino finger of GATA-1 affecting DNA binding rather than FOG-1 interaction. *Blood.* 2002. 100(6): 2040-5.
- [262] Freson K, Wijgaerts A, van Geet C. Update on the causes of platelet disorders and functional consequences. *Int J Lab Hematol.* 2014. 36(3): 313-25.
- [263] Cattaneo M. Inherited platelet-based bleeding disorders. *J Thromb Haemost.* 2003. 1(7): 1628-36.
- [264] Dumas J, Kumar R, McDonagh T, et al. Crystal structure of the wild-type Von Willebrand factor A1-glycoprotein Iba complex reveals conformation differences with a complex bearing VonWillebrand disease mutations. *J Biol Chem.* 2004. 279: 23327-23334.
- [265] Othman M. Platelet-type von Willebrand disease and type 2B von Willebrand disease: a story of nonidentical twins when two different genetic abnormalities evolve into similar phenotypes. *Semin Thromb Hemost.* 2007. 33(8): 780-6.
- [266] Hollopeter G, Jantzen HM, Vincent D, et al. Identification of the platelet ADP receptor targeted by antithrombotic drugs. *Nature.* 2001. 409(6817): 202-7.
- [267] Oury C, Lenaerts T, Peerlinck K, Vermylen J, Hoylaerts M. Congenital deficiency of the phospholipase C coupled P2Y1 receptor leads to a mild bleeding disorder. *Thromb Haemost.* 1999. 82(2):20-21.
- [268] Hirata T, Ushikubi F, Kakizuka A, Okuma M, Narumiya S. Two thromboxane A2 receptor isoforms in human platelets. Opposite coupling to adenylyl cyclase with different sensitivity to Arg60 to Leu mutation. *J Clin Invest.* 1996. 97(4): 949-56.
- [269] Boylan B, Chen H, Rathore V, et al. Anti-GPVI-associated ITP: an acquired platelet disorder caused by autoantibody-mediated clearance of the GPVI/FcRgamma-chain complex from the human platelet surface. *Blood.* 2004. 104(5): 1350-5.
- [270] Watkins NA, O'Connor MN, Rankin A, et al. Definition of novel GP6 polymorphisms and major difference in haplotype frequencies between populations by a combination of in-depth exon resequencing and genotyping with tag single nucleotide polymorphisms. *J Thromb Haemost.* 2006. 4(6): 1197-205.
- [271] Best D, Senis YA, Jarvis GE, et al. GPVI levels in platelets: relationship to platelet function at high shear. *Blood.* 2003. 102(8): 2811-8.
- [272] Nurden P, Jandrot-Perrus M, Combrie R, et al. Severe deficiency of glycoprotein VI in a patient with gray platelet syndrome. *Blood.* 2004. 104(1): 107-14.
- [273] Dumont B, Lasne D, Rothschild C, et al. Absence of collagen-induced platelet activation caused by compound heterozygous GPVI mutations. *Blood.* 2009. 114(9): 1900-3.
- [274] Weiss HJ, Lages B. The response of platelets to epinephrine in storage pool deficiency--evidence pertaining to the role of adenosine diphosphate in mediating primary and secondary aggregation. *Blood.* 1988. 72(5): 1717-25.
- [275] Introne W, Boissy RE, Gahl WA. Clinical, molecular, and cell biological aspects of Chediak-Higashi syndrome. *Mol Genet Metab.* 1999. 68(2): 283-303.
- [276] Nagle DL, Karim MA, Woolf EA, et al. Identification and mutation analysis of the complete gene for Chediak-Higashi syndrome. *Nat Genet.* 1996. 14(3): 307-11.
- [277] Caen JP, Deschamps JF, Bodevin E, Bryckaert MC, Dupuy E, Wasteson A. Megakaryocytes and myelofibrosis in gray platelet syndrome. *Nouv Rev Fr Hematol.* 1987. 29(2): 109-14.

- [278] Nurden AT, Nurden P. The gray platelet syndrome: clinical spectrum of the disease. *Blood Rev.* 2007. 21(1): 21-36.
- [279] Albers CA, Cvejic A, Favier R, et al. Exome sequencing identifies NBEAL2 as the causative gene for gray platelet syndrome. *Nat Genet.* 2011. 43(8): 735-7.
- [280] Gunay-Aygun M, Falik-Zaccari TC, Vilboux T, et al. NBEAL2 is mutated in gray platelet syndrome and is required for biogenesis of platelet alpha-granules. *Nat Genet.* 2011. 43(8): 732-4.
- [281] Kahr WH, Hinckley J, Li L, et al. Mutations in NBEAL2, encoding a BEACH protein, cause gray platelet syndrome. *Nat Genet.* 2011. 43(8): 738-40.
- [282] Lo B, Li L, Gissen P, et al. Requirement of VPS33B, a member of the Sec1/Munc18 protein family, in megakaryocyte and platelet alpha-granule biogenesis. *Blood.* 2005. 106(13): 4159-66.
- [283] Paterson AD, Rommens JM, Bharaj B, et al. Persons with Quebec platelet disorder have a tandem duplication of PLAU, the urokinase plasminogen activator gene. *Blood.* 2010. 115(6): 1264-6.
- [284] Laurent PA, Severin S, Gratacap MP, Payrastre B. Class I PI 3-kinases signaling in platelet activation and thrombosis: PDK1/Akt/GSK3 axis and impact of PTEN and SHIP1. *Adv Biol Regul.* 2014. 54: 162-74.
- [285] Morange PE, Alessi MC. Thrombosis in central obesity and metabolic syndrome: mechanisms and epidemiology. *Thromb Haemost.* 2013. 110(4): 669-80.
- [286] Munnix IC, Harmsma M, Giddings JC, et al. Store-mediated calcium entry in the regulation of phosphatidylserine exposure in blood cells from Scott patients. *Thromb Haemost.* 2003. 89(4): 687-95.
- [287] Albrecht C, McVey JH, Elliott JI, et al. A novel missense mutation in ABCA1 results in altered protein trafficking and reduced phosphatidylserine translocation in a patient with Scott syndrome. *Blood.* 2005. 106(2): 542-9.
- [288] Castoldi E, Collins PW, Williamson PL, Bevers EM. Compound heterozygosity for 2 novel TMEM16F mutations in a patient with Scott syndrome. *Blood.* 2011. 117(16): 4399-400.
- [289] Du X, Beutler L, Ruan C, Castaldi PA, Berndt MC. Glycoprotein Ib and glycoprotein IX are fully complexed in the intact platelet membrane. *Blood.* 1987. 69(5): 1524-7.
- [290] Ruan CG, Du XP, Xi XD, Castaldi PA, Berndt MC. A murine antiglycoprotein Ib complex monoclonal antibody, SZ 2, inhibits platelet aggregation induced by both ristocetin and collagen. *Blood.* 1987. 69(2): 570-7.
- [291] Ruan C WH, Xi X LP, Gu G. Studies on monoclonal antibodies on monoclonal antibody SZ-21 to platelet membrane glycoprotein III. *National Medical Journal of China.* 1987. 67: 76-78.
- [292] Ruan C WH, Du X HX, Li P. Studies on a monoclonal antibody to platelet membrane glycoprotein IIb - SZ-22. *Chinese Journal of Hematology.* 1988. 9: 138-141.
- [293] G Wu XX, P Li XC, Ruan C. Preparation of a monoclonal antibody, SZ-51, that recognizes an alpha-granule membrane protein (GMP-140) on the surface of activated human platelets. *Nouvelle Revue Française d'Hématologie.* 1990. 32(4): 231-235.
- [294] Lau YL, Jones BM, Low LC, Wong SN, Leung NK. Defective B-cell and regulatory T-cell function in Wiskott-Aldrich syndrome. *Eur J Pediatr.* 1992. 151(9): 680-3.
- [295] YL LAU SNW, Lawton WM. Takayasu's arteritis associated with Wiskott- Aldrich syndrome. *J Paediatr Child Health.* 1992. 28(5): 407-409.
- [296] Zhang GS. Le diagnostic et le traitement de maladies héréditaires de récepteurs membranaires plaquettaires. *J Clin Intern Med (Chinois).* 1993. 10(4): 19-20.
- [297] MT Huang CCC, ST Jou KHL. Successful bone marrow transplantation in a Chinese boy with Wiskott-Aldrich syndrome. *Asian Pac J Allergy Immunol.* 1996. 14(1): 57-63.
- [298] JS Lin MCS, CH Wang CTL. Familial macrothrombocytopenia with granulocyte inclusion: a clinical and laboratory problem. *J Formos Med Assoc.* 1998. 97(2): 118-22.
- [299] Leung TF, Tsoi WC, Li CK, Chik KW, Shing MM, Yuen PM. A Chinese adolescent girl with Fechtner-like syndrome. *Acta Paediatr.* 1998. 87(6): 705-7.
- [300] Chen FP, Zhou BT, Xie QZ, et al. Retrospective study of 25 patients with Glanzmann thrombasthenia. *J Clin Hematol*

(Chinois). 2000. 13(1): 5-7.

- [301] Wang ZY, Shi JM, Han Y, et al. A novel point mutation in the transmembrane domain of platelet glycoprotein IX gene identified in Bernard-Soulier syndrome patient. *Chin J Hematol.* 2001.22(9):464-7.
- [302] Wang Z, Shi J, Han Y, Wang Y, Ruan C. Spontaneous platelet aggregation with congenital giant platelet containing large granules and thick membrane. *Clin Appl Thromb Hemost.* 2001. 7(4): 305-10.
- [303] Wang ZY, Shi JM, Han Y, et al. Report of a patient with spontaneous aggregation of his giant and morphologically abnormal platelets. *Chin J Hematol.* 2002. 23(3): 121-125.
- [304] Meng FB. Syndrome des plaquettes géantes. *Médecine clinique (Chinois).* 2002. 23(6):268.
- [305] Chan KW, Lee TL, Chung BH, Yang X, Lau YL. Identification of five novel WASP mutations in Chinese families with Wiskott-Aldrich syndrome. *Hum Mutat.* 2002. 20(2): 151-2.
- [306] Zhao XJ, Wang WY, Duan ZM, et al. Molecular biological study of glycoprotein IX gene defect in Bernard-Soulier syndrome. *Chin J Hematol.* 2003. 24(9):480-483.
- [307] Xi L, Hu JM, Huang YZ, et al. Syndrome de Bernard-Soulier et grossesse : à propos d'un cas. *Chin J Obstetr Gynecol.* 2004.39(7):473
- [308] Wang Z, Zhao X, Duan W, et al. A novel mutation in the transmembrane region of glyco-protein IX associated with Bernard-Soulier syndrome. *Thromb Haemost.* 2004. 92(3): 606-13.
- [309] Yuan XY, Chen FP, Xie QZ, et al. α IIbA477P(A446P)- une nouvelle mutation identifiée chez un patient atteint de la thrombasthénie de Glanzmann. *J Clin Res (Chinois).* 2004. 21(11)
- [310] Rao YF, Yang PN, Ding WR, et al. Quatre patients atteints de syndrome Sebastian. *Chin J Hematol.* 2004. 25(3): 192-192.
- [311] Hu YL, Zheng MM. Thrombopathies héréditaires et grossesse. *Chin J Pract Gynecol Obstetr.* 2004. 20(5): 269-270.
- [312] Chien YH, Hwu WL, Ariga T, et al. Molecular diagnosis of Wiskott-Aldrich syndrome in Taiwan. *J Microbiol Immunol Infect.* 2004. 37(5): 276-81.
- [313] Fu B, Chen FP, Xia K, et al. Effect of glycoproteine α II bA2334C mutation on the biosynthesis and transportation of α II b β 3 complex. *Chin J Hematol.* 2005. 26(3): 157-161.
- [314] Shen WZ, Li SM, Jiang YZ, et al. Glanzmann thrombasthenia caused by a novel mutation Pro126His in integrin α IIb. *J Diagn Concepts Pract.* 2006. 4(6): 451-454.
- [315] Lin FR. Thrombopénies constitutionnelles. *Clinical Focus.* 2005. 20(12): 719-721.
- [316] Wang XY, Yang RC. Anomalies génétiques de la thrombasthénie de Glanzmann. *Foreign Medical Science (Section of Internal Medicine) (Chinois).* 2006. 33(3): 113-116.
- [317] Ma ES, Wong CL, Shek TW, Hui SP. Hematologic and genetic characterization of an MYH9-related disorder in a Chinese family. *Haematologica.* 2006. 91(7): 1002-3.
- [318] Wu SY, Wang ZY, Dai L, et al. A preliminary study of an inherited macrothrombocytopenia disorder with abnormal large granules. *Chin J Hematol.* 2006. 27(9): 584-7.
- [319] Wu S, Wang Z, Dai L, et al. An inherited macrothrombocytopenic disorder with abnormal large granules. *Platelets.* 2006. 17(4): 259-65.
- [320] Su Y, Wang Z, Yang H, et al. Clinical and molecular genetic analysis of a family with sitosterolemia and co-existing erythrocyte and platelet abnormalities. *Haematologica.* 2006. 91(10): 1392-5.
- [321] Jaing TH, Tsai BY, Chen SH, Lee WI, Chang KW, Chu SM. Early transplantation of unrelated cord blood in a two-month-old infant with Wiskott-Aldrich syndrome. *Pediatr Transplant.* 2007. 11(5): 557-9.
- [322] Jin PP, Shen WZ, Yang F. Analysis of clinical features and genotype in three Chinese pedigrees with Glanzmann thrombasthenia. *Chin J Hematol.* 2008. 29(3): 149-153.
- [323] Shen WZ, Jin PP, Wang XF, et al. Analysis of phenotype and genotype in three Chinese pedigrees with Glanzmann thrombasthenia. *Chin J Lab Med.* 2008. 31(1): 55-59.
- [324] Jin PP, Shen WZ, Yang F. Analysis of phenotype and genotype in eight Chinese pedigrees with Glanzmann

- thrombasthenia. *Chin J Lab Med*. 2008. 31(11): 1231-1234
- [325] Yang HY, Wang ZY, Cao LJ, et al. Expression and function of non-muscle myosin-IIA in Fechtner syndrome. *Chin Exp Hematol*. 2008. 16(4): 871-874.
- [326] Lee WI, Yang CY, Jaing TH, Huang JL, Chien YH, Chang KW. Clinical aspects and molecular analysis of Chinese patients with Wiskott-Aldrich syndrome in Taiwan. *Int Arch Allergy Immunol*. 2008. 145(1): 15-23.
- [327] Yu TT, Ding QL, Dai J, et al. Phenotype and genotype diagnosis in five Chinese pedigrees with Glanzmann thrombasthenia. *J Diagn Concepts Pract*. 2009. (03): 296-301.
- [328] Yap DY, Tse KC, Chan TM, Lie AK. Epstein syndrome presenting as renal failure in young patients. *Ren Fail*. 2009. 31(7): 582-5.
- [329] Lee PP, Chen TX, Jiang LP, et al. Clinical and molecular characteristics of 35 Chinese children with Wiskott-Aldrich syndrome. *J Clin Immunol*. 2009. 29(4): 490-500.
- [330] Qin HH, Wang XF, Xu GQ, et al. Molecular analysis of phenotype and genotype in three Chinese pedigrees with Glanzmann thrombasthenia. *Chin J Lab Diagn*. 2010. 14(11): 1803-1807.
- [331] Sun XH. Mécanismes moléculaires in thrombopénies héréditaires. *Int J Blood Transfus Hematol (Chinois)*. 2010. 33(6): 539-542.
- [332] WI Lee JLH, TH Jaing KHW, Chien YH. Clinical Aspects and Genetic Analysis of Taiwanese Patients with Wiskott-Aldrich Syndrome Protein Mutation: The First Identification of X-Linked Thrombocytopenia in *J Clin Immunol*. 2010. 30: 593-601.
- [333] ZY Zhang HQX, LP Jiang YZ. Analysis of clinical and molecular characteristics of Wiskott-Aldrich syndrome in 24 patients from 23 unrelated Chinese families. *Pediatr Allergy Immunol*. 2010. 21(3): 522-32.
- [334] Cui QY, Yu ZQ, Su J, et al. Study of clinical phenotype and mechanism in five Chinese pedigrees with Glanzmann thrombasthenia. *J Soochow University Medical Science Edition*. 2011. 31(2): 276-280.
- [335] Wang G, Wang Z, Liang J, Cao L, Bai X, Ruan C. A phytosterolemia patient presenting exclusively with macrothrombocytopenia and stomatocytic hemolysis. *Acta Haematol*. 2011. 126(2): 95-8.
- [336] Lin HL, Zhu HH. Progrès dans les thrombopénies constitutionnelles. *Int J Blood Transfus Hematol*. 2011. 34(3): 236-241.
- [337] Wu XH, Lin JM, Kang XM, et al. Utilization de la méthode SSCP dans le diagnostic des thrombopénies constitutionnelles. *Heilongjiang Medicine and Pharmacy*. 2012. 35(5): 24-25.
- [338] Wu XH, Li JM, Kang XM, et al. Application genetics analysis methods diagnosis hereditary thrombocytopenia syndrome. 2012. 20(11): 32-34.
- [339] G Wang LC, Z Wang MJ, Sun X. Macrothrombocytopenia/stomatocytosis specially associated with phytosterolemia. *Clin Appl Thromb Hemost*. 2012. 18(6): 582-7.
- [340] Zhou FF. Progrès dans la thrombopénie héréditaire 2 (THC2). *Int J Blood Transfus Hematol*. 2012. 35(4): 332-335.
- [341] Shi RM, Cao XQ. Deux pedigrees atteints de thrombopénies constitutionnelles. *J Clin Pediatr*. 2013. 31(2): 191-193.
- [342] Jin P, Qiu L, Hao S, Yuan X, Shen L. A 3-year-old girl with frequent nose bleeds. *Clin Chem*. 2013. 59(5): 746-9.
- [343] Wang Z, Cao L, Su Y, et al. Specific macrothrombocytopenia/hemolytic anemia associated with sitosterolemia. *Am J Hematol*. 2014. 89(3): 320-4.
- [344] White JG. Platelet storage pool deficiency in Jacobsen syndrome. *Platelets*. 2007. 18(7): 522-7.
- [345] Gerrard JM, McNicol A. Platelet storage pool deficiency, leukemia, and myelodysplastic syndromes. *Leuk Lymphoma*. 1992. 8(4-5): 277-81.
- [346] Falke S, Avenarius HJ, Deicher H. The induction of an acquired storage pool deficiency of the thrombocytes by IgG antibodies in systemic lupus erythematosus and chronic polyarthritis. *Z Rheumatol*. 1990. 49(2): 70-6.
- [347] Sakashita C, Akiyama H, Satoh Y, et al. Acquired storage-pool disorders occurring late after allogeneic bone marrow transplantation: partial activation of platelets in asymptomatic patients. *Int J Hematol*. 2001. 74(2): 222-7.
- [348] Rumbaut RE, Kroll MH, Gyorkey F, Schafer AI. Acquired platelet storage pool deficiency due to severe valvular

- disease corrected by prosthetic valve replacement. *Am J Hematol.* 1994. 45(3): 272-3.
- [349] Gawaz MP, Bogner C, Gurland HJ. Flow-cytometric analysis of mepacrine-labelled platelets in patients with end-stage renal failure. *Haemostasis.* 1993. 23(5): 284-92.
- [350] Cortelazzo S, Casarotto C, D'Emilio A, Ricciardi O, Dini E. Acquired storage pool deficiency with increased platelet-associated IgG in a patient with compensated chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. *Haematologica.* 1984. 69(1): 81-4.
- [351] Ray MJ, Hawson GA, Just SJ, McLachlan G, O'Brien M. Relationship of platelet aggregation to bleeding after cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg.* 1994. 57(4): 981-6.
- [352] Nayak L, Schmaier AH. A platelet acquired storage pool disorder associated with tamoxifen therapy. *Case Rep Hematol.* 2012. 2012: 948351.
- [353] Israels SJ, McNicol A, Robertson C, Gerrard JM. Platelet storage pool deficiency: diagnosis in patients with prolonged bleeding times and normal platelet aggregation. *Br J Haematol.* 1990. 75(1): 118-21.
- [354] Pujol-Moix N, Hernandez A, Escolar G, Espanol I, Martinez-Brotos F, Mateo J. Platelet ultrastructural morphometry for diagnosis of partial delta-storage pool disease in patients with mild platelet dysfunction and/or thrombocytopenia of unknown origin. A study of 24 cases. *Haematologica.* 2000. 85(6): 619-26.
- [355] Nieuwenhuis HK, Akkerman JW, Sixma JJ. Patients with a prolonged bleeding time and normal aggregation tests may have storage pool deficiency: studies on one hundred six patients. *Blood.* 1987. 70(3): 620-3.
- [356] Friesgaard CA, Clemmensen O, Junker P. Palpable purpura with an unexpected outcome. *Case Rep Rheumatol.* 2013. 2013: 678427.
- [357] Japatti SR, Bhatsange A, Reddy M, Chidambar YS, Patil S, Vhanmane P. Scurvy-scorbutic siderosis of gingiva: A diagnostic challenge - A rare case report. *Dent Res J (Isfahan).* 2013. 10(3): 394-400.
- [358] Smith A, Di PG, Humphrey-Murto S. Scurvy in the developed world. *CMAJ.* 2011. 183(11): E752-5.
- [359] Zammit P. Vitamin C deficiency in an elderly adult. *J Am Geriatr Soc.* 2013. 61(4): 657-8.
- [360] Fain O, Paries J, Jacquart B, et al. Hypovitaminosis C in hospitalized patients. *Eur J Intern Med.* 2003. 14(7): 419-425.
- [361] Cahill L, Corey PN, El-Sohehy A. Vitamin C deficiency in a population of young Canadian adults. *Am J Epidemiol.* 2009. 170(4): 464-71.
- [362] Hampl JS, Taylor CA, Johnston CS. Vitamin C deficiency and depletion in the United States: the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988 to 1994. *Am J Public Health.* 2004. 94(5): 870-5.
- [363] Johnston CS, Thompson LL. Vitamin C status of an outpatient population. *J Am Coll Nutr.* 1998. 17(4): 366-70.
- [364] Chapman JM, Marley JJ. Scurvy and the ageing population. *Br Dent J.* 2011. 211(12): 583-4.
- [365] Harrison FE. A critical review of vitamin C for the prevention of age-related cognitive decline and Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 2012. 29(4): 711-26.
- [366] S Boulinguez MLB, P De Vençay CB, Bonnetblanc JM. Scorbut révélé par un purpura ecchymotique et des ulcères hémorragiques des membres inférieurs. *Ann Dermatol Venereol.* 2000. 127: 510-512.
- [367] Hirschmann JV, Raugi GJ. Adult scurvy. *J Am Acad Dermatol.* 1999. 41(6): 895-906; quiz 907-10.
- [368] Mertens MT, Gertner E. Rheumatic manifestations of scurvy: a report of three recent cases in a major urban center and a review. *Semin Arthritis Rheum.* 2011. 41(2): 286-90.
- [369] Reuler JB, Broudy VC, Cooney TG. Adult scurvy. *JAMA.* 1985. 253(6): 805-7.
- [370] Jacob RA. Vitamin C. In: Shils ME OJA, Shike M RAC eds. *Modern nutrition in health and disease.* 1999. Baltimore. William & Wilkins. 467-483.
- [371] Levine M. New concepts in the biology and biochemistry of ascorbic acid. *N Engl J Med.* 1986. 314(14): 892-902.
- [372] Li Y, Schellhorn HE. New developments and novel therapeutic perspectives for vitamin C. *J Nutr.* 2007. 137(10): 2171-84.
- [373] Ward MS, Lamb J, May JM, Harrison FE. Behavioral and monoamine changes following severe vitamin C deficiency. *J Neurochem.* 2013. 124(3): 363-75.

- [374] Dolberg OJ, Elis A, Lishner M. Scurvy in the 21st century. *Isr Med Assoc J*. 2010. 12(3): 183-4.
- [375] CETINGIL AI, ULUTIN ON, KARACA M. A platelet defect in a case of scurvy. *Br J Haematol*. 1958. 4(3): 350-4.
- [376] Born GV, Wright HP. Platelet adhesiveness in experimental scurvy. *Lancet*. 1967. 1(7488): 477-8.
- [377] Wilson PA, McNicol GP, Douglas AS. Platelet abnormality in human scurvy. *Lancet*. 1967. 1(7497): 975-8.
- [378] Born GV, Wright HP. Diminished platelet aggregation in experimental scurvy. *J Physiol*. 1968. 197(1): 27P-28P.
- [379] Purcell IM, Constantine JW. Platelets and experimental scurvy. *Nature*. 1972. 235(5338): 389-91.
- [380] Dey F, Moller A, Kemkes-Matthes B, et al. Reduced platelet aggregation in a boy with scurvy. *Klin Padiatr*. 2012. 224(7): 448-52.
- [381] Rebouche CJ. Ascorbic acid and carnitine biosynthesis. *Am J Clin Nutr*. 1991. 54(6 Suppl): 1147S-1152S.
- [382] Gabay C, Voskuyl AE, Cadiot G, Mignon M, Kahn MF. A case of scurvy presenting with cutaneous and articular signs. *Clin Rheumatol*. 1993. 12(2): 278-80.
- [383] Brody S. High-dose ascorbic acid increases intercourse frequency and improves mood: a randomized controlled clinical trial. *Biol Psychiatry*. 2002. 52(4): 371-4.
- [384] Hesecker H, Kubler W, Pudel V, Westenhofer J. Interaction of vitamins with mental performance. *Bibl Nutr Dieta*. 1995. (52): 43-55.
- [385] Kinsman RA, Hood J. Some behavioral effects of ascorbic acid deficiency. *Am J Clin Nutr*. 1971. 24(4): 455-64.
- [386] Oishi J, Doi H, Kawakami N. Nutrition and depressive symptoms in community-dwelling elderly persons in Japan. *Acta Med Okayama*. 2009. 63(1): 9-17.
- [387] Hori S. Effects of sulfhydryl agents on the activation of tryptophan-5-monoxygenase from bovine pineal glands. *Biochim Biophys Acta*. 1975. 384(1): 58-68.
- [388] Stone KJ, Townsley BH. The effect of L-ascorbate on catecholamine biosynthesis. *Biochem J*. 1973. 131(3): 611-3.
- [389] Kema IP, de Vries EG, Muskiet FA. Clinical chemistry of serotonin and metabolites. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*. 2000. 747(1-2): 33-48.
- [390] Bismuth-Evenzal Y, Gonopolsky Y, Gurwitz D, Iancu I, Weizman A, Rehavi M. Decreased serotonin content and reduced agonist-induced aggregation in platelets of patients chronically medicated with SSRI drugs. *J Affect Disord*. 2012. 136(1-2): 99-103.
- [391] Jedlitschky G, Cattaneo M, Lubenow LE, et al. Role of MRP4 (ABCC4) in platelet adenine nucleotide-storage: evidence from patients with delta-storage pool deficiencies. *Am J Pathol*. 2010. 176(3): 1097-103.
- [392] Hiemke C, Hartter S. Pharmacokinetics of selective serotonin reuptake inhibitors. *Pharmacol Ther*. 2000. 85(1): 11-28.
- [393] Wong DT, Perry KW, Bymaster FP. Case history: the discovery of fluoxetine hydrochloride (Prozac). *Nat Rev Drug Discov*. 2005. 4(9): 764-74.
- [394] Jonnakuty C, Gragnoli C. What do we know about serotonin. *J Cell Physiol*. 2008. 217(2): 301-6.
- [395] Halperin D, Reber G. Influence of antidepressants on hemostasis. *Dialogues Clin Neurosci*. 2007. 9(1): 47-59.
- [396] de Abajo FJ, Montero D, Rodriguez LA, Madurga M. Antidepressants and risk of upper gastrointestinal bleeding. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2006. 98(3): 304-10.
- [397] Jaiswal P, Guhathakurta S, Singh AS, et al. SLC6A4 markers modulate platelet 5-HT level and specific behaviors of autism: a study from an Indian population. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2015. 56: 196-206.
- [398] Allain P. Sérotonine. *Sep. Sérotonine*.
- [399] Brand T, Anderson GM. The measurement of platelet-poor plasma serotonin: a systematic review of prior reports and recommendations for improved analysis. *Clin Chem*. 2011. 57(10): 1376-86.
- [400] Pussard E, Guigueno N, Adam O, Giudicelli JF. Validation of HPLC-amperometric detection to measure serotonin in plasma, platelets, whole blood, and urine. *Clin Chem*. 1996. 42(7): 1086-91.
- [401] Lee GS, Simpson C, Sun BH, et al. Measurement of plasma, serum, and platelet serotonin in individuals with high bone mass and mutations in LRP5. *J Bone Miner Res*. 2014. 29(4): 976-81.
- [402] Maurer-Spurej E, Dyker K, Gahl WA, Devine DV. A novel immunocytochemical assay for the detection of serotonin in

platelets. *Br J Haematol.* 2002. 116(3): 604-11.

[403] Garner SF. Flow cytometry and platelet analysis. In: society Rm, editor. *Infocus.* 29,2013.

[404] Dale GL, Friese P, Batar P, et al. Stimulated platelets use serotonin to enhance their retention of procoagulant proteins on the cell surface. *Nature.* 2002. 415(6868): 175-9.

[405] Lin OA, Karim ZA, Vemana HP, Espinosa EV, Khasawneh FT. The antidepressant 5-HT_{2A} receptor antagonists pizotifen and cyproheptadine inhibit serotonin-enhanced platelet function. *PLoS One.* 2014. 9(1): e87026.

[406] Flachaire E, Beney C, Berthier A, Salandre J, Quincy C, Renaud B. Determination of reference values for serotonin concentration in platelets of healthy newborns, children, adults, and elderly subjects by HPLC with electrochemical detection. *Clin Chem.* 1990. 36(12): 2117-20.

[407] Anderson GM, Hall LM, Yang JX, Cohen DJ. Platelet dense granule release reaction monitored by high-performance liquid chromatography-fluorometric determination of endogenous serotonin. *Anal Biochem.* 1992. 206(1): 64-7.

[408] Sa M, Ying L, Tang AG, Xiao LD, Ren YP. Simultaneous determination of tyrosine, tryptophan and 5-hydroxytryptamine in serum of MDD patients by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Clinica Chimica Acta.* 2012. 413(11-12):973-7.

[409] Yoshitake T, Kehr J, Todoroki K, Nohta H, Yamaguchi M. Derivatization chemistries for determination of serotonin, norepinephrine and dopamine in brain microdialysis samples by liquid chromatography with fluorescence detection. *Biomed Chromatography.* 2006. 20: 267-81.

[410] Fouassier M, Bourgerette E, Libert F, Pouplard C, Marques-Verdier A. Determination of serotonin release from platelets by HPLC and ELISA in the diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia: comparison with reference method by [³H]-serotonin release assay. *J Thromb Haemost.* 2006. 4(5): 1136-9.

[411] Mumford AD, Frelinger IAL, Gachet C, et al. A review of platelet secretion assays for the diagnosis of inherited platelet secretion disorders. *Thromb Haemost.* 2015. 114(20150416).

[412] Tekes K. HPLC determination of serotonin and its metabolites from human platelet-rich plasma; shift to 5-hydroxytryptophol formation following alcohol consumption. *J Chromatogr Sci.* 2008. 46(2): 169-73.

[413] Tsai TH, Tsai WJ, Chou CJ, Chen CF. Magnolol inhibits collagen-induced platelet serotonin release. *Thromb Res.* 1995. 78(3): 265-70.

Résumé pour le grand public

Les plaquettes sont les cellules principales de l'hémostase. Leur anomalie qualitative et/ou quantitative est à l'origine d'une diathèse hémorragique. Le diagnostic des anomalies plaquettaires nécessite des tests biologiques. L'objectif de notre travail a été d'améliorer leur diagnostic, en particulier, de développer de nouveaux outils d'exploration des granules denses plaquettaires.

Les pathologies plaquettaires héréditaires sont mal connues en Chine. Dans le cadre de notre collaboration Nancy /Wuhan nous avons publié un article en Chinois sur les thrombopénies héréditaires. Ensuite, nous avons évalué les performances du test à la mépacrine combiné à l'expression de CD63 par cytométrie en flux (CMF) pour le diagnostic de la pathologie des granules denses plaquettaires. De plus, notre étude montre que la carence de vitamine C pourrait être associée à une thrombopathie des granules denses. Enfin, nous avons développé une approche par CMF, puis par HPLC, pour la détection de sérotonine plaquettaire.

Mots clés : pathologies plaquettaires, pathologie des grains denses, maladie de pool vide delta, vitamine C, sérotonine plaquettaire, cytométrie en flux

Abstract

Platelets play an essential role in the hemostasis. Abnormalities in platelet number or platelet function may result in excessive bleeding. Diagnosis of platelet disorders requires platelet count and platelet function testing. Our work is aimed to improve the diagnosis of platelet disorders, especially to develop new approaches for testing the function of platelet dense granules.

Inherited platelet disorders are hardly recognized in China. Therefore we published an article in Chinese on the topic of hereditary thrombocytopenia in a Chinese clinical journal, within the framework of collaboration between Nancy and Wuhan. In addition, we evaluated the usefulness of flow cytometric mepacrine assay combined with CD63 expression in the diagnosis of dense granule disorder. Moreover, our work demonstrates that vitamin C deficiency might be associated with platelet dense granule disorder. Finally, we developed a method by flow cytometry and then by HPLC for detection of platelet serotonin.

Keywords: platelet disorders, dense granule disorder, vitamin C, platelet serotonin, flow cytometry