



HAL
open science

Maladie du pool vide delta plaquettaire : à propos de 11 cas diagnostiqués au CHU de Bordeaux

Fabien Selle

► **To cite this version:**

Fabien Selle. Maladie du pool vide delta plaquettaire : à propos de 11 cas diagnostiqués au CHU de Bordeaux. Médecine humaine et pathologie. 2015. dumas-01167233

HAL Id: dumas-01167233

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01167233>

Submitted on 24 Jun 2015

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.

Université de Bordeaux
UFR DES SCIENCES MEDICALES

Année 2015

N° 3029

Thèse pour l'obtention du
DIPLOME d'ETAT de DOCTEUR EN MEDECINE
Spécialité Biologie Médicale

Présentée et soutenue publiquement le 6 mai 2015 par
Fabien SELLE
Né le 15 mai 1983 à DAKAR

**Maladie du pool vide delta plaquettaire :
à propos de 11 cas
diagnostiqués au CHU de Bordeaux**

Directeur de thèse
Docteur Mathieu FIORE

Rapporteur
Madame le Professeur M-C. ALESSI

JURY

| | |
|-------------------------------------|-----------|
| Monsieur le Professeur F-X. MAHON | Président |
| Monsieur le Professeur J-F. VIALARD | Juge |
| Madame le Docteur C. JAMES | Juge |
| Madame le Docteur M. TUFFIGO | Juge |
| Monsieur le Docteur M. FIORE | Juge |

Remerciements

A nos juges

Monsieur le Professeur François-Xavier MAHON, Président du jury

Vous nous faites l'honneur de présider ce jury. Nous vous remercions pour votre disponibilité et votre jugement sur cette thèse. Soyez assuré de notre sincère reconnaissance et de notre profond respect.

Monsieur le Professeur Jean-François VIALARD, Membre du jury

Nous vous remercions d'avoir accepté de siéger à ce jury et de nous faire bénéficier de votre regard de clinicien sur ce travail. Veuillez recevoir le témoignage de notre gratitude et de notre haute considération.

Madame le Docteur Chloé JAMES, Membre du jury

Nous sommes honorés que vous ayez accepté de juger ce travail. Veuillez trouver ici l'expression de nos sincères remerciements et de notre considération distinguée.

Madame le Docteur Marie TUFFIGO, Membre du jury

Nous te remercions infiniment de t'être portée volontaire pour participer à ce jury ! Je suis très heureux que nos chemins se soient croisés à nouveau. Merci pour tes conseils et pour ton soutien logistique : sans ton bureau, qu'aurais-je pu faire ?

Monsieur le Docteur Mathieu FIORE, Directeur de thèse et membre du jury

Mathieu, je tiens à t'exprimer toute ma gratitude pour m'avoir soutenu et tant aidé à la réalisation de cette thèse. Ton expérience et la sérénité que tu dégages m'ont plusieurs fois apaisé dans les moments de stress ! Merci mille fois d'avoir dirigé et corrigé ce travail.

Madame le Professeur Marie-Christine ALESSI, Rapporteur

Vous nous avez fait l'honneur de lire et commenter cette thèse. Votre expertise dans ce domaine nous est précieuse. Soyez assurée de notre estime et de notre reconnaissance.

A tous ceux qui ont participé à ma formation, de près ou de loin

Merci aux chirurgiens de l'île de la Réunion et à leurs équipes : vous ne m'en avez pas voulu et m'avez même soutenu quand j'ai finalement choisi une toute autre spécialité que l'orthopédie.

Un grand merci également à toutes les équipes de biologie que j'ai eu la chance de rencontrer, pour votre contribution à mon développement professionnel ; et tout particulièrement aux biologistes et à l'équipe du laboratoire du Centre Hospitalier Gabriel Martin à la Réunion où j'ai passé un de mes semestres les plus formateurs et les plus agréables. Merci pour votre accueil.

Mes sincères remerciements au Docteur Christine Mouton : vous m'avez immédiatement aidé et orienté vers Mathieu pour cette thèse. J'ai « parfois » été lent, mais j'en suis venu à bout !

Enfin, merci à Xavier Pillois : pour votre participation statistique sur cette thèse, un travail de l'ombre qui nécessite des compétences qui ne sont pas données à tout le monde.

A la famille et aux amis

A mes parents évidemment, sans qui je n'en serais pas là. Ni nulle part ailleurs, d'ailleurs... *Maman*, pour ton amour inconditionnel, ton soutien permanent, et ton aide de **tous** les instants. Tu te feras peut-être un peu moins de mauvais sang maintenant ! *Papa*, pour l'attention et l'affection que tu as toujours pour ton pitchoune malgré la distance !

A mes frères : le grand, je te bénis de m'avoir mis le pied à l'étrier. Je sais pouvoir toujours compter sur toi, ça m'est infiniment précieux. Grand et petit, pour le plaisir d'être ensemble même si ce n'est pas assez souvent. Seb, j'ai hâte que tu puisses m'envoyer en l'air !

A Mamie Toinette : tu me manques mais ta gentillesse infinie et ton humour resteront toujours pour égayer la vie !

A tous mes cousins et cousines : pardonnez-moi de ne pas tous vous citer ! Spécial big-up tout de même à Tonio, Fifi, Fanou et Benji, pour tout ce bon temps qu'on a passé ensemble à certains moments de nos vies.

A mes oncles et tantes : et notamment à toi, marraine, pour ta sagesse et ta gentillesse.

A toute ma deuxième famille, la belle : pour votre accueil chaleureux et votre gentillesse.

A Zaz – Trist – Tim : vous vous serez bien fichus de moi question boulot ! Je vous avais dit que je le (gaf)ferai ! Vous représentez pour moi tout ce que l'amitié a de meilleur. Merci les poulets...

Gros Nono : la gentillesse est LA force ; et tu es notre maître Jedi ! *Laura*, je sais que tu en prendras toujours soin.

A tous les autres amis : du lycée, de la fac et de l'internat, de la Réunion, etc. Je suis toujours aussi ingrat et ne prends donc pas le soin de tous vous citer. Mais soyez assurés que ne pas donner de nouvelles n'est pas du tout synonyme d'oublier ! Loin s'en faut...

A Brigitte :

A ces années de bonheur déjà vécues ensemble, mais surtout ces nombreuses et joyeuses années en famille à venir !

Merci est un euphémisme pour tout l'amour et la tendresse que tu me témoignes au quotidien. Merci pour le courage que tu me donnes. Et sans toi, comment m'organiserais-je ?

A Adrien :

Je savais que tu me rendrais gâteaux... mais à ce point là ?! Le monde était déjà beau mais depuis que tu es là, c'est un émerveillement quotidien de te voir apprendre et grandir et jouer et sourire et rire et tout et tout...

Liste des abréviations

| | |
|-----------|---|
| ADP | Adénosine-Di-Phosphate |
| ATP | Adénosine-Tri-Phosphate |
| Delta-SPD | maladie du pool vide delta plaquettaire (Delta-Storage Pool Disease) |
| GP | Glycoprotéine |
| HPS | Syndrome de Hermansky-Pudlak |
| ISTH | Société Internationale d'Hémostase et Thrombose (International Society of Thrombosis and Haemostasis) |
| LMC | Leucémie Myéloïde Chronique |
| MFI | Intensité Moyenne de Fluorescence (Mean Fluorescence Intensity) |
| PPP | Plasma Pauvre en Plaquettes |
| PRP | Plasma Riche en Plaquettes |
| SPD | maladie du pool vide (Storage Pool Disease) |
| SMD | Syndrome Myélodysplasique |
| SMP | Syndrome Myéloprolifératif |
| TO | Temps d'Occlusion |
| VMP | Volume Moyen Plaquettaire |
| VWF | facteur Willebrand (Von Willebrand Factor) |

Table des matières

| | |
|--|-----------|
| REMERCIEMENTS..... | 3 |
| LISTE DES ABREVIATIONS..... | 7 |
| TABLE DES MATIERES | 8 |
| 1 INTRODUCTION..... | 11 |
| 1.1 PHYSIOLOGIE PLAQUETTAIRE..... | 11 |
| 1.1.1 <i>Généralités</i> | 11 |
| 1.1.2 <i>Membrane plaquettaire et glycoprotéines</i> | 12 |
| 1.1.2.1 Récepteurs GPIb-IX-V, GPIa-IIa et GPVI..... | 12 |
| 1.1.2.2 Intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ | 12 |
| 1.1.2.3 Autres récepteurs | 13 |
| 1.1.3 <i>Cytosquelette plaquettaire</i> | 13 |
| 1.1.4 <i>Les granules intraplaquettaires</i> | 13 |
| 1.2 PLAQUETTES ET HEMOSTASE PRIMAIRE..... | 14 |
| 1.2.1 <i>Adhésion et étalement</i> | 14 |
| 1.2.2 <i>Activation et sécrétion</i> | 14 |
| 1.2.3 <i>Agrégation plaquettaire</i> | 15 |
| 1.3 PARTICULARITES DU CONTINGENT DES GRANULES INTRAPLAQUETTAIRES..... | 15 |
| 1.3.1 <i>Granules α</i> | 15 |
| 1.3.2 <i>Granules denses</i> | 16 |
| 1.3.3 <i>Lysosomes</i> | 17 |
| 1.4 MALADIES DU POOL VIDE PLAQUETTAIRE | 17 |
| 1.4.1 <i>Syndrome des plaquettes grises</i> | 18 |
| 1.4.2 <i>Maladie du pool vide delta</i> | 18 |
| 1.4.2.1 Formes constitutionnelles..... | 19 |
| 1.4.2.1.1 Forme isolée | 19 |
| 1.4.2.1.2 Formes syndromiques | 19 |
| 1.4.2.2 Formes acquises | 20 |
| 1.4.3 <i>Défaut de sécrétion des granules denses</i> | 21 |
| 1.5 EXPRESSION CLINIQUE DES MALADIES DU POOL VIDE DELTA PLAQUETTAIRE | 21 |
| 1.5.1 <i>Syndrome hémorragique</i> | 21 |
| 1.5.2 <i>Signes cliniques associés</i> | 22 |
| 1.6 DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE DES MALADIES DU POOL VIDE DELTA PLAQUETTAIRE | 22 |
| 1.6.1 <i>Dépistage et exclusion des diagnostics différentiels</i> | 22 |
| 1.6.1.1 Numération sanguine et bilan de coagulation | 22 |

| | | |
|--------------|---|-----------|
| 1.6.1.2 | Platelet Function Analyser (PFA) et exploration du facteur Willebrand | 23 |
| 1.6.1.3 | Test d'agrégation plaquettaire sur plasma enrichi en plaquettes (PRP) | 24 |
| 1.6.2 | Explorations plaquettaires spécialisées..... | 26 |
| 1.6.2.1 | Éliminer un défaut d'activation plaquettaire..... | 26 |
| 1.6.2.2 | Exploration des granules α par microscopie électronique..... | 26 |
| 1.6.2.3 | Exploration des granules denses | 27 |
| 1.6.2.3.1 | Mesure de la sécrétion plaquettaire d'ATP..... | 27 |
| 1.6.2.3.2 | Capture et sécrétion de mépacrine..... | 28 |
| 1.6.2.3.3 | Expression du CD63..... | 29 |
| 1.6.2.3.4 | Mesure des constituants des granules denses..... | 29 |
| 1.6.2.3.5 | Quantification des granules denses par microscopie électronique (whole mounts)..... | 29 |
| 1.6.2.3.6 | Principaux résultats attendus selon le type d'anomalies | 30 |
| 1.7 | PRISE EN CHARGE THERAPEUTIQUE | 31 |
| 1.8 | PROBLEMATIQUE DE LA MALADIE DU POOL VIDE DELTA PLAQUETTAIRE | 32 |
| 1.9 | OBJECTIFS DU TRAVAIL..... | 32 |
| 2 | MATERIELS ET METHODES..... | 33 |
| 2.1 | CRITERES D'INCLUSION | 33 |
| 2.2 | RECUEIL DES DONNEES CLINIQUES | 33 |
| 2.3 | RECUEIL DES DONNEES BIOLOGIQUES..... | 34 |
| 2.3.1 | <i>Numération sanguine</i> | <i>34</i> |
| 2.3.2 | <i>Tests de coagulation standard et exploration du facteur de Willebrand.....</i> | <i>34</i> |
| 2.3.3 | <i>Mesure du temps d'occlusion en condition de flux (PFA-100)</i> | <i>35</i> |
| 2.3.4 | <i>Test d'agrégation plaquettaire sur plasma enrichi en plaquettes</i> | <i>36</i> |
| 2.3.5 | <i>Etude de l'expression des principales glycoprotéines plaquettaires</i> | <i>37</i> |
| 2.3.6 | <i>Mesure de la sécrétion plaquettaire d'ATP.....</i> | <i>39</i> |
| 2.3.7 | <i>Etude de l'expression du CD63 après activation.....</i> | <i>39</i> |
| 2.3.8 | <i>Mesure de la capture et de la sécrétion de mépacrine</i> | <i>40</i> |
| 2.3.9 | <i>Etude par microscopie électronique</i> | <i>42</i> |
| 2.3.9.1 | Quantification des granules denses : technique des whole mounts..... | 42 |
| 2.3.9.2 | Quantification des granules alpha et morphométrie plaquettaire | 43 |
| 2.4 | STATISTIQUES..... | 44 |
| 3 | RESULTATS..... | 45 |
| | DONNEES CLINIQUES | 45 |
| 3.1 | GENERALITES | 45 |
| 3.2 | CARACTERISTIQUES DU SYNDROME HEMORRAGIQUE..... | 45 |
| 3.3 | ÉTIOLOGIES | 47 |
| | DONNEES BIOLOGIQUES..... | 48 |
| 3.4 | NUMERATION SANGUINE | 48 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 3.5 | TESTS DE COAGULATION STANDARD ET MESURE DU TEMPS D'OCCLUSION EN CONDITION DE FLUX (PFA-100)..... | 49 |
| 3.6 | TESTS D'AGREGATION PLAQUETTAIRE | 50 |
| 3.7 | EXPLORATIONS PLAQUETTAIRES SPECIALISEES | 53 |
| 3.7.1 | <i>Mesure de l'expression des principales glycoprotéines plaquettaires.....</i> | <i>53</i> |
| 3.7.2 | <i>Exploration par microscopie électronique.....</i> | <i>54</i> |
| 3.7.2.1 | Quantification des granules α | 55 |
| 3.7.2.2 | Morphométrie plaquettaire..... | 56 |
| 3.7.3 | <i>Exploration des granules denses plaquettaires.....</i> | <i>58</i> |
| 3.7.3.1 | Mesure de la sécrétion d'ATP plaquettaire..... | 58 |
| 3.7.3.2 | Mesure de la capture et de la sécrétion de mépacrine..... | 58 |
| 3.7.3.3 | Etude de l'expression du CD63 | 60 |
| 3.7.3.4 | Quantification des granules denses par la technique des whole mounts | 62 |
| 3.7.3.5 | Synthèse des résultats des examens d'exploration des granules denses | 63 |
| 3.7.3.6 | Corrélation entre le type de déficit et le syndrome hémorragique | 65 |
| 4 | DISCUSSION | 66 |
| 4.1 | SYNDROME HEMORRAGIQUE | 66 |
| 4.2 | ÉTIOLOGIES | 67 |
| 4.3 | PROFILS DES TESTS D'AGREGATION PLAQUETTAIRE DANS LA MALADIE DU POOL VIDE DELTA PLAQUETTAIRE..... | 69 |
| 4.4 | EXPRESSION DES PRINCIPALES GLYCOPROTEINES MEMBRANAIRES DANS LA MALADIE DU POOL VIDE DELTA PLAQUETTAIRE | 70 |
| 4.5 | MEGACARYOCYTOPOÏESE ET DEFICIT EN GRANULES DENSES | 71 |
| 4.6 | LES DIFFERENTES FORMES DE DELTA-SPD | 72 |
| | CONCLUSION | 75 |
| | BIBLIOGRAPHIE..... | 77 |

1 Introduction

L'hémostase représente l'ensemble des mécanismes assurant l'arrêt des saignements en cas de rupture de la continuité de la paroi vasculaire. Elle assure la formation locale d'un caillot puis sa dissolution.

La fonction hémostatique nécessite la présence et l'interaction des plaquettes avec l'ensemble du système sous-endothélial et les protéines de la coagulation.

La phase plaquettaire participe essentiellement à l'hémostase primaire plutôt qu'à la phase de coagulation ; ces deux phases ont cependant des liens étroits.

Les dysfonctions des plaquettes peuvent empêcher ou retarder la formation du clou plaquettaire et ainsi bloquer ou limiter l'hémostase, provoquant des hémorragies. Il en est ainsi de la **maladie du pool vide delta plaquettaire**, une thrombopathie rare dont cette étude propose de rapporter une série de cas diagnostiqués au CHU de Bordeaux.

1.1 Physiologie plaquettaire

1.1.1 Généralités

Les plaquettes sont des cellules anucléées provenant de la segmentation du cytoplasme des mégacaryocytes. Le nombre de plaquettes circulantes chez l'adulte varie entre 150 et 400 G/L. Leur durée de vie est de 8 à 10 jours.

Au repos, elles sont de forme discoïde avec un diamètre de 2 à 4 µm et un volume moyen de 7 à 10 fL (1).

Figure 1 : Représentation schématique de l'ultrastructure d'une plaquette à l'état basal (2)

EC : membrane externe ; **OCS** : système canaliculaire ouvert ; **MT** : réseau circonférentiel de microtubules ; **DTS** : système tubulaire dense ; **Gly** : grains de glycogène ; **M** : mitochondrie ; **G** : granule α ; **DB** : granule dense

1.1.2 Membrane plaquettaire et glycoprotéines

La membrane plaquettaire est constituée d'une double couche lipidique qui s'invagine en de multiples canaux ouverts sur l'extérieur. Ce système canaliculaire ouvert augmente ainsi la surface d'excrétion du contenu plaquettaire.

La composition de la membrane plaquettaire en glycoprotéines dépend de l'état d'activation des plaquettes. En effet, au cours de l'activation, il y a fusion de la membrane des granules avec celle du système canaliculaire et diffusion à la membrane plasmique de protéines intraplaquettaires (3).

L'adhésion des plaquettes aux structures de la matrice extracellulaire, l'agrégation et l'activation plaquettaire sont médiées par des récepteurs glycoprotéiques spécifiques (figure 2).

1.1.2.1 Récepteurs GPIb-IX-V, GPIa-IIa et GPVI

La glycoprotéine GPIb-IX-V est le principal récepteur du facteur Willebrand (VWF) sous endothélial. La GPIa-IIa et GPVI sont des récepteurs pour le collagène exposé lors d'une brèche vasculaire. Ces glycoprotéines initient donc l'adhésion au sous-endothélium. Elles jouent aussi un rôle dans l'activation de la plaquette dès lors qu'elles sont liées à leur ligand, en induisant des voies d'activation intracellulaires (3).

1.1.2.2 Intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$

Il s'agit du complexe glycoprotéique majeure de la membrane plaquettaire. Ce complexe constitue le récepteur plaquettaire pour le fibrinogène. Il permet d'établir des ponts entre les plaquettes recrutées (1) provoquant ainsi l'agrégation. Il existe des complexes $\alpha_{IIb}\beta_3$ dans la membrane des granules α . Ils sont exposés à la surface suite à l'activation plaquettaire (3). La capacité de liaison de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ au fibrinogène n'est présente qu'après un changement conformationnel provoqué par l'activation de la plaquette (4).

1.1.2.3 Autres récepteurs

De nombreux récepteurs intégrés à la membrane plaquettaire peuvent se lier à différents inducteurs. Lors de la liaison à leur ligand, ils activent des voies intracellulaires aboutissant à l'activation de la plaquette (libération du calcium dans le cytosol, activation de kinase, etc).

Figure 2 : Représentation schématique des principaux ligands et récepteurs de la phase d'adhésion et de l'initiation de l'activation plaquettaire (4)

1.1.3 Cytosquelette plaquettaire

Un anneau circonférentiel de microtubules présent à la périphérie de la plaquette, est chargé de maintenir la forme discoïde des plaquettes non stimulées. Le cytosquelette est par ailleurs composé essentiellement de filaments cytoplasmiques d'actine auxquels se lient de nombreuses autres protéines (vinculine, Actin Binding Protein, etc). Au cours de l'activation plaquettaire, il y a redistribution des protéines du cytosquelette et réorganisation des filaments d'actine. Ces modifications induisent le changement de forme de la plaquette, permettent son étalement et l'émission de pseudopodes, et déplacent les granules et les fusionnent à la membrane (3).

1.1.4 Les granules intraplaquettaires

Le cytoplasme est riche en granules qui seront excrétés lors de l'activation des plaquettes (5) (cf chapitre 1.3) :

- **des granules α** , contenant près de 300 protéines différentes,
- **des granules denses ou delta**, riches en ATP et ADP notamment,
- **des lysosomes**, réservoir d'hydrolases.

1.2 Plaquettes et hémostasie primaire

En réponse à une lésion vasculaire, les plaquettes réagissent par une succession de phénomènes biochimiques rapides et de modifications cellulaires permettant in fine la formation d'un thrombus plaquettaire. L'interaction plaquettes-vaisseau comporte une phase d'adhésion et d'étalement, suivie d'une phase d'activation et de sécrétion qui s'accompagne enfin d'une phase d'agrégation. Ces phases ne sont pas strictement séparées dans le temps les unes des autres (figure 3).

Figure 3 : Représentation schématique des phases d'adhésion, d'activation-sécrétion et d'agrégation (3)

1.2.1 Adhésion et étalement

Une brèche vasculaire mettant à nu le sous-endothélium, expose les fibres de collagène et le VWF. Les récepteurs plaquettaires GPVI et GPIa-IIa interagissent avec le collagène et initient l'adhésion au sous-endothélium et l'activation plaquettaire. De même, le VWF sous-endothélial se lie à la GPIb-IX-V. Cette adhésion de la plaquette provoque son activation, induit des changements de forme et la sécrétion des granules.

1.2.2 Activation et sécrétion

Après adhésion, les plaquettes sont donc activées par de nombreux facteurs : le collagène sous-endothélial mais aussi la thrombine générée à leur surface, l'ADP du milieu et l'ADP sécrété, le thromboxane A₂... Les voies d'activation aboutissent à une augmentation de la concentration cytoplasmique de calcium induisant des phosphorylations ou déphosphorylations qui régulent les modifications structurales et l'activation des plaquettes.

La polymérisation des filaments d'actine et la contraction des microtubules induisent le passage de la forme discoïde à la forme sphérique, l'émission de

pseudopodes et la fusion des granules avec la membrane et le système canaliculaire ouvert.

Cette sécrétion de nombreux activateurs plaquettaires contenus dans les granules (ADP, sérotonine, etc.) améliore le recrutement des plaquettes circulantes qui augmentent ainsi la taille du clou plaquettaire.

1.2.3 Agrégation plaquettaire

L'activation plaquettaire entraîne un changement conformationnel de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ qui fixe alors le fibrinogène. L'abondance du fibrinogène circulant va permettre de former un réseau de plaquettes agrégées. Les plaquettes sont ainsi reliées entre elles par de nombreux ponts « $\alpha_{IIb}\beta_3$ – fibrinogène – $\alpha_{IIb}\beta_3$ ». Ainsi liées les unes aux autres, les plaquettes forment un clou plaquettaire comblant la brèche vasculaire.

1.3 Particularités du contingent des granules intraplaquettaires

Les granules constituent le principal réservoir intracellulaire de protéines destinées à être libérées au cours de l'hémostase primaire. Ce sont des structures sphériques ou allongées, délimitées par une membrane et sécrétées après activation plaquettaire.

1.3.1 Granules α

Les granules α sont présents en grand nombre, de 20 à 200 par plaquette. Leur contenu est composé de plus de 300 protéines différentes (tableau 1). Celles-ci sont synthétisées par le mégacaryocyte, ou bien captées par endocytose depuis le plasma. On retrouve de nombreuses molécules ayant un rôle important tant dans l'agrégation des plaquettes que la coagulation ou même l'inflammation et la réparation tissulaire (6).

Lors de l'activation, les granules α fusionnent en de larges vacuoles qui libèrent leur contenu par le système canaliculaire ouvert à l'extérieur de la cellule. La membrane des granules α contient entre autres deux principales protéines :

- l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ (qui n'est pas spécifique des granules α),
- et la P-sélectine (GMP140) (7).

Il apparaît de plus en plus que la population de granules α est hétérogène, avec des sous-populations dont le contenu protéique n'est pas identique. La sécrétion de l'une ou l'autre des populations de granules α en fonction de la stimulation, qui induirait des conséquences différentes (action angiogénique ou anti-angiogénique par exemple) reste à démontrer (8).

1.3.2 Granules denses

Les granules denses dérivent de l'appareil de Golgi durant la maturation des mégacaryocytes (9). Ils sont nettement moins nombreux que les granules α , environ de 2 à 10 par cellule. Leur diamètre est de 100 à 300 nm. A la différence des granules α , leur contenu est fait essentiellement de petites molécules (tableau 1).

Après activation plaquettaire, les granules denses fusionnent directement avec la membrane par l'intermédiaire de protéines de type SNARE (Soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein attachment protein receptor), telles que SNAP-23 (soluble NSF-attachment protein) (10), VAMP-3 (Vesicle Associated Membrane Protein) et VAMP-8 (11). Cette fusion entraîne la libération de leur contenu.

L'ADP est l'un des principaux activateurs plaquettaires libérés par les granules denses. Il agit via les récepteurs P_2Y_{12} et P_2Y_1 (6).

La membrane des granules denses intègre entre autres le CD63 (ou granulophysine). Celui-ci n'est pas exprimé à la surface des plaquettes non activées (12). Il peut donc servir de marqueur spécifique de la fusion des granules denses avec la membrane après activation plaquettaire.

1.3.3 Lysosomes

Les lysosomes sont le troisième contingent granulaire intraplaquettaire. Ils contiennent essentiellement des hydrolases, enzymes destinées au remodelage du caillot après sécrétion (13).

Tableau 1 : Principales molécules des différents granules (5)

| Organites | Contenu |
|---|---|
| Granules α (riches en protéines) | β -thromboglobuline, VWF, Facteur V, Fibrinogène, PF4, PDGF, TGF- β , thrombospondine, etc. |
| Granules denses (ou delta) | ADP, ATP, Sérotonine, Ca ²⁺ , Pyrophosphate, Mg, Histamine, etc. |
| Lysosomes (riches en hydrolases) | Cathepsine G, Collagénase, Phosphatases acides, Hexosaminidases, etc. |

1.4 Maladies du pool vide plaquettaire

Les déficits en granules α ou en granules denses font partie des maladies du pool vide plaquettaire ou SPD (Storage Pool Diseases). Ces déficits rares représentent en fait un groupe hétérogène de maladies, d'étiologies variées, aussi bien congénitales qu'acquises.

Les SPD peuvent être classées selon le type de granules atteints (14):

- Maladie du pool vide α (α -SPD) ou syndrome des plaquettes grises : déficit en granules α ,
- Maladie du pool vide delta ou delta-SPD : déficit isolé en granules denses,
- Déficit combiné en granules, ou $\alpha\delta$ -SPD : association des deux déficits.

Les SPD sont généralement à l'origine de symptômes hémorragiques d'intensité faible à modérée, mais pouvant être sévères dans certains cas (14).

1.4.1 Syndrome des plaquettes grises

Il s'agit d'une maladie de transmission autosomique récessive ou dominante selon les cas, témoignant d'une hétérogénéité des causes génétiques possibles (15,16).

Les plaquettes sont déficitaires en granules α ou en leur contenu. Il y a généralement une thrombopénie modérée avec des plaquettes de taille augmentée. L' α -SPD peut se compliquer d'une myélofibrose au cours de la vie (14).

De récentes découvertes ont permis d'identifier certains gènes à l'origine d'un syndrome des plaquettes grises. Plusieurs mutations du gène *NBEAL2* codant pour la protéine Neurobeachin-like 2 ont été associées à un déficit en granules α (17). Cette protéine est impliquée dans la gestion de la circulation vésiculaire. Cependant, tous les déficits en granules α ne sont pas associés à une atteinte de ce gène (18). D'autres - tels que *VPS16B* et *VPS33B* aussi impliqués dans la circulation vésiculaire permettant la formation des granules α (8), ou *GFI1B* codant pour un facteur de transcription (19) - provoquent aussi des déficits en granules α .

1.4.2 Maladie du pool vide delta

La diminution de la libération des constituants des granules denses à l'origine des hémorragies dans la delta-SPD peut être due à un déficit :

- de nature quantitative se traduisant par une diminution du nombre de granules denses,
- ou de nature qualitative menant à un nombre normal de granules denses dont le contenu est anormal (5).

De nombreuses étiologies peuvent en être responsables.

1.4.2.1 Formes constitutionnelles

1.4.2.1.1 Forme isolée

La maladie du pool vide delta plaquettaire peut se présenter sous une forme totalement isolée (20). Il n'y a alors pas d'autre pathologie associée et la maladie ne s'exprime que sous la forme d'une atteinte plaquettaire.

1.4.2.1.2 Formes syndromiques

Parmi les pathologies héréditaires associées à la maladie du pool vide delta, le syndrome de Hermansky-Pudlak (HPS) est le plus fréquemment décrit. Les patients sont atteints d'albinisme oculocutané et d'un nystagmus congénital ; ils présentent des saignements, généralement modérés, tout au long de leur vie.

Le HPS constitue en fait un ensemble de maladies génétiques provoquant des anomalies de formation ou de circulation des vésicules intracellulaires. Au moins 8 gènes différents à l'origine de cette maladie (HPS1-HPS8) ont été découverts chez l'homme (21).

De même, dans la maladie de Chediak-Higashi (albinisme partiel, immunodéficience, atteintes neurologiques), des mutations ont été identifiées comme responsables de la maladie. Celles-ci touchent le gène *LYST* codant pour un régulateur de circulation lysosomale (22). On retrouve donc aussi une anomalie des granules denses associée.

Enfin, dans le syndrome de Griscelli, on retrouve de nouveau des atteintes de gènes en rapport avec la gestion de la circulation des vésicules (*MYO5A*, *Rab27a* et *MLPH*).

Dans ces trois cas, la transmission est autosomique récessive. La numération plaquettaire est généralement normale et le nombre de granules denses est diminué.

Il a aussi été décrit de rares cas de delta-SPD à transmission autosomique dominante. Une atteinte du gène *MRP4* produisant la protéine ABCC4 (ATP-binding cassette, sub-family C, member 4 protein) impliquée dans le transport d'ATP est probablement à l'origine d'une anomalie de stockage de ces nucléotides dans les

granules denses (23). Ces patients présentaient une delta-SPD avec un déficit de type qualitatif.

1.4.2.2 Formes acquises

Ces delta-SPD sont principalement observées au cours d'hémopathies malignes, telles que des syndromes myéloprolifératifs, des leucémies aiguës ou des syndromes myélodysplasiques (24,25). Mais elles sont aussi parfois associées à diverses situations telles que la polyarthrite rhumatoïde, le lupus érythémateux systémique, la greffe de moelle allogénique, une valvulopathie, une insuffisance rénale chronique terminale, un purpura thrombopénique immunologique, etc. (5).

Cependant, les mécanismes sous-jacents à l'acquisition d'une delta-SPD en association avec ces hémopathies ou les autres pathologies n'ont pas encore été bien compris. En effet, quelques études décrivent les dysfonctions plaquettaires présentes chez des patients présentant des hémopathies, notamment des patients myélodysplasiques. Mais à part quelques cas rapportés, aucune étude ne se penche spécifiquement sur une recherche de delta-SPD.

Une étude sur 48 patients myélodysplasiques sans thrombopénie importante (plaquettes > 80 G/L) montrait que 73% d'entre eux avaient une sécrétion plaquettaire d'ATP diminuée. Ils présentaient majoritairement (25/35) des saignements malgré l'absence de thrombopénie chez certains (26).

Une méta-analyse portant sur 68 patients atteints de myélodysplasies montrait un profil d'agrégation anormal chez 75% d'entre eux. L'atteinte portait plus particulièrement sur la réponse à l'acide arachidonique (54%), l'ADP (46%), et le collagène (43%). La ristocétine était bien moins souvent touchée (22%). Ces profils évoquent le profil attendu chez les patients ayant une delta-SPD (27)(28) comme on le verra par la suite.

Enfin, on retrouve quelques études de cas montrant par exemple une delta-SPD chez un patient avec une anémie sidéroblastique héréditaire (29), ou encore un cas de myélofibrose idiopathique (30).

Pour ce qui est de l'association aux pathologies autres que les hémopathies, il semble y avoir quelquefois un contexte dysimmunitaire. On a en effet évoqué

précédemment des connectivites (polyarthrite rhumatoïde, lupus érythémateux), un PTI, une greffe de moelle allogénique... (5). Une étude portant sur 5 patients (31) allait dans ce sens. Deux d'entre eux avaient un lupus érythémateux et un autre un PTI. Tous présentaient un profil d'agrégation anormal ainsi qu'un déficit en ATP, ADP et sérotonine. Tous avaient une augmentation du niveau d'IgG associées aux plaquettes.

1.4.3 Défaut de sécrétion des granules denses

Il faut noter l'existence de pathologies très similaires aux delta-SPD où le nombre et le contenu des granules denses sont normaux mais ils ne sont pas sécrétés suite à l'activation plaquettaire. Ces cas ne seront pas abordés ici car il s'agit alors d'une anomalie de sécrétion et non pas d'une maladie du pool vide delta plaquettaire.

1.5 Expression clinique des maladies du pool vide delta plaquettaire

1.5.1 Syndrome hémorragique

Généralement, les symptômes hémorragiques associés aux delta-SPD sont faibles ou modérés. Il s'agit d'atteintes classiquement associées aux thrombopathies : ecchymoses, saignements des muqueuses (épistaxis, gingivorragies, ménorragies), saignements excessifs lors de d'un accouchement, d'une extraction dentaire ou d'une opération chirurgicale (32).

Le diagnostic peut donc ne pas être posé face aux symptômes peu importants et conduire à une sous-estimation de la prévalence de la maladie dans la population. Cependant, il arrive que les hémorragies soient sévères, pouvant même mener au décès du patient.

La diversité de la sévérité des hémorragies reflète certainement :

- la variété des déficits, tant en ce qui concerne leurs types que leurs importances,

- mais encore la diversité des pathologies associées, qu'elles soient congénitales ou acquises.

1.5.2 Signes cliniques associés

En dehors des hémorragies, les signes cliniques associés sont ceux de la pathologie éventuellement associée.

Pour les étiologies congénitales, on retrouve par exemple :

- un albinisme oculocutané et un nystagmus chez les patients atteints de HPS,
- une hypopigmentation, un déficit immunitaire et des atteintes neurologiques dans le syndrome de Chediak-Higashi (6).

De même, dans les pathologies acquises, la forme clinique sera celle de la pathologie associée - qu'il s'agisse d'une hémopathie ou d'un lupus érythémateux - potentiellement accompagnée de symptômes hémorragiques dus ou aggravés par la delta-SPD.

1.6 Diagnostic biologique des maladies du pool vide delta plaquettaire

1.6.1 Dépistage et exclusion des diagnostics différentiels

Il s'agit de confirmer une anomalie de l'hémostase primaire à l'aide d'un test d'agrégation plaquettaire après avoir éliminé d'autres étiologies aux saignements à l'aide des examens suivants :

- numération sanguine,
- bilan de coagulation standard,
- PFA et dosages du VWF et du facteur VIII.

1.6.1.1 Numération sanguine et bilan de coagulation

La numération, outre l'évaluation d'une éventuelle anémie, doit permettre d'éliminer d'autres causes de saignement, à commencer par une thrombopénie profonde.

L'aspect des plaquettes au frottis peut aussi orienter vers une thrombopathie. Par exemple dans un syndrome des plaquettes grises, on observe des plaquettes dégranulées (figure 4).

Le bilan de coagulation doit permettre d'éliminer tout déficit en facteurs de la coagulation.

Figure 4 : Frottis sanguin – Aspect dégranulé des plaquettes d'un syndrome des plaquettes grises

En dehors d'éventuels troubles associés à d'autres pathologies, il n'y a généralement pas d'anomalies répertoriées de la numération sanguine (14) ou des tests de la coagulation dans les delta-SPD.

Cependant, des étiologies hématologiques sont fréquemment associées aux delta-SPD (5) et peuvent être source d'anémies ou thrombopénies chez ces patients.

De même, les examens de coagulation standard (TP, TCA, fibrinogène), peuvent être perturbés en cas d'hémorragies importantes avec consommation des facteurs.

1.6.1.2 Platelet Function Analyser (PFA) et exploration du facteur Willebrand

Le PFA est utilisé pour le dépistage des troubles de l'hémostase primaire et plus particulièrement les anomalies du facteur Willebrand. Il est plus sensible, spécifique et reproductible que le temps de saignement.

Les systèmes PFA simulent in vitro les conditions hémodynamiques de l'adhésion et de l'agrégation plaquettaire suite à une lésion vasculaire. Il assure ainsi une détection simple et rapide d'un dysfonctionnement de l'hémostase primaire congénital, héréditaire ou acquis dans de multiples contextes cliniques.

L'échantillon est aspiré à travers une membrane percée, exposant ainsi les plaquettes à des forces de cisaillement élevées. La membrane est recouverte de collagène ainsi que d'un autre agoniste : épinéphrine ou ADP. Au cours du test les plaquettes adhèrent à la membrane, entraînant une réduction du flux jusqu'à son arrêt total. Les systèmes PFA déterminent ainsi le « temps d'occlusion » : TO.

Le PFA est surtout sensible aux anomalies du Willebrand et permet en cas de normalité d'éliminer de façon quasi certaine une maladie de Willebrand (33). S'il est anormal, les dosages du facteur VIII et de l'activité du VWF permettent alors d'éliminer ou confirmer ce diagnostic.

Il existe peu de données sur les performances du PFA-100 dans la maladie du pool vide delta plaquettaire. Cependant, il a été décrit que les patients ayant une delta-SPD associée au syndrome de Hermansky-Pudlak ont un TO le plus souvent normal ou subnormal avec la cartouche collagène/ADP et allongé avec la cartouche collagène/épinéphrine (34) (35). Deux autres études ne déterminant pas le type de déficit du pool (alpha ou delta) font état de 4 patients sur 5 ayant un TO allongé avec les 2 cartouches (36).

1.6.1.3 Test d'agrégation plaquettaire sur plasma enrichi en plaquettes (PRP)

Si les résultats des examens précédents sont en faveur d'une anomalie de l'hémostase primaire autre qu'une anomalie du facteur Willebrand, alors les analyses doivent se poursuivre afin d'éliminer une thrombopathie, notamment par le test de référence : le test d'agrégation plaquettaire sur PRP.

Le test d'agrégation plaquettaire en PRP mesure la capacité des plaquettes à s'agréger entre elles sous l'effet d'un agoniste. Le principe de cette technique, décrite pour la première fois dans des années 1960 par Born et O'Brian (37,38), repose sur la turbidimétrie.

Les plaquettes en suspension donnent une opacité du milieu. Lorsqu'elles s'agrègent, les rayons lumineux traversent plus facilement le plasma. La mesure de la différence de densité optique entre l'échantillon non agrégé à l'état basal et l'échantillon agrégé en présence d'un agoniste permet d'évaluer ce phénomène (figure 5).

Différents inducteurs de l'agrégation plaquettaire sont utilisés afin de tester les voies d'activation et orienter le diagnostic.

Un profil d'agrégation plaquettaire anormal mais non spécifique d'une voie d'activation orientera vers deux hypothèses principales : une anomalie complexe de la signalisation plaquettaire ou une anomalie des granules.

Lors d'un déficit du pool delta plaquettaire, il est généralement décrit une diminution de l'agrégation plaquettaire portant plus spécifiquement sur l'acide arachidonique, le collagène et l'ADP (figure 6). L'agrégation en réponse à l'ADP est diminuée, de même qu'à l'épinéphrine, et elle est réversible car il n'y a pas la seconde vague d'agrégation due au relargage du contenu des granules denses (6). L'agrégation à la ristocétine n'est en revanche peu ou pas touchée (5)(6).

Un des diagnostics différentiels sur le profil des tests d'agrégation plaquettaire est la prise d'aspirine (5). Il convient d'éliminer à l'interrogatoire toute prise de ce médicament chez les patients testés avant d'interpréter ces tests.

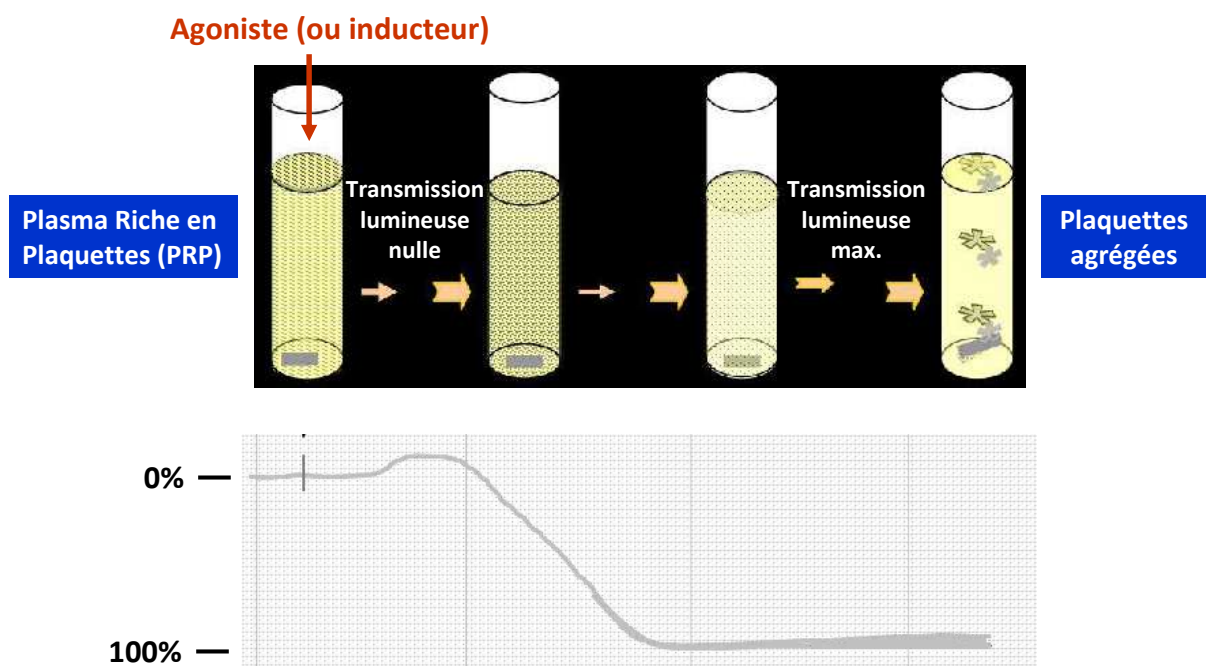


Figure 5 : Principe de la détermination de l'intensité de l'agrégation plaquettaire en PRP grâce à la mesure de l'évolution de la transmission lumineuse après ajout d'un inducteur dans le milieu (39)

Figure 6 : Profil d'agrégation plaquettaire selon le déficit (40)

AA : acide arachidonique ; GT : Thrombasthénie de Glanzmann ; BSS : syndrome de Bernard-Soulier ; VWD : maladie de Willebrand

1.6.2 Explorations plaquettaires spécialisées

Devant un profil d'agrégation plaquettaire anormal et non spécifique, il convient de confirmer la suspicion d'anomalie des granules ou d'un défaut complexe de signalisation à l'aide d'examens spécialisés. Ces examens sont réalisés dans un même temps afin de ne pas multiplier les prélèvements pour les patients.

1.6.2.1 Éliminer un défaut d'activation plaquettaire

Un défaut d'activation plaquettaire peut être mis en évidence en étudiant l'expression des principales glycoprotéines plaquettaires après activation.

Il s'agit d'une quantification par cytométrie de flux des glycoprotéines $\alpha_{IIb}\beta_3$, GPIb-IX-V et P-sélectine présentes à la surface des plaquettes à l'état basal ou après activation.

Avant ou après activation, les plaquettes sont donc marquées par des anticorps fluorescents spécifiquement dirigés contre ces glycoprotéines. L'analyse par cytométrie permet de quantifier la fluorescence et, grâce à une calibration préalable, de déduire le nombre de sites marqués.

Normalement, au repos, les plaquettes expriment à leur surface l' $\alpha_{IIb}\beta_3$ et la GPIb-IX-V à hauteur respectivement d'environ 50.000 et 40.000 sites. La P-sélectine n'est quasiment pas exprimée (inférieure à 1.300 sites). Après activation, l' $\alpha_{IIb}\beta_3$ et la P-sélectine sont externalisées et présentent à la surface des plaquettes environ 80.000 sites pour la première et 10.000 sites pour la seconde. La GPIb-IX-V est quant à elle internalisée : le nombre de sites détectables diminue aux alentours de 20.000 sites.

1.6.2.2 Exploration des granules α par microscopie électronique

Il s'agit de placer des coupes extrêmement fines de plaquettes sous un faisceau d'électrons et d'utiliser un système de lentilles magnétiques pour projeter l'image de l'échantillon sur un écran phosphorescent qui transforme l'image électronique en image optique (figure 7).

Un compte des granules α est établi afin de s'assurer de l'absence de déficit. C'est l'examen de référence pour le diagnostic du syndrome des plaquettes grises.

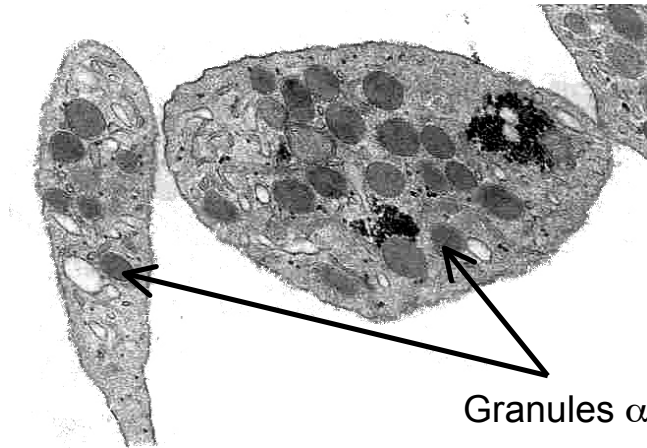


Figure 7 : Vue par microscopie électronique standard des plaquettes et de leur contenu en granules α (CRPP Haut-Lévêque)

1.6.2.3 Exploration des granules denses

Le diagnostic biologique de la maladie du pool vide delta plaquettaire fait appel à des examens très spécialisés qui ne sont réalisés que dans certains laboratoires en France.

La première étape du diagnostic consiste à mettre en évidence la présence d'un défaut de sécrétion d'ATP après activation plaquettaire. En cas d'anomalies, les examens suivants permettent alors d'effectuer un diagnostic différentiel entre une delta-SPD de type quantitatif ou qualitatif et un défaut isolé de sécrétion.

1.6.2.3.1 Mesure de la sécrétion plaquettaire d'ATP

Le Chrono-Log est un appareil de mesure par luminescence permettant d'évaluer, à l'aide du complexe luciférine-luciférase, le taux de sécrétion d'ATP des plaquettes après activation par différents inducteurs. Après activation, l'ATP relargué dans le milieu et la luciférine réagissent et produisent une luminescence selon la réaction ci-dessous (figure 8).

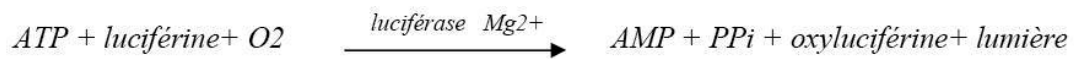


Figure 8 : Réaction de bioluminescence

La luminescence est alors quantifiée par fluorimétrie. Son intensité permet de déterminer le taux d'ATP sécrété et donc, indirectement, la capacité du contenu des granules denses à être relargué.

Dans le cadre d'une delta-SPD, qu'il s'agisse d'un déficit qualitatif (de contenu) ou quantitatif (nombre de granules), il y a une diminution de la quantité d'ATP libérée par les plaquettes activées (6).

1.6.2.3.2 Capture et sécrétion de mepacrine

La mepacrine est un composé fluorescent ayant une forte affinité pour l'ATP et l'ADP, ce qui lui permet de s'accumuler de façon rapide et sélective dans les granules denses des plaquettes.

Les plaquettes sont mises en présence de mepacrine. Les intensités moyennes de fluorescence (MFI) sont mesurées par cytométrie de flux et reflètent le contenu granulaire en ATP / ADP. Cette mesure est réalisée sur un échantillon de plaquettes au repos puis sur un échantillon de plaquettes activées par un agoniste.

Un défaut de capture de mepacrine à l'état basal est en faveur d'un déficit en nombre des granules denses et/ou de leur contenu en ATP. Une capture normale à l'état basal mais associée à un défaut de sécrétion de mepacrine après activation est en faveur d'une anomalie de la sécrétion des granules denses plaquettaires (41).

Il est également possible de réaliser un comptage des granules denses par microscopie à fluorescence après marquage à la mepacrine. Cette technique peut être une alternative pour les laboratoires ne disposant pas d'appareillage très spécialisé.

1.6.2.3.3 Expression du CD63

Le CD63, ou granulophysine, est une protéine transmembranaire présente sur la membrane des granules denses et des lysosomes (12).

On mesure par cytométrie de flux l'expression du CD63 à la surface des plaquettes après activation. Les granules denses étant les principaux granules exprimant le CD63, les MFI ainsi obtenues après activation des plaquettes sont un reflet de leur expression à la surface.

Lors d'une anomalie du pool vide delta, l'expression du CD63 est diminuée s'il n'y a pas ou peu de granules - déficit quantitatif -. En revanche, l'expression du CD63 est normale si on a une anomalie du contenu des granules - déficit de type qualitatif -.

1.6.2.3.4 Mesure des constituants des granules denses

De nombreuses techniques ont été décrites pour doser l'ATP, l'ADP (42) et la sérotonine (25,43) à l'intérieur des plaquettes. Par exemple, on peut doser par une simple méthode ELISA la sérotonine intraplaquettaire qui sera diminuée dans la maladie du pool vide delta.

1.6.2.3.5 Quantification des granules denses par microscopie électronique (whole mounts)

En ajoutant une forte concentration de Ca^{2+} au milieu, le contenu des granules denses est fortement enrichi en calcium. Le Ca^{2+} étant opaques aux électrons, les granules denses sont mis en évidence par microscopie électronique.

Après préparation, les plaquettes sont déposées sur des grilles de microscopie électronique et le nombre de granules denses est évalué sur des plaquettes entières. On compte le nombre de granules sur 100 plaquettes.

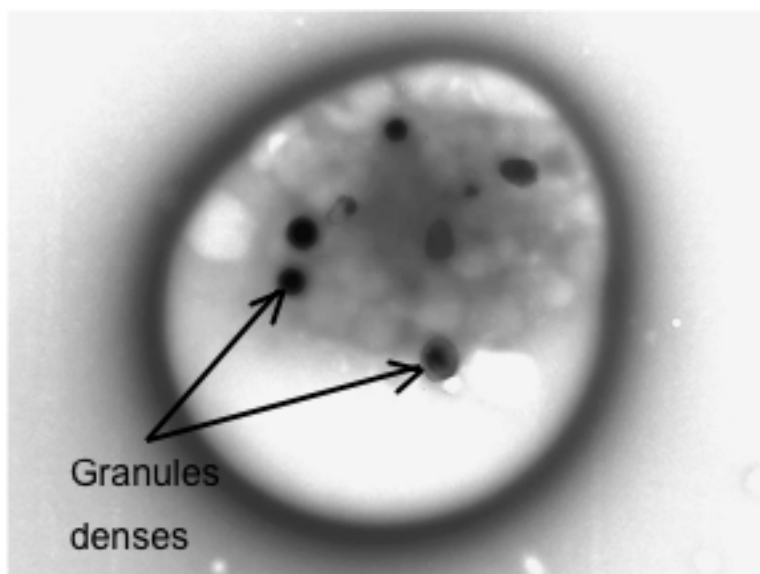


Figure 9 : Granules denses dans une plaquette normale (microscopie électronique - technique whole mounts) (44)

Chez les patients atteints d'une maladie du pool vide delta plaquettaire, il y a généralement une diminution du nombre de granules. Cependant, dans le cadre d'un déficit qualitatif - défaut du contenu des granules denses - on peut s'attendre à un nombre normal ou quasi normal de granules.

1.6.2.3.6 Principaux résultats attendus selon le type d'anomalies

On peut résumer dans le tableau suivant (tableau 2) les principaux résultats attendus selon qu'il s'agit d'un déficit quantitatif, qualitatif ou d'un défaut de sécrétion des granules denses.

Tableau 2 : Récapitulatif des types d'anomalies des granules denses en fonction des résultats des examens spécifiques

| | Déficit quantitatif | Déficit qualitatif | Défaut de sécrétion |
|---------------------------------|---------------------|--------------------|---------------------|
| Sécrétion d'ATP (Chrono-log) | ↘ | ↘ | ↘ |
| Capture mépacrine (état basal) | ↘ | ↘ | N |
| Capture mépacrine (état activé) | N | N | ↗ |
| Expression du CD63 | ↘ | N | ↘ |
| Nombre de GD (whole mounts) | ↘ | N | N |

↘ : diminution

↗ : augmentation

N : Normal(e)

GD : granules denses

1.7 Prise en charge thérapeutique

Il n'existe pas de traitement curatif de la maladie du pool vide delta plaquettaire. Cependant, en cas de saignement ou pour prévenir une hémorragie avant une intervention, la desmopressine (Minirin[®]) et la transfusion de plaquettes (phénotypées pour prévenir l'allo-immunisation) sont utilisées (5). Plus récemment le facteur VII activé (Novoseven[®]) a été proposé dans les épisodes hémorragiques graves chez des patients présentant une forme sévère de la maladie du pool vide, bien que cette indication ne figure pas actuellement dans l'autorisation de mise sur le marché de ce produit (45).

1.8 Problématique de la maladie du pool vide delta plaquettaire

La prévalence des anomalies des granules denses plaquettaires est probablement sous-estimée car ces pathologies sont peu connues et de diagnostic relativement difficile, réservé à des laboratoires d'hémostase très spécialisés.

En effet, peu de cas largement explorés ont été rapportés. Quelques séries de cas ont été décrites (32)(26), mais n'explorent généralement que partiellement le phénotype plaquettaire. Ainsi, on ne retrouve que peu de données sur les anomalies de fonction ou ultrastructurales associées à cette maladie.

Notre laboratoire a diagnostiqué et largement exploré quelques cas de maladie du pool vide delta plaquettaire. Il paraît alors important de remettre en perspective les caractéristiques des cas diagnostiqués et les examens pratiqués au laboratoire pour mieux déterminer leurs apports et améliorer la prise en charge diagnostique de cette maladie.

1.9 Objectifs du travail

L'objectif principal de cette étude était de faire un bilan des patients atteints de maladie du pool vide delta plaquettaire diagnostiqués au CHU de Bordeaux. Il s'agissait de décrire de façon rétrospective une série de patients largement explorés au sein de notre Centre de Référence des Pathologies Plaquettaires.

Cette analyse devrait permettre d'apporter des informations supplémentaires sur le spectre clinique et biologique de cette maladie rare. Ces éléments permettront alors un meilleur diagnostic des patients susceptibles d'être atteints d'une anomalie du pool vide delta, donc d'engager une prise en charge plus adaptée des hémorragies tant sur le plan préventif que curatif.

2 Matériels et méthodes

2.1 Critères d'inclusion

Il s'agissait d'une étude observationnelle rétrospective portant sur les patients diagnostiqués au sein du CRPP de Bordeaux entre 2012 et 2015, dates auxquelles avaient été mises au point certaines techniques visant au diagnostic des anomalies des granules denses plaquettaires. Les analyses étaient réalisées au laboratoire d'hématologie du CHU de Bordeaux sur le site de Haut-Lévêque.

Les patients sélectionnés étaient ceux chez qui avait été mise en évidence une anomalie portant sur les granules denses avec au moins deux tests différents suite à une exploration approfondie des fonctions plaquettaires. Les tests portant spécifiquement sur les granules denses étaient :

- mesure de la sécrétion d'ATP après activation plaquettaire (Chrono-log),
- expression du CD63 après activation plaquettaire (CD63),
- capture et sécrétion de mépacrine,
- comptage des granules denses par microscopie électronique (Whole Mounts).

Ces explorations étaient pratiquées dans le cadre d'hémorragies attribuables à des anomalies de l'hémostase primaire, chez des patients dont le taux de plaquettes et les tests de coagulation standard ne pouvaient expliquer les symptômes.

2.2 Recueil des données cliniques

Les données cliniques des patients étaient recueillies de façon rétrospective à partir des dossiers médicaux :

- l'âge au diagnostic,
- le sexe,
- la (les) pathologie(s) chronique(s) associée(s),
- les antécédents personnels chirurgicaux,
- les épisodes hémorragiques classés en fonction de leur gravité,

- les antécédents familiaux des patients, notamment la notion d'une histoire hémorragique familiale.

La classification hémorragique était établie à partir de la classification OMS en 5 grades (46) :

Grade 0 : absence d'hémorragie,

Grade 1 : hémorragie mineure, cutanéomuqueuse (ou rétinienne sans altération de la vue),

Grade 2 : hémorragie patente (méléna, hématurie, etc.), mais ne nécessitant pas de transfusion,

Grade 3 : idem grade 2, mais nécessitant une transfusion,

Grade 4 : hémorragie avec morbidité importante : hémorragie rétinienne avec perte de vue, hémorragie cérébro-méningée, décès du patient.

Les résultats des examens biologiques réalisés étaient recueillis à partir des dossiers des patients.

2.3 Recueil des données biologiques

2.3.1 Numération sanguine

La numération sanguine des patients a été effectuée sur tube EDTA à l'aide d'un automate LH500 (Beckman-Coulter).

Les paramètres retenus étaient les suivants :

- hémoglobine (g/dL)
- hématocrite (%)
- numération plaquettaire (G/L)
- volume plaquettaire moyen (fL).

2.3.2 Tests de coagulation standard et exploration du facteur de Willebrand

Afin de vérifier s'il existait ou non une anomalie associée de l'hémostase, les paramètres suivants ont été relevés :

- Taux de prothrombine (TP) - expression en pourcentage de la mesure du temps de quick -
- Temps de céphaline activé (TCA) et Ratio du TCA par rapport à un témoin (rTCA)
- Fibrinogène plasmatique (Fg) en (g/L)

Toutes ces mesures ont été réalisées à partir d'un automate ACL-TOP (Instrument Laboratory).

Ont aussi parfois été réalisés les dosages du facteur VIII et de l'activité du facteur de Willebrand (VWF:RCO) afin d'éliminer une maladie de Willebrand.

2.3.3 Mesure du temps d'occlusion en condition de flux (PFA-100)

Le prélèvement était fait sur tubes en verre citratés (0,105M) et était traité dans les 4 heures.

L'analyse était réalisée sur un appareil PFA-100 Analyser de Siemens.

Deux types de cartouches étaient utilisés :

- cartouche PFA collagène / épinéphrine : contient une membrane recouverte de 2µg de collagène de type I et de 10 µg de ditartrate d'épinéphrine,
- cartouche PFA collagène / ADP : contient une membrane recouverte de 2µg de collagène de type I et de 50 µg d'adénosine-5'-diphosphate.

On introduisait 900 µL de sang total citraté par cartouche.

Les temps d'occlusion TO étaient rendus en secondes.

Les valeurs normales déterminées au laboratoire étaient :

- TO inférieur à 145 s pour la cartouche collagène / épinéphrine
- TO inférieur à 100 s pour la cartouche collagène / ADP

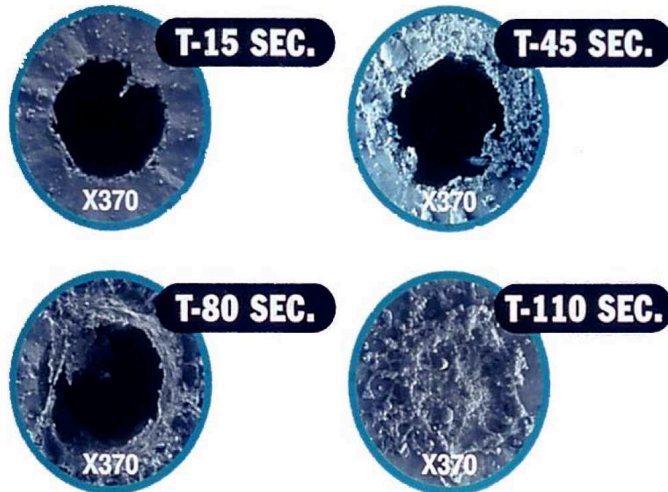


Figure 10 : Visualisation du processus d'occlusion au cours du temps de la membrane de la cartouche par le clou plaquettaire dans un système PFA-100

2.3.4 Test d'agrégation plaquettaire sur plasma enrichi en plaquettes

La technique était basée sur les dernières recommandations de la Société Internationale d'Hémostase et Thrombose (ISTH) (47).

Le prélèvement était fait sur tubes citratés en verre. L'analyse était traitée dans les 4 heures suivant le prélèvement.

Le plasma riche en plaquettes (PRP) était obtenu par centrifugation, sans frein, à température ambiante et pendant 10 minutes. La centrifugation devait être d'autant plus lente que le taux de plaquettes du patient était bas.

Le surnageant était récupéré dans un tube plastique de 20 mL, les plaquettes étaient comptées sur l'automate de cytologie. Si la numération plaquettaire était supérieure à 600 G/L, le PRP était dilué avec du plasma pauvre en plaquettes (PPP).

Le PPP était obtenu après une première centrifugation à 3500 tr/min pendant 10 minutes puis une deuxième centrifugation du plasma en cupules Eppendorf pendant 2 minutes à 13000 tr/min.

Les agrégomètres utilisés étaient des ATRACT® 4004 de ELITechGroup à quatre canaux de mesure photométrique. Ils étaient associés au logiciel LPC-Software pour l'analyse des mesures.

250 µL de PPP étaient d'abord placés dans les cuves de l'agrégomètre. Cela permettait d'établir le 100% de transmission lumineuse (correspondant à 100%

d'agrégation). Ensuite, 250 µL de PRP étaient mis dans une autre cuve. La ligne de base ainsi mesurée permettait d'établir le 0% d'agrégation. Enfin, on ajoutait l'inducteur testé. La variation de densité optique du milieu permettait d'évaluer le pourcentage d'agrégation en comparaison du PPP.

Les résultats étaient rendus en % d'agrégation maximale pour chaque inducteur testé. On notait si l'agrégation était réversible, irréversible ou en double vague pour l'ADP et la ristocétine ; on faisait de même pour les autres inducteurs si l'agrégation n'était pas irréversible.

Le panel d'agonistes utilisés était celui recommandé par l'ISTH :

- **ADP** (Calbiochem) : 10µM, 5 µM et 2.5µM puis si agrégation irréversible ou double vague à 2.5µM : faire 0.5µM
- **Ristocétine** (Stago) : 1.2 mg/ml et 0.5 mg/ml, si réversible à 1.2 mg/ml : faire 1.5 mg/ml
- **Collagène** (HORM) : 2 µg/ml
- **TRAP** (NeoMPS) : 10 µM ; si réversible à 10 µM : faire 25 µM puis 50 µM si besoin
- **Acide Arachidonique** (NU-CHEK-PREP) : 1 mM

Et éventuellement :

- **Epinéphrine** (Helena Laboratories): 4µM

2.3.5 Etude de l'expression des principales glycoprotéines plaquettaires

Le prélèvement était fait sur tube citraté et était traité dans les 4 heures.

Le marquage des glycoprotéines plaquettaires était réalisé sur le PRP du patient. Le PRP était obtenu par centrifugation lente des tubes citratés prélevés (cf agrégation plaquettaire). Celui-ci est ajusté à 250 000 plaquettes / µL avec du PPP si nécessaire. Si possible, un témoin était passé en parallèle.

Le kit utilisé était le PLT Gp/Receptors de BioCytex.

50 µL de PRP étaient incubés 5 minutes à température ambiante en présence de 50 µL de TRAP (60 µM) pour le tube « plaquettes activées » et de 50 µL de diluant pour le tube « état basal ». Ces échantillons étaient ensuite dilués dans 500 µL de diluant.

20 μ L de ces préparations étaient marqués par incubation pendant 10 minutes à température ambiante en présence de 20 μ L de l'anticorps monoclonal souhaité (IgG anti P-sélectine ou anti GPIIb ou anti GPIb ou un contrôle isotopique négatif).

Parallèlement, un tube avec 40 μ L de calibrant était préparé. Ce calibrant était constitué de trois types de billes dont le nombre de sites marqués par des IgG était connu. La droite de calibration ainsi établie permettait de connaître le rapport entre la MFI et le nombre de sites.

La révélation du marquage était faite grâce à un anticorps polyclonal anti IgG de souris couplé au FITC. 20 μ L de cet anticorps étaient ajoutés aux tubes tests et incubés 10 minutes à température ambiante.

Enfin, on ajoutait 1 mL de diluant dans chaque tube avant passage dans le cytomètre.

L'intensité moyenne de fluorescence (MFI) était mesurée par cytométrie de flux. Grâce au calibrant, la MFI était convertie en nombre absolu d'anticorps monoclonaux fixés par plaquettes. Les anticorps étant utilisés à une concentration saturante, ce nombre absolu était équivalent au nombre de GP exprimées par plaquettes.

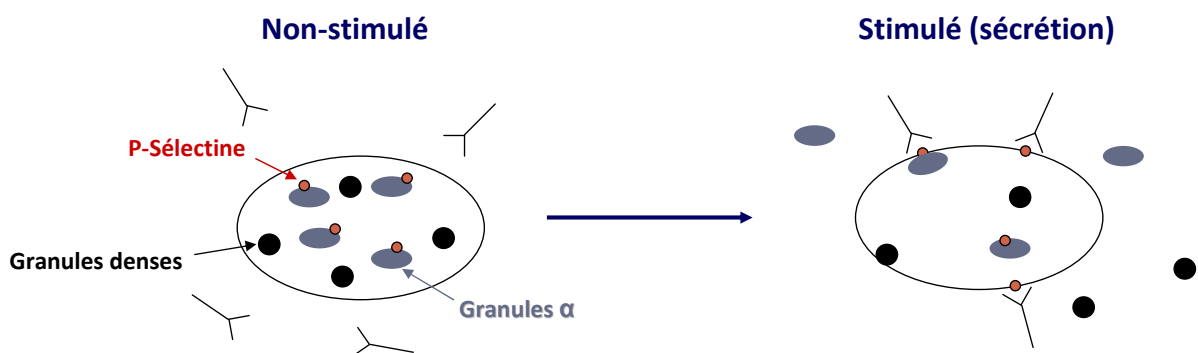


Figure 11 : Exemple de marquage de la P-sélectine par des anticorps fluorescents, avant et après stimulation (39)

A l'état non stimulé, la P-sélectine est sur les granules α intraplaquettaires, donc inaccessible à l'anticorps anti P-sélectine : il n'y a pas de fixation de l'Ac marqué sur les plaquettes et la fluorescence de chaque plaquette, mesurée par le cytomètre, est quasi nulle.

Après stimulation, la fusion des granules α avec la membrane plaquettaire fait que les sites de P-sélectines sont exprimés en surface. Ils deviennent accessibles aux Ac marqués qui s'y fixent. Les Ac étant en concentration saturante, tous les sites P-sélectines sont marqués et la fluorescence des plaquettes, mesurée par le cytomètre, est un reflet direct du nombre de protéines exprimées.

2.3.6 Mesure de la sécrétion plaquettaire d'ATP

Les mesures étaient réalisées par un Appareil à sécrétion CH700 (CHRONO-LOG Corporation). Le logiciel associé était « Aggrolink 8 »

Le coffret utilisé était le CHRONO-LUME (CHRONO-LOG Corporation) contenant de la luciférase et de l'ATP standard (à 400µmol/L) pour le réglage du gain de l'appareil.

Les inducteurs utilisés étaient :

- ADP REAGENT CHRONO-PAR 0,25 µM,
- COLLAGEN CHRONO-PAR 50 µg/mL,
- TRAP 6 HART 1mM.

Les échantillons étaient prélevés sur tubes en verre citratés à 0,105M. Les taux de plaquettes des PRP et PPP étaient préparés et ajustés à 250 G/L avec leur PPP si nécessaire.

Le gain pour la luminescence était réglé grâce au PRP (225µL) incubé avec la luciférase (25 µL) et mis en présence d'ATP standard (2,5µL, soit 1 nmole).

Puis deux mesures simultanées étaient réalisées dans l'agrégomètre après introduction d'un inducteur dans le PRP préalablement incubé avec la luciférase :

- par transmission lumineuse : mesure de l'agrégation plaquettaire sur le PRP, comparée à la transmission lumineuse basale du PPP (reflétant l'agrégation plaquettaire)
- par luminescence : mesure de la sécrétion d'ATP réagissant avec la luciférase.

Seule cette deuxième mesure a été retenue dans l'étude.

A partir de la mesure de la luminescence, le nombre de nmoles d'ATP sécrétées était calculé par l'appareil.

2.3.7 Etude de l'expression du CD63 après activation

Les mesures étaient réalisées par un Cytomètre FC 500 de Beckman Coulter.

Les réactifs utilisés étaient les suivants :

- TRAP (Polypeptide Group) 125 µM
- CD63-PE (antigranulophysine - Beckman Coulter)

- CD41-PC7 (anti GPIIb-IIIa - Beckman Coulter)
- IgG1-PE de souris (Beckman Coulter)

Les prélèvements étaient réalisés sur tube citraté de préférence en verre. Un PRP était préparé pour les mesures.

Deux échantillons de PRP (50µL) étaient pour l'un activé par du TRAP (50µL) et pour l'autre non activé (PBS 50µL). Ils étaient ensuite incubés 5 minutes à température ambiante.

20µL étaient ensuite mis en présence de 20µL de CD63-PE et 20µL en présence de 20µL de IgG1-PE (marquage négatif). En même temps, un double marquage plaquettaire était réalisé en ajoutant à tous les tubes 10µL de CD41-PC7 (marqueur plaquettaire).

Le tout était incubé 15 minutes dans l'obscurité à température ambiante et repris dans 500µL de PBS avant passage au cytomètre.

Les MFI avant et après activation étaient corrigées en retirant le signal non spécifique des tubes sans marqueur CD63.

Après calcul de la différence des MFI corrigées avant et après activation, était obtenue la **MFI d'expression du CD63**, reflet de la quantité de CD63 exposés suite à l'activation des plaquettes.

Enfin, on établissait un ratio de sécrétion du CD63 correspondant au rapport des MFI d'expression du patient sur la MFI d'expression moyenne des témoins.

2.3.8 Mesure de la capture et de la sécrétion de mépacrine

Les mesures étaient réalisées sur un Cytomètre FC 500 de Beckman Coulter.

Les réactifs utilisés étaient :

- Mépacrine 500 µM (Quinacrine Sigma Aldrich),
- TRAP 60 µM (Polypeptide Group).

Le PRP était obtenu après centrifugation des prélèvements sur tubes citratés. Le nombre de plaquettes dans les PRP était ajusté grâce aux PPP correspondant à environ 300 G/L, puis les échantillons étaient dilués avec du PBS au 1/20. Si le nombre de plaquettes était inférieur, le PRP du témoin était ajusté avec son PPP au même niveau que celui du patient. Puis les PRP étaient dilués avec du PBS au 1/10.

Les échantillons étaient testés à deux concentrations différentes de mépacrine (1,7 et 3,4 μM) en présence ou non de TRAP. Afin de corriger les MFI obtenues, un tube était préparé parallèlement sans mépacrine ni TRAP.

Le protocole de préparation était le suivant :

- 300 μL d'échantillon était mis en présence de 1 μL de mépacrine, vortexé et incubé à l'abri de la lumière pendant 30 minutes à 37°C dans une étuve à CO₂.
- L'échantillon était ensuite repris dans 500 μL de PBS et partagé entre un tube A de 500 μL et un tube B de 300 μL . On ajoutait 15 μL de TRAP dans le tube B.
- L'incubation de tous les tubes était ensuite faite dans l'obscurité à température ambiante.
- Le tube B était repris dans 200 μL de PBS pour ajuster le volume à celui des autres tubes.

L'intensité moyenne de fluorescence (MFI) des plaquettes ainsi traitées était mesurée par cytométrie de flux. La mépacrine s'accumulant spécifiquement dans les granules denses, l'intensité du signal est un reflet du contenu en granules denses.

La **capture avant sécrétion** correspondait au signal (MFI) des plaquettes marquées à la mépacrine à l'état basal (sans TRAP). Le signal était corrigé en soustrayant le signal non spécifique des plaquettes non stimulées et non marquées.

La **capture après sécrétion** correspondait au signal (MFI) des plaquettes marquées à la mépacrine après activation par le TRAP (figure 12). Le signal était corrigé en soustrayant le signal non spécifique des plaquettes stimulées (TRAP) et non marquées.

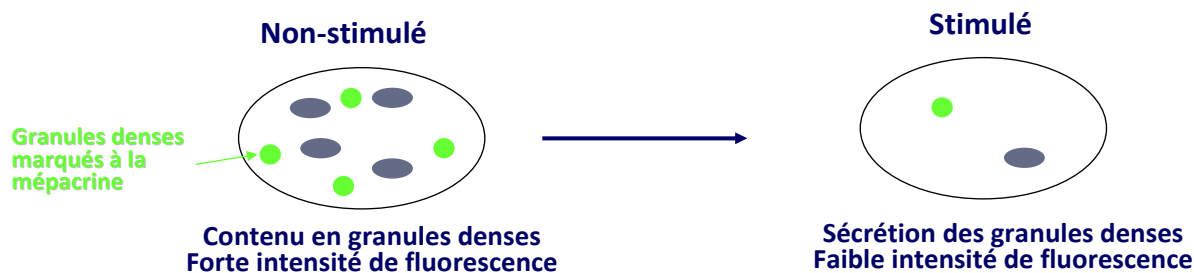


Figure 12 : Capture de mepacrine avant et après stimulation (39)

Le signal produit par la mepacrine reflète le contenu granulaire dense. Les plaquettes ont une intensité de fluorescence d'autant plus forte que les granules denses sont nombreux. La capture avant sécrétion est donc plus élevée que la capture après sécrétion.

2.3.9 Etude par microscopie électronique

2.3.9.1 Quantification des granules denses : technique des whole mounts

Le prélèvement était fait sur tube ACDA. En parallèle, un prélèvement était réalisé sur un témoin pour s'assurer du bon fonctionnement de la technique et comparer les résultats.

On préparait la solution de lavage : 50 mL de solution mère Tampon Tyrode de lavage à laquelle étaient ajoutés :

- 583 µL d'albumine bovine 30 % (0,35 % au final)
- 400 µL de chlorure de calcium 0,25 M
- 40 mg de glucose
- 31,5 µL d'Apyrase

De même, le tampon de réaction était préparé : 50 mL de la solution mère Tampon Tyrode de réaction à laquelle on ajoutait :

- 167 µL d'albumine bovine 30 %
- 50mg de glucose
- 400 µL de chlorure de calcium à 0,25 M

La préparation des plaquettes se faisait à partir du PRP qui était obtenu par centrifugation à 1100 tours/min pendant 10 minutes. Pour 9 mL de PRP, on y ajoutait :

- 6,25 μ L d'apyrase
- 1 mL d'ACDA

Le tout était homogénéisé par retournements délicats, puis centrifugé 10 minutes à 2600 tours/min. Le surnageant était retiré et les plaquettes lavées deux fois en tampon de lavage puis reprises par 1 mL de tampon de réaction. Le taux de plaquettes était ajusté à 250 G/L.

5 à 10 μ L de la dilution de plaquettes en tampon réaction étaient déposés sur les grilles de microscopie électronique. On y ajoutait immédiatement 5 à 10 μ L de PFA à 2 %, puis la préparation était laissée 30 min en chambre humide. Les grilles ainsi préparées étaient ensuite lavées trois fois et séchées 1 à 2 heures.

Enfin, les grilles étaient passées au microscope électronique où le nombre de granules était compté sur 100 plaquettes.

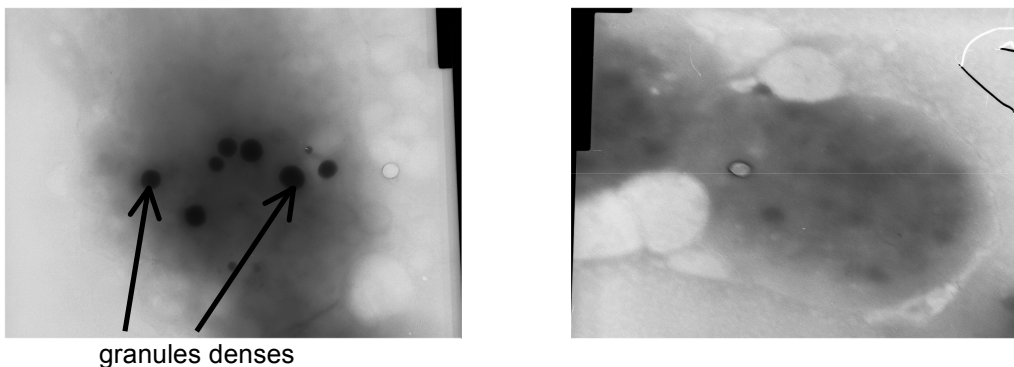


Figure 13 : Visualisation des granules denses par microscopie électronique - technique des whole mounts - chez un sujet sain (photo de gauche) et chez un patient avec un déficit en granules denses (photo de droite)

2.3.9.2 Quantification des granules alpha et morphométrie plaquettaire

Après fixation des plaquettes dans des bains d'éthanol de concentrations croissantes, on procédait à l'inclusion en Epon, une résine liquide de monomères polymérisables. Il s'agissait d'abord d'une infiltration de la substance grâce à des bains de résine-solvant de concentrations croissantes en résine, puis d'une polymérisation provoquant le durcissement du prélèvement.

Des coupes ultrafines - 70 à 80 nm - étaient ensuite réalisées à l'ultramicrotome et déposées sur des grilles pour examen par microscopie électronique standard.

Les colorations en acétate d'uranyle et citrate de plomb étaient utilisées pour rendre une partie des structures opaques aux électrons et ainsi renforcer les contrastes afin de permettre l'analyse des coupes.

Après acquisition des images, un décompte des granules α était effectué afin d'éliminer un déficit combiné en granules.

De plus, l'analyse de la morphologie des plaquettes a été effectuée à l'aide du logiciel Image J. En sélectionnant les contours des plaquettes entières visualisées, le logiciel détermine l'aire des plaquettes, leur grand diamètre, leur petit diamètre et le rapport grand diamètre sur petit diamètre.

Enfin à l'aide d'un tableur, on déterminait l'aire moyenne, le grand diamètre et le petit diamètre moyens et leurs écarts-types, les pourcentages de plaquettes ayant des aires supérieures à $4 \mu\text{m}^2$, supérieures à $6 \mu\text{m}^2$ ou supérieures à $8 \mu\text{m}^2$, et la répartition en fonction de leur forme (rapport grand diamètre/petit diamètre).

2.4 Statistiques

Les moyennes et les écarts-types ont été calculés pour les résultats de chaque variable étudiée.

L'analyse statistique des données a été réalisée afin de déterminer s'il y avait une différence significative entre les résultats de la population étudiée et ceux de la population de témoins.

Devant la faible taille des populations, le test non paramétrique de Mann-Whitney a été utilisé pour établir ces comparaisons. L'indice retenu permettant de conclure à une différence statistiquement significative était un « p » inférieur à 0,05.

3 Résultats

Au total, 11 patients atteints de delta-SPD ont été diagnostiqués dans notre centre entre 2012 et 2015.

DONNEES CLINIQUES

3.1 Généralités

Notre population comportait 5 hommes et 6 femmes. L'âge moyen au diagnostic était de 55 ans (\pm 28 ans, [1 ans ; 94 ans]). Deux diagnostics avaient été faits dans l'enfance (patientes 1 et 8). Les autres patients avaient été diagnostiqués bien plus tardivement, après l'âge de 44 ans.

3.2 Caractéristiques du syndrome hémorragique

Sur le plan hémorragique, la symptomatologie était assez variée, allant d'hématomes de petite taille à des hématomes extensifs voire des AVC hémorragiques, ou encore des épistaxis, des rectorragies ou des hématuries.

Le score OMS des épisodes hémorragiques était modéré dans la majorité des cas. Il était égal à 2 dans 6 cas (figure 14). Cependant, les hémorragies pouvaient parfois être sévères avec la nécessité chez 5 patients de les transfuser, soit en concentrés plaquettaires soit en culots globulaires (patients 2 ; 3 ; 6 ; 10 et 11) (tableau 3). Le patient 2 pourrait même être décédé des conséquences de ses hématomes cérébraux.

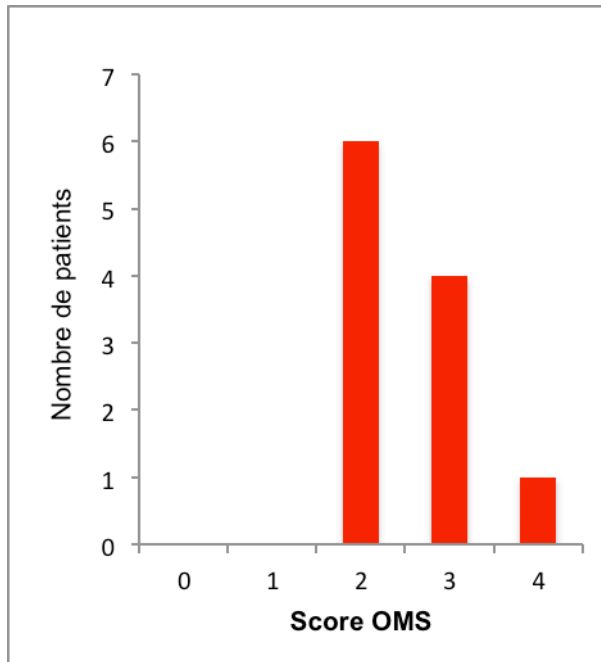


Figure 14 : Répartition du nombre de patients en fonction du score OMS

Tableau 3 : Récapitulatif des principaux symptômes hémorragiques et des éventuels traitements

| Patient | Symptômes hémorragiques | Score OMS |
|---------|---|-----------|
| 1 | Hématomes de faibles dimensions au niveau des zones de frottement | 2 |
| 2 | hématomes multiples / puis nombreux hématomes cérébraux → décès | 4 |
| 3 | hématome du dome hépatique → embolisation / hématurie → décaillotage vésical / épistaxis → transfusion CPA | 3 |
| 4 | ecchymoses spontanées depuis quelques mois / rectorragies / pétéchies buccales | 2 |
| 5 | épistaxis depuis 2 ans (amélioration avec le traitement de sa maladie de Waldenstrom) / hématome spontané du membre inférieur droit | 2 |
| 6 | hématome étendu du flanc droit post effort de toux | 3 |
| 7 | épistaxis abondantes → cautérisation / hématome du flanc droit | 2 |
| 8 | hémorragie post GEU en 2001 → traitement par Minirin | 2 |
| 9 | règles abondantes / hémorragies abondantes suite à biopsie de glande salivaire, et suite à une appendicectomie / ecchymoses spontanées / bulles buccales hémorragiques / lésions purpuriques | 2 |
| 10 | hématome rétropéritonéal suite à un traitement par radiofréquence d'une tumeur rénale / hémorragies très abondantes (transfusions) à chaque reprise AVK (pour valve aortique) / pas de symptôme hémorragique depuis le passage des anticoagulants à dose préventive | 3 |
| 11 | choc septique et défaillance multiviscérale / saignements sur excisions des lésions ischémiques des extrémités et épistaxis → transfusion de CGR et plaquettes + exacyl / notion de saignements chez la mère | 3 |

3.3 Étiologies

La delta-SPD était dans la majorité des cas associée à une cause acquise (tableau 4). C'était probablement le cas des sept patients qui présentaient des hémopathies malignes : syndromes myélodysplasiques, syndromes myéloprolifératifs, leucémies ou atteinte de la lignée lymphoïde. Les symptômes hémorragiques n'étaient apparus qu'en parallèle de leurs hémopathies et il n'y avait pas de notions d'antécédents personnels ou familiaux de saignements.

Deux patientes avaient des étiologies congénitales certaines ou probables :

- l'une avait un syndrome de Hermansky-Pudlak (HPS) (patient 1), classiquement associé à un déficit en granules denses ;
- La seconde avait une delta-SPD isolée et probablement constitutionnelle, diagnostiquée dans l'enfance (patient 8).

La patiente 1 était atteinte d'un albinisme oculo-cutané qui avait entraîné la recherche d'une anomalie des granules denses dans le cadre d'un éventuel HPS. Le diagnostic a été confirmé par une analyse génétique qui a permis de mettre en évidence une anomalie moléculaire impliquant l'épissage dans le gène *HPS4*.

Deux patientes avaient des delta-SPD dont l'origine était indéterminée (patients 9 et 11). Elles n'avaient en effet pas de pathologie clairement associée à une delta-SPD. La patiente 9 avait des antécédents personnels de saignements et la patiente 11 des antécédents familiaux.

Tableau 4 : Principales données cliniques

| Patient | Age | Sexe | Principales pathologies | Delta-SPD acquise ou constitutionnelle |
|---------|-----|------|--|--|
| 1 | 1 | F | syndrome de Hermansky-Pudlak | constitutionnelle |
| 2 | 48 | M | LMC hyperleucocytaire | acquise |
| 3 | 71 | M | LMMC acutisée en LAM - PAN | acquise |
| 4 | 74 | F | AREB I | acquise |
| 5 | 94 | M | maladie de Waldenstrom | acquise |
| 6 | 74 | F | SMD IPSS 1 | acquise |
| 7 | 59 | M | SMP (LMMC) avec myélofibrose | acquise |
| 8 | 5 | F | mutation du facteur V Leiden | constitutionnelle |
| 9 | 82 | F | PTI | indéterminée |
| 10 | 54 | H | splénomégalie myéloïde | acquise |
| 11 | 44 | F | choc septique à point de départ pulmonaire | indéterminée |

DONNEES BIOLOGIQUES

3.4 Numération sanguine

A l'exception de 2 patients (patients 7 et 9), tous les autres patients étaient anémiés avec une hémoglobine inférieure à 12 g/dL. Sur les 11 patients, 7 avaient une hémopathie et 5 avaient présenté des hémorragies sévères ayant nécessité une transfusion. Ceci pouvait expliquer cette prédominance de patients anémiés.

Sur 11 patients, 7 étaient thrombopéniques (plaquettes < 150 G/L). La moyenne de la numération plaquettaire était de 137 G/L (+/- 71 G/L). Les taux de plaquettes variaient entre 50 G/L et 322 G/L. Les thrombopénies étaient généralement retrouvées chez les patients ayant une hémopathie. Aucun patient ne présentait cependant de thrombopénie profonde (< 30 G/L) pouvant expliquer les symptômes hémorragiques.

Le VMP était légèrement élevé pour un seul patient (patient 7) et normal pour les 10 autres, suggérant que la maladie n'était pas associée à une taille augmentée des plaquettes.

Tableau 5 : Résultats des paramètres de la numération sanguine pour les 11 patients inclus

| Patient | Hémoglobine (12 à 16 g/dL) | Hématocrite (37 à 52%) | Plaquettes (140 à 450 G/L) | VMP (7 à 10 fL) |
|-------------------|---------------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------------|----------------------------|
| 1 | 10,1 | 30% | 322 | 7,3 |
| 2 | 6,5 | 18% | 147 | 7,2 |
| 3 | 9,6 | 28% | 50 | 9,5 |
| 4 | 11,7 | 35% | 72 | 8,1 |
| 5 | 9,1 | 27% | 173 | 8,1 |
| 6 | 11,6 | 34% | 93 | 9,4 |
| 7 | 13,8 | 41% | 156 | 11,5 |
| 8 | 11,8 | 34% | 132 | 8,5 |
| 9 | 14,1 | 43% | 66 | 9,8 |
| 10 | 12 | 36% | 124 | 7,4 |
| 11 | 8,1 | 24% | 169 | 8,2 |
| Moyenne | 10,8 | 32% | 137 | 8,6 |
| Ecart-type | 2,2 | 7% | 71 | 1,2 |

3.5 Tests de coagulation standard et mesure du temps d'occlusion en condition de flux (PFA-100)

Le TP était normal dans tous les cas.

Le rTCA était augmenté chez 6 patients. Pour 4 d'entre eux, le TCK était alors normal ou sub-normal (patients 2 et 4 : < 1,2 ; patient 5 : 1,22 ; patient 7 : 1,23). Pour les patients 10 et 11, aucun TCK n'avait été réalisé. Cependant, un dosage des facteurs de la coagulation n'avait pas mis en évidence de déficit pour le patient 10. De même, le rTCA était juste au-dessus de la normale pour le patient 11.

Les dosages du facteur VIII et de l'activité du VWF étaient normaux chez 7 des 10 patients testés. Pour le patient 5, l'activité du VWF était légèrement inférieure à la normale. Il en était de même pour le patient 10, avec un dosage antigénique du VWF (72%) et un dosage de l'activité en agrégométrie proches de la normale (50%). Enfin, pour le patient 11, le facteur VIII et l'activité du VWF étaient très élevés en raison du contexte clinique très inflammatoire. Dans tous les cas, on pouvait fortement exclure une maladie de Willebrand ou une anomalie de la coagulation.

Le PFA-100 n'avait été réalisé que chez 5 patients. Il présentait une anomalie pour tous les patients testés : les temps d'occlusion étaient dans tous les cas augmentés avec les deux cartouches. Cependant, cet examen étant perturbé en cas de thrombopénie ou d'hématocrite abaissé, il était difficile d'en tirer des conclusions puisque tous les patients testés avaient des plaquettes abaissées ou un hématocrite bas.

Tableau 6 : Résultats des tests standards d'hémostase et PFA-100

| Patient | TP (>70%) | rTCA (<1,2) | Fg (2-5 g/L) | PFA-100 EPI (<145 sec) | PFA-100 ADP (<100 sec) | VIIIc (50-150%) | VWF :RCo (50-150%) |
|---------|-----------|-------------|--------------|------------------------|------------------------|-----------------|--------------------|
| 1 | 108% | 1,01 | 3 | - | - | - | - |
| 2 | 79% | 1,41 | 1,3 | - | - | 74% | 217% |
| 3 | 83% | 1,01 | 5 | 197 | 146 | 221% | 207% |
| 4 | 84% | 1,3 | 6,2 | - | - | 185% | 219% |
| 5 | 109% | 1,41 | 4,4 | >300 | >300 | 60% | 46% |
| 6 | 107% | 1,06 | 2,7 | >265 | 164 | 106% | 70% |
| 7 | 83% | 1,58 | 2,6 | - | - | 119% | 135% |
| 8 | 84% | 1,03 | 3 | - | - | 110% | 101% |
| 9 | 115% | 1,1 | 2,9 | 258 | 184 | 145% | 158% |
| 10 | 101% | 1,29 | 1,9 | 216 | 157 | 80% | 28% |
| 11 | 82% | 1,21 | 7,2 | | | 307% | 317% |

3.6 Tests d'agrégation plaquettaire

L'agrégation plaquettaire était anormale pour tous les patients. Cependant, l'interprétation était délicate en raison d'un taux de plaquettes parfois assez faible dans le PRP. En effet, ce taux abaissé peut entraîner une diminution de l'agrégation maximum observée sans pour autant qu'il y ait de réelle thrombopathie.

Selon les inducteurs utilisés, les résultats étaient (tableau 7) :

- **A l'ADP**, l'agrégation était anormale à la dose de 2,5 µM pour 8 patients sur 11 avec une réversibilité de l'agrégation.

Pour l'ADP 5 µM, il y avait une diminution du pourcentage d'agrégation maximum et/ou une réversibilité pour 8 patients sur 11. Seul le patient 8 avait une agrégation normale pour cette dose d'ADP et les patients 1 et 7 avaient un pourcentage normal mais une réversibilité de l'agrégation. Les résultats étaient très similaires pour l'ADP 10 µM.

- **A la ristocétine forte dose**, l'agrégation était diminuée pour 8 patients sur 11. Seuls les patients 7, 8 et 9 avaient un pourcentage d'agrégation normal selon l'intervalle de référence du laboratoire. Cependant, l'analyse en fonction du taux de plaquettes dans le PRP amène à considérer les patients 3, 4, 10 et 11 comme ayant aussi une agrégation sensiblement normale à la ristocétine.

Pour les 4 autres patients (patients 1, 2, 5 et 6), malgré un PRP généralement assez riche, l'agrégation à la ristocétine était considérée comme légèrement diminuée.

- **Avec le collagène**, l'agrégation était systématiquement abaissée.
- **A l'acide arachidonique**, l'agrégation était aussi systématiquement abaissée et même effondrée pour 2 patients (patients 3 et 6).
- **Au TRAP**, l'agrégation n'était normale aux fortes doses (TRAP 25 ou 50 µM) que pour le patient 9 et pouvait être considérée comme normale chez les patients 4 et 10 en tenant compte du faible taux de plaquettes du PRP.

Elle était en revanche très légèrement diminuée pour les patients 1, 7 et 8 et plus abaissée encore pour les 3 autres patients testés à ces doses.

- **A l'épinéphrine**, testée chez 6 patients seulement, l'agrégation était diminuée pour 4 d'entre eux et normale pour les patients 8 et 9.

De façon plus générale, on notait une hypoagrégation :

- marquée, en réponse au collagène, à l'acide arachidonique et à l'ADP ;
- moindre, en réponse au TRAP et à l'épinéphrine.

En revanche, l'agrégation à la ristocétine n'était considérée que légèrement diminuée chez 4 patients et était normale pour les 7 autres patients.

Tableau 7 : Résultats des tests d'agrégation plaquettaire sur PRP en transmission optique

| Patient | Plaquettes (G/L) | ADP 2,5 μ M | ADP 5 μ M | Risto 1,2 (1,5) mg/mL | COLL 2 μ g/mL | AA 1 mM | TRAP 50 (25) μ M | Epi 4 μ M |
|-------------------------|------------------|-----------------|---------------|--------------------------------|-------------------|---------|-------------------------|---------------|
| 1 | 466 | 57% R | 66% R | 71% | 42% | 63% | 72% | |
| 2 | 256 | 46% R | 49% R | 65% | 10% | 62% | 58% | |
| 3 | 69 | 26% R | 34% R | 45% I | 8% | 2% | 25% | |
| 4 | 84 | 35% I | 45% I | 64% | 23% | 33% | 56% | |
| 5 | 192 | 54% I | 54% I | 61% D | 57% | 56% | | 51% |
| 6 | 149 | 33% R | 52% R | 56% | 20% | 0% | | 11% |
| 7 | 316 | 9% R | 61% D | 80% | 68% | 63% | 73% | 2% |
| 8 | 207 | 62% R | 71% I | 78% | 45% | 56% | 73% | 74% |
| 9 | 120 | 29% R | 25% R | 80% | 10% | 55% | 80% | 110% |
| 10 | 136 | 64% R | 40% R | 62% | 43% | 58% | 56% | |
| 11 | 189 | 16% R | 22% R | 71% | 51% | | | |
| Valeurs normales | > 230 | >26% D | >57% I | >77 I ou DV (>78%) | >73% | >73% | >74% (>78%) | >70% |

Les valeurs normales ont été établies sur 30 témoins.

La numération plaquettaire correspond au taux de plaquettes dans le PRP.

Les résultats d'agrégation sont donnés en pourcentage d'agrégation maximale.

R : Réversibilité de l'agrégation ; D : agrégation Double vague; I : agrégation Irréversible.

3.7 Explorations plaquettaires spécialisées

3.7.1 Mesure de l'expression des principales glycoprotéines plaquettaires

La quantification par cytométrie de flux des glycoprotéines GPIb, GPIIb et P-sélectine vise à rechercher un défaut de signalisation empêchant leur expression ou leur internalisation correctes après activation.

Au total, 7 patients avaient été testés.

L'étude statistique de l'expression de chaque glycoprotéine avant ou après activation ne montrait pas de différence significative avec les témoins. Dans le cas de la P-sélectine, on observait une tendance, mais non significative avec le critère statistique retenu ($p = 0,061$).

On ne constatait donc pas de défaut majeur de l'activation en faveur d'une anomalie de la signalisation intraplaquettaire pouvant expliquer les résultats des tests d'agrégation plaquettaire observés (figures 15, 16, 17).

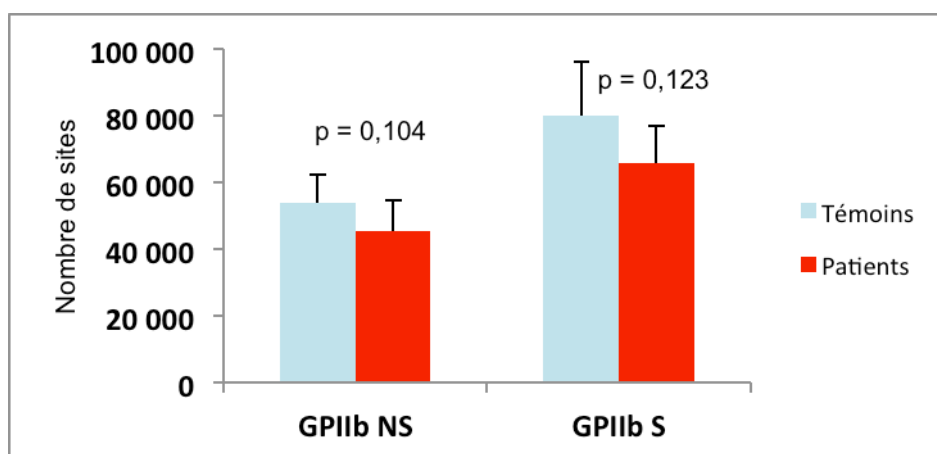


Figure 15 : Mesures par cytométrie de flux - sur 7 patients et 5 témoins - du nombre moyen de protéines GPIIb (marquées par un Ac anti GPIIb) exprimées à la surface plaquettaire avant (NS) et après (S) stimulation par le TRAP (en nombre de sites / plaquette).

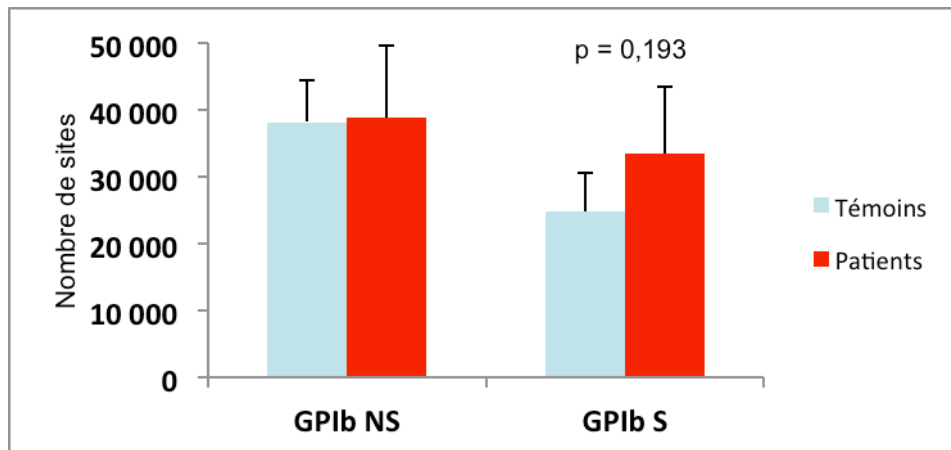


Figure 16 : Mesures par cytométrie de flux - sur 7 patients et 5 témoins - du nombre moyen de protéines GPIb (marquées par un Ac anti GPIb) exprimées à la surface plaquettaire avant (NS) et après (S) stimulation par le TRAP (en nombre de sites / plaquette).

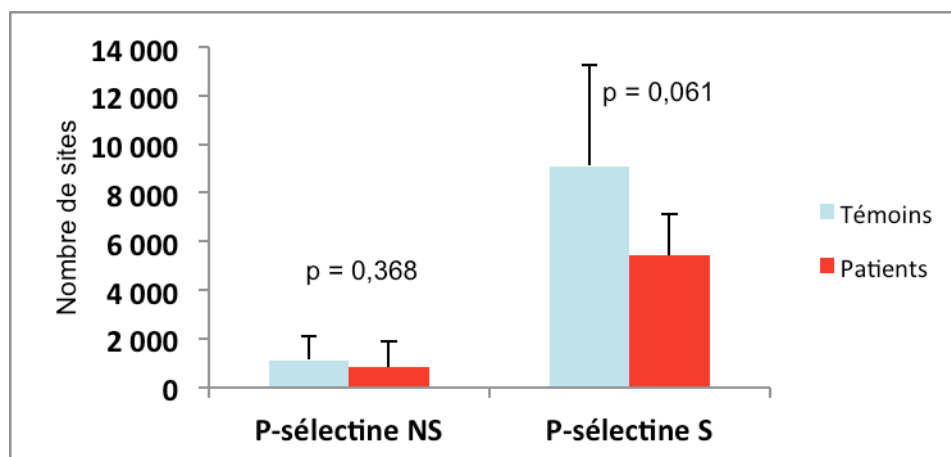


Figure 17 : Mesures par cytométrie de flux - sur 7 patients et 5 témoins - du nombre moyen de protéines P-sélectine (marquées par un Ac anti P-sélectine) exprimées à la surface plaquettaire avant (NS) et après (S) stimulation par le TRAP (en nombre de sites / plaquette).

3.7.2 Exploration par microscopie électronique

Seulement 4 patients (patients 1, 3, 5 et 9) avaient bénéficié d'un examen de microscopie électronique standard et donc d'une quantification des granules α et de l'analyse de la morphométrie des plaquettes. Il s'agissait de déterminer si un déficit en granules α était associé à une diminution des granules denses, mais aussi d'évaluer si des anomalies structurales pouvaient être retrouvées chez ces patients.

3.7.2.1 Quantification des granules α

Il n'y avait pas de déficit en granules α chez les 4 patients qui avaient eu une étude par microscopie électronique standard (patients 1, 3, 5 et 9), confirmant ainsi le déficit isolé en granules denses chez ces patients (tableau 8).

Tableau 8 : Quantification des granules α par microscopie électronique standard

| | Nombre de granules α pour 50 plaquettes |
|------------------|---|
| Moyenne patients | 358 |
| Moyenne témoins | 341 |

Le nombre moyen de granules α des patients était comparable à celui des témoins.

Cependant, on avait observé que leur répartition était très hétérogène, certaines plaquettes étant complètement dépourvues en granules α (figure 18).

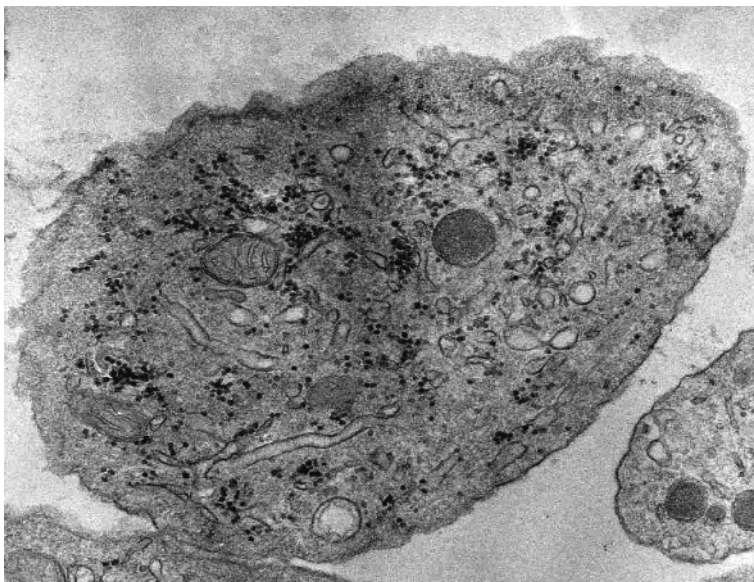


Figure 18 : Plaquettes pauvres en granules α (microscopie électronique en EPON)

3.7.2.2 Morphométrie plaquettaire

La microscopie électronique permet également d'étudier plus en détail la morphologie des plaquettes, comme leur aire ou leur forme.

Parmi les paramètres étudiés, il ne ressortait aucune différence d'aire ou de forme avec la moyenne observée chez les témoins. Ce résultat suggérait que la production plaquettaire était normale concernant ces paramètres (tableaux 9 et 10).

En revanche, pour un certain nombre de plaquettes, on pouvait observer des anomalies ultrastructurales, telles que de très larges vacuoles (figure 19) ou un système canaliculaire ouvert mal réparti (figure 20), en faveur d'un développement anormal de ces organelles.

Tableau 9 : Aire moyenne des plaquettes (en μm^2) et répartition des plaquettes selon l'aire

| | Aire | Aire > $4\mu\text{m}^2$ | Aire > $6\mu\text{m}^2$ | Aire > $8\mu\text{m}^2$ |
|-------------------------|------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Moyenne patients | 2,7 | 15% | 4% | 1% |
| Moyenne témoins | 2,8 | 16% | 4% | 1% |

Tableau 10 : Rapport moyen (R) « grand diamètre / petit diamètre » des plaquettes et répartition des plaquettes selon ce rapport.

| | R | 1 < R < 1,5 | 1 < R < 2 | 2 < R < 4 |
|-------------------------|-----|-------------|-----------|-----------|
| Moyenne patients | 2,5 | 16% | 35% | 59% |
| Moyenne témoins | 2,6 | 9% | 29% | 65% |

Plus le rapport est proche de 1, plus les plaquettes sont rondes

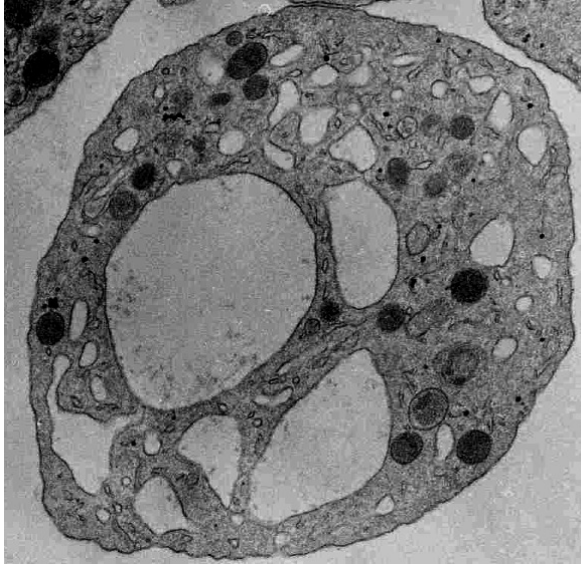


Figure 19 : Plaquette avec de larges vacuoles intracytoplasmiques (microscopie électronique en EPON)



Figure 20 : Plaquettes avec répartition anormale du système canaliculaire ouvert (microscopie électronique en EPON)

3.7.3 Exploration des granules denses plaquettaires

3.7.3.1 Mesure de la sécrétion d'ATP plaquettaire

La mesure de la sécrétion d'ATP plaquettaire par agrégométrie à luminescence permet de déterminer s'il y a un défaut du contenu granulaire dense sécrété.

Par rapport aux témoins, la mesure par luminescence de la sécrétion plaquettaire d'ATP était très fortement diminuée, voire absente, pour les 9 patients testés avec les trois inducteurs (TRAP, collagène et ADP). Il en était de même pour le patient 8 qui n'avait été testé qu'avec le TRAP.

Comme attendu, la différence de sécrétion entre les patients et les témoins était très significative quel que soit l'inducteur utilisé (figure 21).

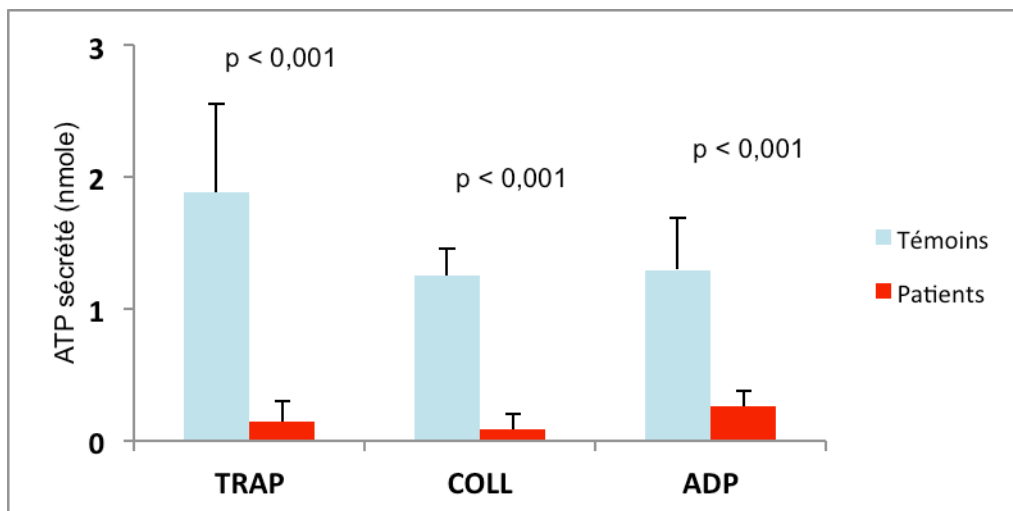


Figure 21 : Moyenne de la sécrétion d'ATP mesurée par luminescence (Chrono-log)

3.7.3.2 Mesure de la capture et de la sécrétion de mépacrine

La mesure par cytométrie de flux de la capture de mépacrine par les plaquettes permet de déterminer le pool de nucléotides contenu dans les granules denses avant et après sécrétion.

Neuf patients avaient été testés.

Les captures avant stimulation étaient significativement diminuées par rapport aux témoins, aussi bien à la concentration de mepacrine de 1,7 μM ($p = 0,001$) qu'à celle de 3,4 μM ($p = 0,006$).

En revanche, la capture après stimulation n'était pas significativement diminuée par rapport aux témoins ni à 1,7 μM de mepacrine ($p = 0,267$) ni à 3,4 μM ($p = 0,494$) (figure 22).

Au final, ces résultats mettaient en évidence la présence d'un défaut du contenu en nucléotides intraplaquettaires chez tous les patients.

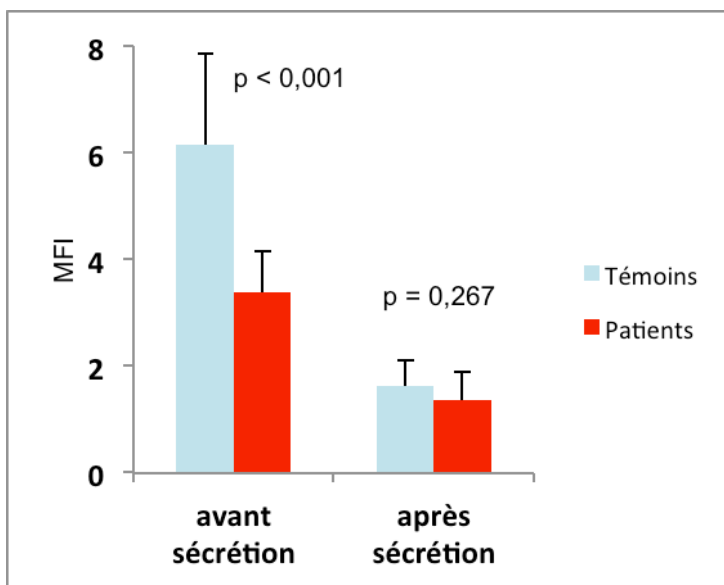


Figure 22 : MFI de la capture de mepacrine 1,7 avant et après sécrétion

Tableau 11 : MFI obtenues par cytométrie de flux des captures de mépacrine 1,7 μ M avant et après sécrétion.

| Patient | Capture avant sécrétion T | Capture après sécrétion T | Capture avant sécrétion P | Capture après sécrétion P |
|----------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 1 | 9,4 | 2,5 | 4,1 | 2,1 |
| 2 | 4,9 | 1,2 | 3,3 | 1,6 |
| 3 | 5,3 | 1,4 | 3,5 | 1,2 |
| 4 | 5,1 | 1,3 | 2,4 | 0,7 |
| 5 | 5,4 | 1,3 | 3,3 | 1,1 |
| 6 | 5,7 | 1,4 | 2,9 | 0,9 |
| 7 | 4,8 | 1,5 | 3,5 | 1,7 |
| 8 | 8,7 | 2,4 | 5,0 | 2,2 |
| 9 | - | - | - | - |
| 10 | - | - | 2,3 | 0,7 |
| 11 | - | - | - | - |
| moyenne | 6,2 | 1,6 | 3,4 | 1,3 |

P : Patient

T : Témoin du jour

Capture avant sécrétion : valeur en MFI

Capture après sécrétion : valeur en MFI

3.7.3.3 Etude de l'expression du CD63

La mesure par cytométrie de flux de l'expression du CD63 à la surface des plaquettes après activation est un reflet du nombre de granules denses sécrétés. Dans la delta-SPD, la faible expression du CD63 par rapport au témoin correspond à la présence d'un déficit quantitatif. En revanche, l'expression normale du CD63 révèle un déficit qualitatif (de contenu des granules).

Huit patients avaient été testés. Pour 5 patients, l'expression du CD63 était nettement diminuée par rapport à leurs témoins (patients 1, 2, 3, 6 et 8), avec un ratio de sécrétion inférieur à 30% (tableau 12).

Les 3 autres patients (patients 5, 7 et 10) avaient une expression du CD63 supérieure à 50% de la moyenne des témoins et même supérieure à 70% pour deux d'entre eux (patients 5 et 10). Pour ces 3 patients, les MFI corrigées étaient

supérieures à 1,7 (moyenne : 2,2). Pour les 5 autres, les MFI corrigées étaient nettement inférieures à 1 (moyenne : 0,53). On peut donc considérer que les patients 5 et 10 présentaient une expression sensiblement normale du CD63.

Le patient 7 présentait plutôt une expression légèrement diminuée.

Même en prenant en compte ces 3 patients exprimant le CD63 normalement ou avec une légère diminution, on retrouvait une différence significative entre les MFI des témoins et celles des patients (figure 23).

Tableau 12 : Expression du CD63 (MFI) et ratio de sécrétion du CD63 (en %)

| Patient | Expression du CD63 (P) | Expression du CD63 (T) | Ratio de sécrétion du CD63 |
|----------------|------------------------|------------------------|----------------------------|
| 1 | 0,24 | 5,61 | 8% |
| 2 | 0,87 | 4,33 | 29% |
| 3 | 0,63 | 1,59 | 21% |
| 4 | - | - | - |
| 5 | 2,18 | 3,55 | 72% |
| 6 | 0,17 | 1,07 | 6% |
| 7 | 1,74 | 2,29 | 57% |
| 8 | 0,76 | 2,78 | 25% |
| 9 | - | - | - |
| 10 | 2,67 | - | 88% |
| 11 | - | - | - |
| Moyenne | 1,16 | 3,03 | 38% |

P : patient

T : Témoin

Ratio de sécrétion du CD63 : ratio de l'expression du CD63 du patient par rapport la moyenne des témoins

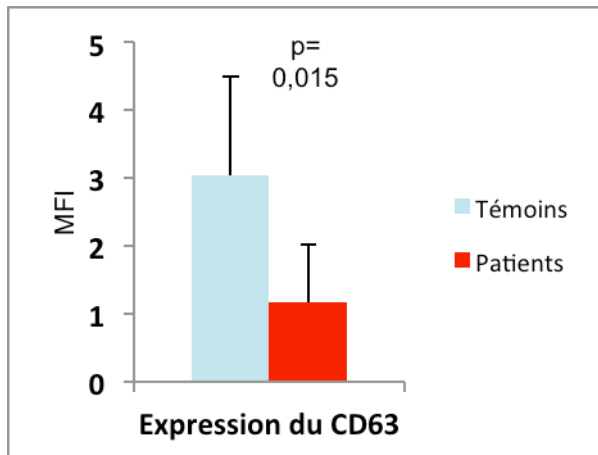


Figure 23 : Expression moyenne du CD63 après activation par du TRAP (60 μ M)

3.7.3.4 Quantification des granules denses par la technique des whole mounts

Chez les témoins, la moyenne du nombre de granules denses était de 290 pour 100 plaquettes. Dans notre population, la moyenne était abaissée à 112 granules denses pour 100 plaquettes (figure 16). La différence entre les patients et les témoins était significative.

Seuls 2 patients sur les 9 (patients 5 et 7) avaient un nombre de granules supérieur à 50% de la moyenne des témoins ; il s'agissait des 2 patients ayant une expression normale du CD63.

Aucune microscopie électronique n'avait été réalisée pour le patient 10.

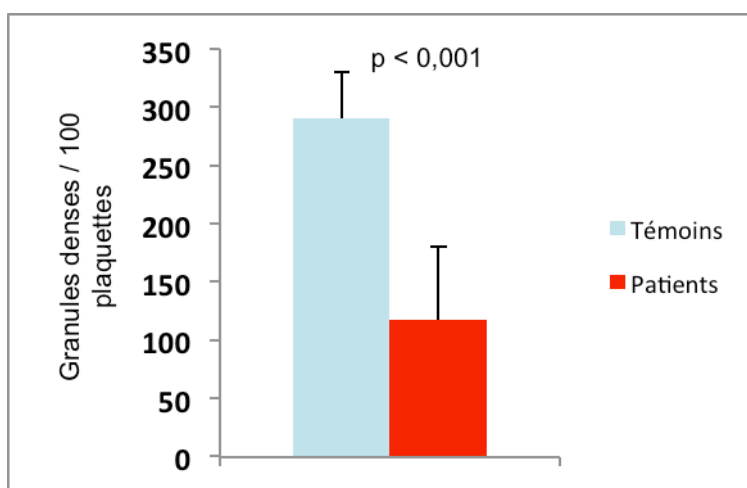


Figure 24 : Nombre moyen de granules denses pour 100 plaquettes (microscopie électronique – technique des whole mounts -)

3.7.3.5 Synthèse des résultats des examens d'exploration des granules denses

A partir des examens précédents, le type de déficit présenté par chaque patient a pu être déterminé (tableaux 13 et 14).

Les patients 5 et 10 avaient des profils très similaires avec une nette diminution de la sécrétion d'ATP et de la capture de mépacrine. Cependant, l'expression du CD63 après activation était normale. L'expression normale du CD63, marqueur d'un nombre normal de granules denses, était confirmée chez le patient 5 par la quantification des granules denses par microscopie électronique. Il est probable que si la microscopie électronique avait été réalisée chez le patient 10, on aurait aussi trouvé un nombre normal de granules denses. Ces deux patients présentaient donc un **déficit qualitatif** (de contenu) des granules denses.

Le patient 7 présentait une diminution modérée de l'expression du CD63, confirmée par une diminution modérée du nombre de granules. La sécrétion d'ATP était nettement diminuée par rapport à celle de son témoin. La capture de mépacrine était elle aussi diminuée. On avait donc probablement un **déficit quantitatif partiel**.

Il en était sûrement de même pour le patient 11 qui avait la même diminution du nombre de granules denses et de la sécrétion d'ATP. Les autres examens n'avaient pas été réalisés mais il est très probable que les résultats auraient été comparables à ceux du patient 7.

Tous les autres patients (patients 1, 2, 3, 4, 6, 8 et 9) avaient une diminution marquée des résultats de chacune des analyses spécifiques des granules denses. Ils présentaient donc une delta-SPD avec un **déficit quantitatif sévère**.

Tableau 13 : Récapitulatif des types d'anomalies des granules denses en fonction des résultats des examens spécifiques

| | Déficit quantitatif | Déficit qualitatif | Défaut de sécrétion |
|---------------------------------|------------------------|-----------------------|------------------------|
| Sécrétion d'ATP (Chrono-log) | ↘ | ↘ | ↘ |
| Capture mépacrine (état basal) | ↘ | ↘ | N |
| Capture mépacrine (état activé) | N | N | ↗ |
| Expression du CD63 | ↘ | N | ↘ |
| Nombre de GD (whole mounts) | ↘ | N | N |

↘ : diminution

↗ : augmentation

N : Normal(e)

GD : granules denses

Tableau 14 : Récapitulatif des principaux résultats concernant les examens sur les granules denses

| Patient | Sécrétion d'ATP | Capture avant sécrétion | Expression du CD63 | GD/100 plaquettes | Type de déficit |
|---------|--------------------|-------------------------------|-----------------------|----------------------|---------------------|
| 1 | - | ↘ | ↘ | ↘ | Quantitatif sévère |
| 2 | ↘ | ↘ | ↘ | ↘ | Quantitatif sévère |
| 3 | ↘ | ↘ | ↘ | ↘ | Quantitatif sévère |
| 4 | ↘ | ↘ | - | ↘ | Quantitatif sévère |
| 5 | ↘ | ↘ | N | N | Qualitatif |
| 6 | ↘ | ↘ | ↘ | ↘ | Quantitatif sévère |
| 7 | ↘ | ↘ | légèrement ↘ | légèrement ↘ | Quantitatif partiel |
| 8 | ↘ | ↘ | ↘ | ↘ | Quantitatif sévère |
| 9 | ↘ | - | - | ↘ | Quantitatif sévère |
| 10 | ↘ | ↘ | N | - | Qualitatif |
| 11 | ↘ | - | - | légèrement ↘ | Quantitatif partiel |

Sécrétion d'ATP : en nmoles - inducteur TRAP

Capture avant sécrétion : mépacrine 1,7µM - MFI moyenne des plaquettes du patient

Expression du CD63 : différence des MFI corrigées, avant et après sécrétion

GD/100 plaquettes : nombre de granules denses pour 100 plaquettes

3.7.3.6 *Corrélation entre le type de déficit et le syndrome hémorragique*

Une corrélation entre le type de déficit - quantitatif partiel, quantitatif sévère ou qualitatif - et la gravité du syndrome hémorragique avait été recherchée (tableau 15).

Aucun lien ne paraissait se dégager entre ces deux paramètres. Nous ne pouvons cependant pas vraiment conclure à l'absence de corrélation entre le type de déficit et la gravité du syndrome hémorragique à cause des effectifs très faibles dans chacun des groupes.

Tableau 15 : Score OMS de gravité des hémorragies et type de déficit en granules denses pour chaque patient

| patient | score OMS | Type de déficit |
|----------------|------------------|------------------------|
| 1 | 2 | Quantitatif |
| 2 | 4 | Quantitatif |
| 3 | 3 | Quantitatif |
| 4 | 2 | Quantitatif |
| 5 | 2 | Qualitatif |
| 6 | 3 | Quantitatif |
| 7 | 2 | Quantitatif partiel |
| 8 | 2 | Quantitatif |
| 9 | 2 | Quantitatif |
| 10 | 3 | Qualitatif |
| 11 | 3 | Quantitatif partiel |

4 Discussion

La maladie du pool vide delta plaquettaire est une thrombopathie rare. Elle occasionne des hémorragies dont la gravité est très variable. Cette variabilité semble être un reflet de la diversité des étiologies - congénitales et acquises - et des mécanismes biologiques. Le diagnostic biologique est difficile et nécessite des tests spécialisés.

Devant la rareté et la méconnaissance de la maladie, la diversité des signes cliniques et les difficultés diagnostiques, il est probable que la prévalence des delta-SPD soit sous-estimée. Cette étude rétrospective propose de faire le point sur 11 cas de delta-SPD diagnostiqués et explorés au CRPP de Bordeaux. Il s'agit ainsi d'améliorer la connaissance des caractéristiques cliniques des populations atteintes et de mieux établir les étapes indispensables à la démarche diagnostique biologique.

4.1 Syndrome Hémorragique

Les hémorragies étaient essentiellement cutanéomuqueuses : hématomes, épistaxis, saignements importants dans les suites de gestes chirurgicaux. Elles correspondaient aux types de saignements attendus dans les troubles de l'hémostase primaire et donc dans les delta-SPD (6).

La gravité des hémorragies dans notre population était majoritairement modérée (score OMS = 2). Cinq patients (45%) présentaient tout de même des hémorragies sévères (score OMS = 3) ou très sévères (1 patient avait un score OMS = 4).

Classiquement, la delta-SPD est associée à des hémorragies modérées. Le diagnostic peut même ne pas être porté dans le cadre de saignements minimes (6) ; ce qui va d'ailleurs dans le sens d'une probable sous-estimation du nombre de patients atteints de delta-SPD (32). Mais ces hémorragies peuvent malgré tout être sévères voire mortelles dans certains cas (6).

Dans notre étude, il faut noter une possible surestimation d'un cas parmi les plus sévères. En effet, le patient 10 (score OMS = 3) ne présentait plus de

saignements lorsque son traitement anticoagulant (pour valve cardiaque) avait été adapté à dose préventive afin de prendre en compte sa thrombopathie.

Dans notre population, les types de saignements et leurs gravités semblaient donc en accord avec ce qui est décrit à propos des delta-SPD. La diversité de la gravité des symptômes hémorragiques y était bien représentée. On pourrait supposer que cette diversité est liée à la variabilité de l'importance du déficit en granules denses, à la diversité des pathologies associées (tant congénitales qu'acquises) et aux différents types de delta-SPD (atteinte quantitative ou qualitative), mais malheureusement dans notre étude, du fait du faible effectif, nous n'avons pas pu observer cette association.

4.2 Étiologies

Malgré une cohorte ne comptant que 11 patients, la diversité dans les pathologies associées à la delta-SPD ressort assez nettement.

Les formes constitutionnelles ou congénitales sont très rares. Ainsi, seulement 2 patientes de notre population avaient une étiologie constitutionnelle (patients 1 et 8). La première était atteinte de HPS, classiquement à l'origine de delta-SPD (5,48). La seconde avait une delta-SPD isolée.

En l'absence d'antécédents personnels et familiaux d'épisodes hémorragiques et en dehors des formes syndromiques ou des pathologies connues comme étant associées à une delta-SPD acquise, la distinction entre étiologies congénitales et étiologies acquises peut parfois être difficile. Les symptômes hémorragiques peuvent être minimes chez des patients ayant une atteinte isolée. On peut supposer que le diagnostic pourrait ne pas être porté tant qu'un geste invasif ne vient pas révéler le risque augmenté de saignements.

Ainsi, 2 patientes avaient des étiologies indéterminées (patients 9 et 11). La patiente 11 par exemple, avait-elle déjà un déficit partiel en granules denses, révélé par ses saignements suite au geste invasif ? Ou bien ce déficit est-il apparu parallèlement et à cause de sa pathologie ? Un antécédent familial de saignements (chez la mère) tendrait à considérer sa delta-SPD comme congénitale. Mais le diagnostic tardif et le contexte clinique ne permettent pas d'en être certain.

Il y avait 7 patients avec des delta-SPD acquises, toutes associées à des hémopathies (essentiellement syndromes myélodysplasiques, syndromes myéloprolifératifs ou leucémies). Cette association « hémopathies - delta-SPD » a été quelquefois décrite dans la littérature.

- Par exemple, dans l'étude de Nieuwenhuis (1987) (32), parmi les 55 patients présentant une delta-SPD acquise, une majorité d'entre eux étaient atteints d'hémopathies. Ces atteintes hématologiques étaient réparties ainsi : 8 leucémies aiguës, 8 syndromes myélodysplasiques et 18 syndromes myéloprolifératifs, mais aussi 2 leucémies lymphoïdes chroniques, un lymphome de Hodgkin et une maladie de Waldenstrom ; 69% des delta-SPD acquises étaient donc associées à une hémopathie.
- L'évaluation par Manoharan (2002) (26) des fonctions plaquettaires chez 48 patients myélodysplasiques montrait une hypoactivité plaquettaire importante chez la majorité d'entre eux.

Les mesures étaient faites par lumi-agrégométrie plaquettaire en sang total. Il s'agit d'un test mesurant en même temps :

- l'agrégation plaquettaire par impédancemétrie,
- la sécrétion d'ATP par mesure de la luminescence produite par la réaction avec l'ATP du couple luciférine/luciférase ajouté au milieu.

Le principe est analogue à celui de l'appareil Chrono-log de notre étude.

L'hypoactivité était déterminée par la diminution de l'agrégation et/ou de la luminescence. Comme on le voit sur la figure 25 issue de cet article, un défaut de sécrétion d'ATP était alors très fréquent avec les inducteurs utilisés (ADP, acide arachidonique et collagène). Plus de 30 des 48 patients testés présentaient une sécrétion diminuée. Même si cette hyposécrétion n'était pas forcément due à un déficit en granules denses, il est possible que plusieurs cas de delta-SPD auraient été diagnostiqués si les investigations avaient été orientées en ce sens.

Figure 25 : Nombre de patients ayant une sécrétion « hypoactive », « normale » ou « hyperactive » en fonction de l'inducteur (26)

Résumé des résultats de la sécrétion d'ATP chez 48 patients avec une myélodysplasie, mesurée par lumi-agrégométrie plaquettaire en sang total. Les patients sont numérotés de 1 à 48 en ordonnée. La sécrétion pour chaque inducteur était considérée comme « hypoactive » (noir), « normale » (blanc) ou « hyperactive » (gris) selon les intervalles de référence établis. Les inducteurs utilisés sont en

abscisse. AA, acide arachidonique; ADP, adénosine diphosphate ; COLL, collagène; Rist, ristocétine ; IIa, thrombine.

- De même, l'étude de Mohri H. (1986) (49) indiquait des résultats similaires chez des patients atteints de LMC. La lumi-agrégométrie montrait chez les 12 patients testés une diminution de la sécrétion d'ATP, notamment en réponse à l'ADP et à l'épinéphrine. Les dosages des concentrations plaquettaires d'ADP et d'ATP mettaient en évidence une diminution plus importante de la concentration d'ADP et donc une augmentation du ratio ATP/ADP par rapport aux témoins.

Le contenu granulaire dense ayant un rapport de concentration ATP/ADP inférieur à celui du reste du cytoplasme plaquettaire, la diminution importante de l'ADP et l'augmentation du rapport ATP/ADP intraplaquettaire global sont le signe d'un déficit en granules denses, qu'il soit quantitatif ou qualitatif (figure 26).

Ces résultats semblent en faveur d'une delta-SPD qui serait fréquemment associée à la LMC.

* : $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$

Figure 26 : Concentrations d'ATP et d'ADP dans les plaquettes à l'état basal et rapport ATP/ADP chez des patients atteints de LMC (49)

Ces études permettent de mettre en évidence la fréquence probablement sous-estimée des delta-SPD associées aux hémopathies. La prévalence élevée de l'association « hémopathies - delta-SPD » dans notre étude semble compatible avec les résultats évoqués ci-dessus. Un dépistage plus fréquent permettrait peut-être de mieux prendre en charge les patients ayant une delta-SPD si ces derniers venaient à présenter un épisode hémorragique.

4.3 Profils des tests d'agrégation plaquettaire dans la maladie du pool vide delta plaquettaire

L'agrégation plaquettaire pratiquée chez nos patients permettait de dégager globalement un profil avec une hypoagrégation en réponse à la majorité des inducteurs testés, sauf à la ristocétine. Avec l'ADP, l'hypoagrégation était souvent accompagnée d'une réversibilité, témoin de l'absence de seconde vague

d'agrégation due à la sécrétion des granules denses. L'agrégation au collagène et à l'acide arachidonique était aussi diminuée. Cependant, outre certaines difficultés d'interprétation dues à un taux de plaquettes parfois insuffisant dans le PRP, ce profil globalement dégagé n'était pas parfaitement homogène d'un patient à l'autre. Certains profils s'avéraient quasiment normaux à l'ADP (patients 7 et 8), tandis que d'autres présentaient malgré tout une légère diminution de l'agrégation à la ristocétine (patients 1, 2, 5 et 6).

Le profil que l'on a globalement dégagé correspond à ce qui est classiquement décrit à propos de la delta-SPD (figure 27) (40).

Figure 27 : Profil d'agrégation plaquettaire attendu dans une maladie du pool vide ou un défaut de sécrétion (40)

AA : acide arachidonique

De même, le fait que les profils n'étaient pas tous typiques est aussi parfaitement décrit par Nieuwenhuis. En effet, dans cette publication (32), ce profil typique - jugé sur la diminution de l'agrégation en réponse à l'ADP, à l'épinéphrine et au collagène - n'était retrouvé que chez 33% des sujets testés. 44% avaient au moins une anomalie et 23% n'en avaient aucune.

Il est donc important de ne pas s'attendre systématiquement à trouver un profil d'agrégation plaquettaire typique d'un déficit en granules dans une delta-SPD. Ainsi, la normalité des tests n'exclut pas une delta-SPD. En effet, face à un test d'agrégation normal et si le contexte est évocateur, il ne faudrait pas hésiter à poursuivre les investigations pour rechercher la présence d'un éventuel défaut des granules denses.

4.4 Expression des principales glycoprotéines membranaires dans la maladie du pool vide delta plaquettaire

Malgré l'absence d'une différence statistiquement significative de l'expression des glycoprotéines chez les malades par rapport aux témoins, à l'état basal comme

après activation, une tendance semblait se dessiner pour la P-sélectine : on notait un profil d'expression à l'état activé légèrement plus faible que celui des témoins.

Ce léger défaut d'expression de P-sélectine aurait pu être interprété comme un déficit en granules α . Mais on ne retrouve pas un tel déficit par microscopie électronique pour aucun des 4 patients chez qui la morphométrie a été réalisée. On peut donc supposer qu'il s'agit plutôt d'une activation moins importante des plaquettes avec globalement une moindre sécrétion des granules α même s'ils sont bien présents.

La publication récente de Ronghua (50) semble confirmer une telle diminution de la sécrétion des granules α – et dans une moindre mesure des lysosomes - qui serait la conséquence du déficit en granules denses. En effet, la sécrétion des granules α chez un modèle de souris Hermansky-Pudlak est abaissée aux doses normales d'inducteurs. Cependant cette sécrétion est restaurée aux hautes doses ou avec l'ajout d'ADP dans le milieu : cela suggère que la sécrétion du contenu granulaire dense est indispensable à la bonne sécrétion des autres granules. Cette diminution de la sécrétion des granules α dans la delta-SPD contribue aussi probablement au risque hémorragique dans le syndrome de Hermansky-Pudlak.

4.5 Mégacaryocytopoïèse et déficit en granules denses

Dans le syndrome des plaquettes grises, on retrouve classiquement (51) :

- des anomalies structurales plaquettaires visibles par microscopie optique - présence de macroplaquettes et absence de granules - ,
- une thrombopénie à la numération.

NBEAL2 est l'un des principaux gènes à l'origine du syndrome des plaquettes grises. Il code une protéine impliquée dans la gestion de la circulation vésiculaire. La culture des mégacaryocytes de souris homozygotes pour une perte de fonction de *NBEAL2*, montre de nombreuses anomalies : retard de maturation, survie diminuée, hypoploïdie, etc.

Chez les patients atteints de delta-SPD, il n'y a généralement ni thrombopénie (en dehors d'une thrombopénie due à une hémopathie associée), ni anomalie de la taille des plaquettes (14). Cependant, nous avons noté des anomalies

morphologiques sur certaines plaquettes dans notre cohorte : présence de larges vacuoles cytoplasmiques ou répartition anormale du système canaliculaire ouvert.

L'étude des mégacaryocytes de patients atteints de delta-SPD pourrait peut-être mettre en évidence des anomalies morphologiques, comme dans le syndrome des plaquettes grises. En effet, le déficit en granules denses semble dû à une anomalie des précurseurs de la lignée mégacaryocytaire, comme le montrait la correction du phénotype hémorragique après des greffes de moelles osseuses chez des modèles de souris avec un syndrome de Hermansky-Pudlak ou de Chediak-Higashi (52).

4.6 Les différentes formes de delta-SPD

Dans la population de notre étude, nous avons retrouvé deux types de delta-SPD, à savoir des déficits quantitatifs et des déficits qualitatifs (de contenu). L'analyse de l'ensemble des examens pratiqués sur les granules denses nous a permis de distinguer ces deux principaux types.

Tableau 16 : Récapitulatif des types d'anomalies des granules denses en fonction des résultats des examens spécifiques

| | Déficit quantitatif | Déficit qualitatif | Défaut de sécrétion |
|---------------------------------|---------------------|--------------------|---------------------|
| Sécrétion d'ATP (Chrono-log) | ↘ | ↘ | ↘ |
| Capture mépacrine (état basal) | ↘ | ↘ | N |
| Capture mépacrine (état activé) | N | N | ↗ |
| Expression du CD63 | ↘ | N | ↘ |
| Nombre de GD (whole mounts) | ↘ | N | N |

↘ : diminution

↗ : augmentation

N : Normal(e)

GD : granules denses

Les déficits quantitatifs étaient les plus fréquents (7 patients sur 11).

Les deux déficits qualitatifs étaient associés à des delta-SPD acquises. Cela n'exclut pas que ce mécanisme puisse être retrouvé avec des étiologies congénitales.

Jedlitschky G. (2010) (23) étudiait un sous-type de delta-SPD héréditaire allant dans ce sens. Le gène *MRP4* produit la protéine ABCC4 (ATP-binding

cassette, sub-family C, member 4 protein) impliquée dans le transport d'ATP. Par microscopie à immuno-fluorescence, le marquage de cette protéine montre que celle-ci est retrouvée spécifiquement au niveau des granules denses chez les témoins ; elle est absente chez les patients. Mais un immuno-marquage de LAMP2 (spécifique des granules denses) démontre la présence des granules denses en quantité similaire à celle du témoin. Ces patients présentaient donc une delta-SPD avec un déficit qualitatif d'origine congénitale.

Figure 28 : Image par microscopie à fluorescence du marquage granulaire par des anticorps anti-MRP4 (rouge) uniquement – à gauche, B et D ; et marquage par l'association d'anti-MRP4 (rouge) et d'anti-LAMP2 (vert) – à droite, C et E. Le témoin est en haut (B et C) et le patient atteint de delta-SPD en bas (D et E). La présence au même endroit de MRP4 et de LAMP2, au niveau des granules denses, donne une fluorescence jaune.

Quel que soit le type de déficit, on a vu que la mesure de la sécrétion d'ATP était systématiquement diminuée. Si elle permettait de dépister une anomalie, elle ne pouvait distinguer une atteinte quantitative d'une atteinte qualitative ou d'un défaut de sécrétion.

En revanche, la mesure par cytométrie de flux de la capture de mépacrine apporte une information plus discriminante. Le principe du dépistage des delta-SPD - quel que soit le type - à l'aide de l'évaluation de la capture de mépacrine à l'état basal est initialement décrit par Gordon N. (53), aussi bien sur des delta-SPD acquises que congénitales.

S'accumulant rapidement et spécifiquement dans les granules denses (54), la capture de mépacrine à l'état basal permet d'avoir une idée du contenu en ATP/ADP des plaquettes. Dans le cadre d'une anomalie de la sécrétion, le contenu granulaire n'est pas atteint et la capture est alors normale. Dans le cas d'une delta-SPD, qu'il n'y ait pas de granules (déficit quantitatif) ou que le contenu en nucléotides soit absent (déficit qualitatif), la capture est diminuée.

Cependant, la capture après activation ne différerait pas de celle des témoins, signifiant ainsi que la sécrétion avait bien eu lieu. Une anomalie de sécrétion donnerait une capture après sécrétion augmentée.

L'expression du CD63 permet une évaluation de la quantité de granules denses sécrétés. Elle sera diminuée dans un trouble de la sécrétion mais également s'il y a un déficit quantitatif des granules denses. Si une anomalie de la sécrétion est éliminée des hypothèses diagnostiques grâce à une capture de mépacrine normale à l'état basal, la diminution de l'expression du CD63 est alors un reflet d'un déficit quantitatif en granules denses. En revanche, une expression normale du CD63 signifie un nombre normal de granules denses : il s'agit alors d'un déficit de type qualitatif.

On comprend dès lors qu'il n'est pas indispensable de procéder à la microscopie électronique avec la technique des whole mounts pour quantifier le nombre de granules denses, bien qu'il soit rassurant d'avoir des tests qui vont dans le même sens. Le test de capture de mépacrine et la mesure de l'expression du CD63 pourraient à eux seuls permettre de différencier tous les cas possibles, du déficit quantitatif au déficit qualitatif, en passant par le défaut de sécrétion. L'association de ces deux tests, qui ne nécessitent qu'un cytomètre, permettrait à des laboratoires non équipés d'un microscope électronique d'établir un diagnostic précis.

Il convient cependant de modérer ce propos car, comme le montre les nombres variables de granules denses dans notre population, le déficit n'est que rarement total. La standardisation des techniques prend alors toute son importance pour mettre en place des valeurs de référence (40). Les seuils diagnostiques pourraient alors être bien établis dans la population générale.

Mais aussi, les mécanismes des différentes delta-SPD n'étant pas encore parfaitement connus, rien n'exclut la possibilité d'une association des déficits quantitatif et qualitatif dans des proportions variables. Le type de déficit serait alors plus difficile à interpréter avec les deux seuls examens cités. La microscopie électronique garde ainsi l'avantage de visualiser directement les granules et d'établir avec certitude le niveau du déficit quantitatif.

Conclusion

La *maladie du pool vide delta plaquettaire* représente en réalité un groupe hétérogène d'atteintes des granules denses. Certaines avancées ont été réalisées concernant les mécanismes causaux chez les patients atteints de delta-SPD d'origine congénitale. Il s'agit surtout, à l'image des déficits en granules alpha, d'anomalies touchant des protéines impliquées dans la circulation des vésicules lors de leur formation. Mais beaucoup reste à découvrir concernant les causes des delta-SPD acquises.

L'analyse des cas diagnostiqués au CHU de Bordeaux a permis de confirmer les principaux éléments clinico-biologiques précédemment observés et rapportés dans la littérature.

Le diagnostic biologique passe d'abord par l'élimination des principales autres causes de saignements, telles qu'un déficit en facteurs de la coagulation ou une maladie de Willebrand. L'agrégation plaquettaire peut orienter vers un déficit en granules, mais n'a pas toujours un profil spécifique. De même, l'étude des glycoprotéines GPIb, GPIIb et P-sélectine ne montre qu'un léger défaut d'activation, difficile à discerner.

Les examens les plus utiles au diagnostic sont surtout la capture de mépacrine avant activation et l'expression du CD63 après activation. Ils permettent en effet la caractérisation du déficit, quantitatif ou qualitatif. La microscopie électronique permet également de trancher entre ces deux types de déficits, notamment dans les cas tendancieux. Enfin, la mesure de la sécrétion d'ATP reste un examen de dépistage important car sensible, mais englobe aussi les anomalies de la sécrétion et ne permet pas d'orienter spécifiquement sur le type de déficit.

Au final, nos résultats montrent que : (i) le syndrome hémorragique peut parfois être sévère ; (ii) la diversité des pathologies associées est grande ; (iii) le phénotype biologique plaquettaire est très variable d'un patient à l'autre et nécessite des examens très spécialisés ; enfin, (iv) la présence d'anomalies ultrastructurales des plaquettes intéresse essentiellement le système canaliculaire ouvert et la répartition des granules α .

Bibliographie

1. Ajzenberg N. Hémostase (Master M1). 2013; Laboratoire d'hématologie, hôpital Bichat.
2. RW Colman, J Hirsh, VJ Marder and EW Salzman. Anatomy and structural organization of the platelet. Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice. 3ème édition. p. 398.
3. Philippe de Moerloose, Françoise Boehlen. HEMOSTASE 2005-2006. Cours d'hémostase presented at; 2005 2006; Service d'Angiologie et Hémostase, Hôpitaux Universitaires et Faculté de Médecine de Genève.
4. Wei AH, Schoenwaelder SM, Andrews RK, Jackson SP. New insights into the haemostatic function of platelets. *Br J Haematol*. 2009 Nov;147(4):415–30.
5. Masliah-Planchon J, Flaujac C, Tapon-Bretonnière J, Cramer-Bordé EM, Darnige L. Review: delta-storage pool disease. *Ann Biol Clin (Paris)*. 2008 Jul 1;66(4):365–9.
6. Masliah-Planchon J, Darnige L, Bellucci S. Molecular determinants of platelet delta storage pool deficiencies: an update. *Br J Haematol*. 2013 Jan;160(1):5–11.
7. Stenberg PE, McEver RP, Shuman MA, Jacques YV, Bainton DF. A platelet alpha-granule membrane protein (GMP-140) is expressed on the plasma membrane after activation. *J Cell Biol*. 1985 Sep;101(3):880–6.
8. Koseoglu S, Flaumenhaft R. Advances in platelet granule biology. *Curr Opin Hematol*. 2013 Sep;20(5):464–71.
9. Youssefian T, Cramer EM. Megakaryocyte dense granule components are sorted in multivesicular bodies. *Blood*. 2000 Jun 15;95(12):4004–7.
10. Polgár J, Lane WS, Chung S-H, Hough AK, Reed GL. Phosphorylation of SNAP-23 in activated human platelets. *J Biol Chem*. 2003 Nov 7;278(45):44369–76.
11. Polgár J, Chung S-H, Reed GL. Vesicle-associated membrane protein 3 (VAMP-3) and VAMP-8 are present in human platelets and are required for granule secretion. *Blood*. 2002 Aug 1;100(3):1081–3.
12. 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 Apr;91(4):1775–82.

13. Golebiewska EM, Poole AW. Secrets of platelet exocytosis - what do we really know about platelet secretion mechanisms? *Br J Haematol*. 2013 Nov 30;
14. Sandrock K, Zieger B. Current Strategies in Diagnosis of Inherited Storage Pool Defects. *Transfus Med Hemotherapy Off Organ Dtsch Ges Transfusionsmedizin Immunhamatologie*. 2010;37(5):248–58.
15. Mori K, Suzuki S, Sugai K. Electron microscopic and functional studies on platelets in gray platelet syndrome. *Tohoku J Exp Med*. 1984 Jul;143(3):261–87.
16. Nurden P, Jandrot-Perrus M, Combrié R, Winckler J, Arocas V, Lecut C, et al. Severe deficiency of glycoprotein VI in a patient with gray platelet syndrome. *Blood*. 2004 Jul 1;104(1):107–14.
17. Kahr WHA, Hinckley J, Li L, Schwertz H, Christensen H, Rowley JW, et al. Mutations in NBEAL2, encoding a BEACH protein, cause gray platelet syndrome. *Nat Genet*. 2011 Aug;43(8):738–40.
18. Bottega R, Pecci A, De Candia E, Pujol-Moix N, Heller PG, Noris P, et al. Correlation between platelet phenotype and NBEAL2 genotype in patients with congenital thrombocytopenia and α -granule deficiency. *Haematologica*. 2013 Jun;98(6):868–74.
19. Monteferrario D, Bolar NA, Marneth AE, Hebeda KM, Bergevoet SM, Veenstra H, et al. A dominant-negative GFI1B mutation in the gray platelet syndrome. *N Engl J Med*. 2014 Jan 16;370(3):245–53.
20. Cattaneo M. Inherited platelet-based bleeding disorders. *J Thromb Haemost JTH*. 2003 Jul;1(7):1628–36.
21. Dell'Angelica EC, Mullins C, Caplan S, Bonifacino JS. Lysosome-related organelles. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. 2000 Jul;14(10):1265–78.
22. Nagle DL, Karim MA, Woolf EA, Holmgren L, Bork P, Misumi DJ, et al. Identification and mutation analysis of the complete gene for Chediak-Higashi syndrome. *Nat Genet*. 1996 Nov;14(3):307–11.
23. Jedlitschky G, Cattaneo M, Lubenow LE, Roskopf D, Lecchi A, Artoni A, et al. Role of MRP4 (ABCC4) in platelet adenine nucleotide-storage: evidence from patients with delta-storage pool deficiencies. *Am J Pathol*. 2010 Mar;176(3):1097–103.
24. Gerrard JM, McNicol A. Platelet storage pool deficiency, leukemia, and myelodysplastic syndromes. *Leuk Lymphoma*. 1992 Nov;8(4-5):277–81.
25. 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 Oct;25(4):289–95.

26. Manoharan A, Brighton T, Gemmell R, Lopez K, Moran S, Kyle P. Platelet dysfunction in myelodysplastic syndromes: a clinicopathological study. *Int J Hematol.* 2002 Oct;76(3):272–8.

27. Mittelman M, Zeidman A. Platelet function in the myelodysplastic syndromes. *Int J Hematol.* 2000 Feb;71(2):95–8.

28. Zeidman A, Sokolover N, Fradin Z, Cohen A, Redlich O, Mittelman M. Platelet function and its clinical significance in the myelodysplastic syndromes. *Hematol J Off J Eur Haematol Assoc EHA.* 2004;5(3):234–8.

29. Soslau G, Brodsky I. Hereditary sideroblastic anemia with associated platelet abnormalities. *Am J Hematol.* 1989 Dec;32(4):298–304.

30. Mouly S, Yojjssefian T, Souni F, Cramex E, Lefrere F, Varet B, et al. Acquired Delta-Storage Pool Deficiency Associated with Idiopathic Myelofibrosis. *Leuk Lymphoma.* 2000 Jan 1;37(5-6):623–7.

31. Weiss HJ, Rosove MH, Lages BA, Kaplan KL. Acquired storage pool deficiency with increased platelet-associated IgG. Report of five cases. *Am J Med.* 1980 Nov;69(5):711–7.

32. 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 Sep;70(3):620–3.

33. Favaloro EJ. The utility of the PFA-100 in the identification of von Willebrand disease: a concise review. *Semin Thromb Hemost.* 2006 Jul;32(5):537–45.

34. Kerényi A, Schlammadinger A, Ajzner E, Szegedi I, Kiss C, Pap Z, et al. Comparison of PFA-100 closure time and template bleeding time of patients with inherited disorders causing defective platelet function. *Thromb Res.* 1999 Dec 15;96(6):487–92.

35. Harrison P, Robinson MS, Mackie IJ, Joseph J, McDonald SJ, Liesner R, et al. Performance of the platelet function analyser PFA-100 in testing abnormalities of primary haemostasis. *Blood Coagul Fibrinolysis Int J Haemost Thromb.* 1999 Jan;10(1):25–31.

36. Fressinaud E, Veyradier A, Truchaud F, Martin I, Boyer-Neumann C, Trossaert M, et al. Screening for von Willebrand disease with a new analyzer using

- high shear stress: a study of 60 cases. *Blood*. 1998 Feb 15;91(4):1325–31.
37. O'Brien JR. Platelet aggregation Part I Some effects of the adenosine phosphates, thrombin, and cocaine upon platelet adhesiveness. *J Clin Pathol*. 1962 Sep 1;15(5):446–52.
38. Born GVR, Cross MJ. The aggregation of blood platelets. *J Physiol*. 1963;168(1):178–95.
39. Fiore M. Diagnostic des thrombopathies. Cours de DES de biologie médicale presented at; 2014 Oct 2; CRPP du CHU de Haut-Lévêque.
40. Harrison P, Mackie I, Mumford A, Briggs C, Liesner R, Winter M, et al. Guidelines for the laboratory investigation of heritable disorders of platelet function. *Br J Haematol*. 2011 Oct;155(1):30–44.
41. Ramström 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.
42. Lages B, Holmsen H, Weiss HJ, Dangelmaier C. Thrombin and ionophore A23187-induced dense granule secretion in storage pool deficient platelets: evidence for impaired nucleotide storage as the primary dense granule defect. *Blood*. 1983 Jan;61(1):154–62.
43. Maurer-Spurej E, Pittendreigh C, Wu JK. Diagnosing platelet delta-storage pool disease in children by flow cytometry. *Am J Clin Pathol*. 2007 Apr;127(4):626–32.
44. Amesse LS, Pfaff-Amesse T, Gunning WT, Duffy N, French JA. Clinical and laboratory characteristics of adolescents with platelet function disorders and heavy menstrual bleeding. *Exp Hematol Oncol*. 2013;2(1):3.
45. Almeida AM, Khair K, Hann I, Liesner R. The use of recombinant factor VIIa in children with inherited platelet function disorders. *Br J Haematol*. 2003 May;121(3):477–81.
46. Lefrère J-J, Schved J-F. *Transfusion en hématologie*. John Libbey Eurotext; 2010. 611 p.
47. Cattaneo M, Cerletti C, Harrison P, Hayward CPM, Kenny D, Nugent D, 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 JTH*. 2013 Apr 10;
48. Gahl WA, Huizing M. Hermansky-Pudlak Syndrome. In: Pagon RA, Adam MP,

Ardinger HH, Bird TD, Dolan CR, Fong C-T, et al., editors. GeneReviews(®) [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993 [cited 2015 Mar 23]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1287/>

49. Mohri H. Acquired von Willebrand disease and storage pool disease in chronic myelocytic leukemia. *Am J Hematol.* 1986 Aug;22(4):391–401.
50. Meng R, Wu J, Harper DC, Wang Y, Kowalska MA, Abrams CS, et al. Defective release of α granule and lysosome contents from platelets in mouse Hermansky-Pudlak syndrome models. *Blood.* 2015 Mar 5;125(10):1623–32.
51. Nurden AT, Nurden P. The gray platelet syndrome: clinical spectrum of the disease. *Blood Rev.* 2007 Jan;21(1):21–36.
52. Novak EK, McGarry MP, Swank RT. Correction of symptoms of platelet storage pool deficiency in animal models for Chediak-Higashi syndrome and Hermansky-Pudlak syndrome. *Blood.* 1985 Nov;66(5):1196–201.
53. 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 Jan;89(1):117–23.
54. Picotti GB, Da Prada M, Pletscher A. Uptake and liberation of mepacrine in blood platelets. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1976;292(2):127–31.

Le serment d'Hippocrate

« Au moment d'être admis à exercer la médecine, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité.

Mon premier souci sera de rétablir, de préserver ou de promouvoir la santé dans tous ses éléments, physiques et mentaux, individuels et sociaux.

Je respecterai toutes les personnes, leur autonomie et leur volonté, sans aucune discrimination selon leur état ou leurs convictions. J'interviendrai pour les protéger si elles sont affaiblies, vulnérables ou menacées dans leur intégrité ou leur dignité. Même sous la contrainte, je ne ferai pas usage de mes connaissances contre les lois de l'humanité.

J'informerai les patients des décisions envisagées, de leurs raisons et de leurs conséquences.

Je ne tromperai jamais leur confiance et n'exploiterai pas le pouvoir hérité des circonstances pour forcer les consciences.

Je donnerai mes soins à l'indigent et à quiconque me les demandera. Je ne me laisserai pas influencer par la soif du gain ou la recherche de la gloire.

Admis dans l'intimité des personnes, je tairai les secrets qui me seront confiés. Reçu à l'intérieur des maisons, je respecterai les secrets des foyers et ma conduite ne servira pas à corrompre les mœurs.

Je ferai tout pour soulager les souffrances. Je ne prolongerai pas abusivement les agonies. Je ne provoquerai jamais la mort délibérément.

Je préserverai l'indépendance nécessaire à l'accomplissement de ma mission. Je n'entreprendrai rien qui dépasse mes compétences. Je les entretiendrai et les perfectionnerai pour assurer au mieux les services qui me seront demandés.

J'apporterai mon aide à mes confrères ainsi qu'à leurs familles dans l'adversité.

Que les hommes et mes confrères m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses ; que je sois déshonoré et méprisé si j'y manque. »