



**HAL**  
open science

# Description clinique et biologique d'une population de patients réunionnais porteurs d'une même mutation fondatrice responsable du syndrome de Bernard-Soulier

Céline de Thoré

► **To cite this version:**

Céline de Thoré. Description clinique et biologique d'une population de patients réunionnais porteurs d'une même mutation fondatrice responsable du syndrome de Bernard-Soulier. Médecine humaine et pathologie. 2018. dumas-02088847

**HAL Id: dumas-02088847**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-02088847>**

Submitted on 3 Apr 2019

**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.

**THÈSE**

Pour l'obtention du

**DIPLOME d'ETAT de DOCTEUR EN MEDECINE**

Présentée et soutenue publiquement

Le 15 Octobre 2018

Par Céline DE THORE

Née le 17/12/1987 à SCHOELCHER (972)

**Description clinique et biologique d'une population de patients réunionnais  
porteurs d'une même mutation fondatrice responsable  
du syndrome de Bernard-Soulier**

Thèse dirigée par

Monsieur le Docteur Mathieu FIORE

Codirigée par

Madame le Docteur Hanitra RANDRIANAIVO

Rapporteur de thèse

Madame le Professeur Marie-Christine ALESSI

**Membres du Jury**

Madame le Professeur Chloé JAMES ..... Présidente

Madame le Professeur Estibaliz LAZARO .....Juge

Monsieur le Professeur Noël MILPIED ..... Juge

Madame le Docteur Bénédicte ROQUEBERT ..... Juge

Monsieur le Docteur Mathieu FIORE ..... Directeur et Juge

Madame le Docteur Isabelle KITTLER..... Juge

## REMERCIEMENTS

### **À Madame la Présidente du Jury**

#### Le Professeur Chloé JAMES

Professeur des Universités, Université Victor Segalen, Bordeaux 2.

Praticien Hospitalier, Chef de service d'Hématologie Biologique, CHU de Bordeaux.

Vous nous faites l'honneur d'avoir accepté la présidence de cette thèse. Soyez assurée de ma profonde reconnaissance.

### **À mon Directeur de thèse,**

#### Monsieur le Docteur Mathieu FIORE

Praticien hospitalier, Service d'Hématologie biologique, CHU de Bordeaux-GH Sud - Hôpital Haut-Lévêque.

Je tiens à t'exprimer ma profonde gratitude d'avoir accepté de diriger cette thèse, avec la difficulté ajoutée de la distance avec la Réunion puis la Martinique. Je te remercie également pour ta rigueur, tes connaissances pointues et ton esprit critique qui sont les qualités indéniables d'un bon scientifique. Je te suis très reconnaissante de la disponibilité que tu as su m'accorder ainsi que de la sérénité avec laquelle tu as balisé et aiguillé ce long travail. Enfin, merci du soutien, de l'attention, et de l'intérêt que tu as portés au sujet de cette thèse.

### **À ma co-directrice,**

#### Madame le Docteur Hanitra RANDRIANAIVO

Praticien hospitalier, Unité de génétique médicale Fœtopathologie et Oncogénétique, PFME

Hôpital de Saint-Pierre, CHU de La Réunion

Qui a su me donner les données tremplin indispensables au début de ce travail, et répondre à mes interrogations.

### **À mes Juges,**

#### Madame le Professeur Estibaliz LAZARO

Professeur des universités, praticien hospitalier, Service de médecine interne et maladies infectieuses (Sud) CHU de Bordeaux-GH Sud - Hôpital Haut-Lévêque

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.

#### Monsieur le Professeur Noël MILPIED

Professeur des Universités, Praticien Hospitalier, Chef de service d'Hématologie Clinique et Thérapie Cellulaire, CHU de Bordeaux

C'est un très grand honneur que vous nous faites en acceptant de juger ce travail. Veuillez trouver ici le témoignage de notre profond respect.

#### Madame le Docteur Bénédicte ROQUEBERT

Maitre de conférences des universités, Praticien hospitalier laboratoire de virologie

Coordonnateur du DES de Biologie médicale, région Océan Indien

CHU La Réunion, Site Félix Guyon

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 Isabelle KITTLER

Praticien Hospitalier, Service d'Hématologie Biologique, Hôpital de Saint-Pierre, CHU de La Réunion

Dont le parcours, l'exemplarité et les compétences m'ont toujours inspiré plus de perfectionnisme. Merci pour ta bonne humeur quotidienne et pour cette formation de qualité que tu nous as prodiguées.

C'est un honneur que tu nous fais d'accepter de juger ce travail.

### **Au Rapporteur de thèse**

#### Madame le Professeur Marie-Christine ALESSI

Professeur des Universités, Laboratoire d'Hématologie de l'Hôpital de La Timone, Marseille

Je vous suis très reconnaissante d'avoir accepté le rôle éminent de Rapporteur de Thèse, et de vous être ainsi livrée une relecture attentive accompagnée de commentaires constructifs à notre travail. Veuillez trouver l'expression de ma profonde estime ainsi que de toute ma gratitude.

**Au Dr Lanza**, pour sa patience et sa disponibilité afin de répondre à mes interrogations.

### **Au laboratoire d'hématologie du GHSR,**

A toute l'équipe dont la compétence et le travail, et l'efficacité ont permis la réalisation de ce travail.

Merci pour vos solides connaissances, votre assistance autant morale qu'intellectuelle ainsi que pour votre soutien indéfectible. Merci de m'avoir accueillie comme dans une grande famille. Mi aime a zot.

**A l'éminent chef de service, le Dr Clabe.** Je tiens à vous exprimer toute mon admiration pour le niveau de compétence élevé auquel vous aspirez pour les internes et techniciens du laboratoire d'hématologie de Saint-Pierre. Merci pour votre disponibilité, votre pédagogie, et votre sollicitude permanente. Vous avez su conforter mon choix dans la spécialité d'hématologie biologique choisie. Merci pour m'avoir soumis ce sujet de thèse, qui s'est révélé passionnant. Soyez assuré de ma sincère reconnaissance et de ma plus haute estime.

**Au Dr RAJOELY Bakoliarisoa,** ambassadrice de charme indéniable du laboratoire. Pour ta compétence transmise en hémostase, pour ta bonne humeur sans faille, et ta gentillesse extrême.

Une mention spéciale à l'équipe de cytométrie, pour leur aide et l'intérêt porté au sujet de la thèse. C'est un plaisir de travailler au quotidien avec Armel, alias le grand Maki, Sony, l'expert en photographie, et bien sûr l'éminent Jean-Paul, aussi compétent qu'agréable, et c'est peu dire.

Une mention spéciale pour Éloïse, Christine, Angélique, Agnès, Hélène, Olga, Sonia, et Laura qui ont su rendre le quotidien (et les soirées) bien plus agréables.

Merci Nael pour ton écoute, ton humour, et tes conseils toujours éclairés.

Merci à mes co-internes et amis Alexandre, Mathieu et Cloé. C'était nécessaire de vous avoir sur bien des points.

**A la fabuleuse équipe de PMA,** Hélène (ma colocataire adorée), Joffrey (le Hugh Grant de la Réunion), Karine (ma jumelle bliss), Catherine, Emmanuelle et Eva (mon coach de vie) qui ont su m'entourer autant physiquement que psychologiquement (coaching sportif et méditation à l'appui).

Merci à Jessy, qui a su mieux que quiconque...me comprendre dans l'exercice du travail de thèse.

**A mes amis** de Bordeaux, de la Réunion, et bien sûr de mon île natale la Martinique, pour leur soutien quotidien, et depuis bien des années. Vous êtes l'oxygène de mes fous rires, avec la magie de rendre un ciel gris ...tout de suite plus bleu.

Ne m'en veuillez pas de ne pas tous vous citer...Ce ne sera pas plus d'encre déversée qui vous prouvera mon affection.

**Je dédicace cette thèse**

A ma famille,

A mes parents.

Papa, l'inspiration d'une force indéfectible, de l'amour inconditionnel et de mon métier de médecin.

Maman, l'inspiration de la bienveillance, de l'amour inconditionnel et de l'empathie.

A mes grands frères, qui savent me supporter et me baliser dans des chemins qu'ils ont débroussaillés avant moi.

A René-Yves, pour son soutien sans failles.

**Merci pour votre bienveillance et votre soutien essentiel tout au long de mes études. Votre patience dans les moments compliqués a fini par payer.**

# TABLE DES MATIERES

<b>REMERCIEMENTS .....</b>	<b>2</b>
<b>TABLE DES MATIERES .....</b>	<b>4</b>
<b>LISTE DES ABREVIATIONS .....</b>	<b>6</b>
<b>LISTE DES ILLUSTRATIONS.....</b>	<b>7</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX .....</b>	<b>9</b>
<b>1 INTRODUCTION .....</b>	<b>11</b>
<b>1.1 Physiologie plaquettaire .....</b>	<b>11</b>
1.1.1 Mégacaryopoïèse et production plaquettaire.....	11
1.1.2 Plaquettes et hémostase primaire .....	13
<b>1.2 Syndrome de Bernard-Soulier .....</b>	<b>14</b>
1.2.1 Historique, incidence.....	14
1.2.2 Le complexe GPIb-IX-V.....	15
1.2.3 Gènes et mode de transmission .....	17
1.2.4 Physiopathologie .....	19
1.2.5 Présentation clinique.....	22
1.2.6 Diagnostic biologique .....	23
1.2.7 Prise en charge/ traitements disponibles.....	36
1.2.8 Diagnostic différentiel .....	38
<b>1.3 Problématique et objectifs de l'étude .....</b>	<b>40</b>
<b>2 MATERIEL ET METHODE.....</b>	<b>43</b>
<b>2.1 Source de données-critères d'inclusion.....</b>	<b>43</b>
<b>2.2 Recueil des données cliniques.....</b>	<b>43</b>
<b>2.3 Recueil des données biologiques .....</b>	<b>45</b>
2.3.1 Numération et volume plaquettaire moyen (VMP).....	46
2.3.2 Cytométrie.....	46
2.3.3 Génétique .....	47
2.3.4 Expression des résultats – Statistiques.....	47

<b>3</b>	<b>RESULTATS .....</b>	<b>48</b>
<b>3.1</b>	<b>Caractéristiques générales des patients inclus dans l'étude .....</b>	<b>49</b>
3.1.1	Population de patients homozygotes .....	49
3.1.2	Population de patients hétérozygotes.....	51
3.1.3	Consanguinité .....	53
<b>3.2</b>	<b>Caractéristiques du syndrome hémorragique.....</b>	<b>53</b>
3.2.1	Population de patients homozygotes .....	53
3.2.2	Population de patients hétérozygotes.....	55
3.2.3	Comparaison des scores hémorragiques en fonction du statut allélique .....	56
3.2.4	Prise en charge thérapeutique .....	57
<b>3.3</b>	<b>Données biologiques .....</b>	<b>58</b>
3.3.1	Numération plaquettaire et VMP de la population homozygote .....	58
3.3.2	Numération plaquettaire et VMP de la population hétérozygote.....	58
3.3.3	Etude de l'expression des glycoprotéines plaquettaires par cytométrie en flux.....	59
<b>4</b>	<b>DISCUSSION.....</b>	<b>61</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSION .....</b>	<b>68</b>
	<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>69</b>

## LISTE DES ABREVIATIONS

ADP : Adénosine diphosphate  
BFU-E/MK: Burst forming unit-erythroid/megakaryocyte.  
SBS : Syndrome de Bernard Soulier  
Ca : Calcium  
Cellules CHO : Cellules d'ovaires de hamster de Chine  
CFU-GEMM: Colony Forming Unit-Granulocyte-Erythrocyte-Monocyte-Megakaryocyte  
CPA : Concentré de plaquettes d'aphérèse  
DMS : système membranaire de démarcation  
EDTA : Ethylène diamine tétra-acétique  
FT : Facteur tissulaire  
GP : Glycoprotéine  
IgIV : Immunoglobulines polyvalentes humaines à usage intraveineux  
IL-11 : interleukine 11  
IL-3 : interleukine 3  
IL-6 : interleukine 6  
LRR : répétition riche en leucine  
MKs : mégacaryocytes  
MO : moelle osseuse  
MoAb : Anticorps monoclonaux  
MYH9 : Syndrome MYH9  
PCR- SSCP: Polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism  
PRP : Plasma riche en plaquettes  
PPP : Plasma pauvre en plaquettes  
rFVIIa : Facteur VII activé recombinant  
RGD : la séquence tripeptidique (arginine-glycine-acide glutamique)  
SCF : Facteur de cellule souche  
TG : Thrombasthénie de Glanzmann  
TPO : Thrombopoïétine  
VMP : Volume moyen plaquettaire  
VWF : Facteur de Von Willebrand

## LISTE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Résumé de la maturation mégacaryocytaire .....	11
Figure 2 : Mécanismes cytosquelettiques de la production de proplaquettes. ....	12
Figure 3 : Structure du complexe GPIb-V-IX et domaines fonctionnels.....	17
Figure 4: Structures des gènes codant pour les 4 polypeptides du complexe GP Ib-IX-V .....	18
Figure 5 : Représentation schématique de GPIb alpha, GPIb $\beta$ et GPIX montrant les différents domaines.....	18
Figure 6 : Rôle du complexe GPIb-V-IX dans l'adhésion et l'activation des plaquettes au site de lésion vasculaire. ....	19
Figure 7 : Morphologie des plaquettes sanguines périphériques et distribution de la tubuline chez les patients hétérozygotes pour la mutation de Bolzano. ....	21
Figure 8 : Sites de liaison avec la filamine A .....	22
Figure 9 : Représentation schématique du flux cellulaire et de la mesure par impédance. ..	25
Figure 10 : Courbe de distribution plaquettaire obtenue par le canal impédance du SYSMEX et leurs seuils.....	25
Figure 11 : Représentation schématique du système optique.....	26
Figure 12 : courbe de distribution anormale des PTQ en impédance du SYSMEX XE 5000. ..	28
Figure 13 : Variations de taille plaquettaire en microscopie optique. ....	28
Figure 14 : image de macroplaquette d'un patient porteur du SBS. Taille proche de celle d'une hématie. ....	29
Figure 15 : Test de la fonction plaquettaire : agrégométrie et courbe de transmission lumineuse.....	30
Figure 16 : courbe d'agrégométrie chez un patient porteur de SBS homozygote. Courbe plate en réponse à la ristocétine forte dose. ....	31
Figure 17 : Schéma simplifié de la technologie de fluorocytométrie tridimensionnelle. ....	33
Figure 18 : Représentation schématique du banc optique du cytomètre en flux.....	33
Figure 19 : Exemple de résultat de cytométrie pour le marqueur CD42 a chez un patient homozygote. ....	34

Figure 20 : Résultats de la CMF pour le CD42 a et b du patient SBS homozygote (rouge) comparé à un témoin normal (vert) sous forme d'histogramme.....	35
Figure 21 : Algorithme de diagnostic pour les patients atteints de macro-thrombopénie non syndromique. ....	39
Figure 22 : ASN 64 un résidu très conservé .....	41
Figure 23 : Localisation de ASN 64 .À gauche: structure du domaine extracellulaire GPIIb $\beta$ ..	41
Figure 24 : arbre généalogique représentant 7 familles ,13 cas, ayant un ancêtre commun.	42
Figure 25 : score ISTH de saignement.....	45
Figure 26 : lieux de naissance des patients de l'étude. ....	48
Figure 27 : Arbre généalogique montrant la consanguinité retrouvée chez 4 familles.....	53
Figure 28 : Comparaison des scores hémorragiques moyens en fonction du statut allélique	57
Figure 29 : comparaison des intensités moyennes des fluorescence des différents groupes pour le CD42 a et b (GPIIb-XI-V) .....	59
Figure 30 : comparaison des intensités moyennes des fluorescences des différents groupes pour le CD41 et 61 (GPIIb-IIIa).....	60
Figure 31 : Nuage de points représentatifs des trois populations selon les MFI exprimés avec le CD42 a et b .....	61
Figure 32 : Algorithme décisionnel devant une thrombopénie chronique chez un patient réunionnais. ....	67

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : caractéristiques des principales macro-thrombopénies congénitales.....	40
Tableau 2 : Données adultes et pédiatriques normales recueillies à l'aide de quatre outils d'évaluation différents. Source : ISTH/SSC <i>Haemophilia</i> . 2014 .....	44
Tableau 3 : Pourcentage de répartition des patients selon la ville de naissance .....	48
Tableau 4 : Tableau représentant l'âge actuel, l'âge au diagnostic, l'âge au début des symptômes et l'errance diagnostique de la population homozygote (en année). .....	49
Tableau 5 : tableau représentant l'âge actuel et l'âge au diagnostic des hétérozygotes (en années).....	52
Tableau 6 : Scores hémorragiques détaillés des patients homozygotes .....	54
Tableau 7 : Scores hémorragiques détaillés des patients hétérozygotes.....	56
Tableau 8 : Numération plaquettaire et VMP de la population homozygote mesurée sur l'automate XE-5000.....	58
Tableau 9 : Numération plaquettaire et VMP de la population hétérozygote mesurée sur l'automate XE-500.....	59
Tableau 10 : Critères d'orientation diagnostique permettant de suspecter une hétérozygotie ou une homozygotie pour la maladie.....	66

La Réunion est une île de l'Ouest de l'océan Indien dans l'hémisphère sud ainsi qu'un département d'outre-mer français. D'une superficie de 2 512 km<sup>2</sup>, elle est située dans l'archipel des Mascareignes à environ 684 km à l'est de Madagascar et à 172 km à l'ouest-sud-ouest de l'île Maurice.<sup>(1)</sup> L'est de l'île est constitué par le piton de la Fournaise, un volcan bien plus récent (500 000 ans) qui est considéré comme l'un des plus actifs de la planète. La partie émergée de l'île ne représente qu'un faible pourcentage (environ 3 %) de la montagne sous-marine qui la forme.

En plus du volcanisme, le relief de l'île est rendu très accidenté par une érosion active. Le centre abrite ainsi trois vastes cirques creusés par l'érosion (Salazie, Mafate et Cilaos).<sup>(2)</sup> D'après le dernier recensement, la population était, en janvier 2015, de 850 727 habitants, principalement concentrés sur les côtes où se situent les principales villes dont Saint-Denis, le chef-lieu. La démographie locale se caractérise par la jeunesse des habitants et leurs origines variées, à la fois européennes, ouest-africaines, est-africaines, malgaches, indiennes, annamites, malaises et chinoises.<sup>(3)</sup>

Son histoire, son peuplement et ses caractéristiques insulaires isolées se sont traduits par une prévalence plus élevée de maladies héréditaires. Des effets fondateurs ont été observés pour plusieurs maladies génétiques et certains syndromes n'ont été décrits qu'à la Réunion.

# 1 INTRODUCTION

## 1.1 Physiologie plaquettaire

### 1.1.1 Mégacaryopoïèse et production plaquettaire

Les plaquettes sont issues de la fragmentation du cytoplasme des mégacaryocytes médullaires. La mégacaryopoïèse est un processus physiologique principalement régulé par la thrombopoïétine (TPO), facteur de croissance majeur des mégacaryocytes produit essentiellement par le foie et se liant à son récepteur MPL. La liaison de la TPO à MPL entraîne une dimérisation du récepteur et l'activation de plusieurs voies de signalisation permettant les différentes étapes de la mégacaryopoïèse. <sup>(4)</sup>

Les mégacaryocytes se différencient à partir de la cellule souche hématopoïétique en trois étapes. La première étape est une phase classique de prolifération des progéniteurs. Les plaquettes dérivent d'une cellule souche totipotente ou hémangioblaste. L'hémangioblaste se différencie en angioblaste puis en précurseurs de cellules endothéliales d'une part, et en cellules souches hématopoïétiques (CSH) d'autre part, à l'origine de toutes les lignées sanguines : les cellules pluripotentes de la niche ostéoblastique.

La différenciation dans la lignée mégacaryocytaire dépend principalement de la TPO et est soutenue par d'autres facteurs de croissance tels que l'IL-3, le SCF, l'IL-6 et l'IL-11. ( Fig.1) <sup>(5)</sup>

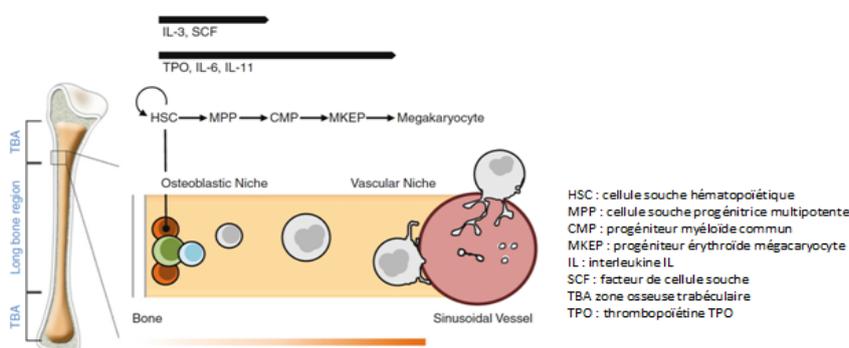
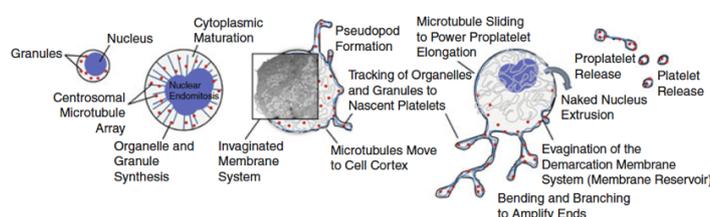


Figure 1 : Résumé de la maturation mégacaryocytaire  
source : (5)

Lui succède une phase propre aux mégacaryocytes qui se caractérise par une polyploïdisation du noyau par endomitoses sans division cellulaire aboutissant à la formation de cellules géantes (> 50 mm) et polyploïdes (pouvant aller jusqu'à 128N).

Enfin, dans un dernier temps, le mégacaryocyte subit une maturation cytoplasmique avec la synthèse accrue d'ARNm et de protéines. C'est au cours de cette étape qu'a lieu la biogenèse des organelles plaquettaires<sup>(6)</sup>, notamment les granules dans lesquels sont stockées les protéines plaquettaires. Les mégacaryocytes matures migrent ensuite de la niche ostéoblastique vers la niche vasculaire. Un réseau de membranes internes extrêmement complexe et structuré se développe. Ce réseau, appelé système de membranes de démarcation (DMS pour démarcation membrane system), sert de réserve membranaire à l'extension de proplaquettes dans les sinusoides vasculaires. (Fig.2)



**Figure 2 : Mécanismes cytosquelettiques de la production de proplaquettes.**  
Source (5)

La plaquetto-genèse est principalement gouvernée par des voies apoptotiques et le remodelage des microtubules du cytosquelette. Les microtubules, sont assemblés à partir d'hétérodimères d' $\alpha$  et  $\beta$  tubuline, dont la polymérisation et le glissement conditionnent l'élongation des proplaquettes et la formation de plaquettes discoïdes. L'actomyosine joue également un rôle clé dans la différenciation mégacaryocytaire et le nombre de proplaquettes libérées par le mégacaryocyte.

La tubuline est la protéine structurale des microtubules, un constituant majeur du cytosquelette. Elle est composée de 2 sous-unités non identiques :

- La tubuline  $\alpha$
- La tubuline  $\beta$  : Il existe plusieurs isoformes de cette tubulines, dont TUBB, TUBB1, TUBB2A, TUBB2B, TUBB2C, TUBB3, TUBB4, TUBB4Q, TUBB6 et TUBB8.

Parmi les isoformes de la  $\beta$ -tubuline, la  $\beta$ 1-tubuline est spécifique au mégacaryocyte et aux plaquettes dont il est l'isoforme prédominante.

Les proplaquettes génèrent des structures en forme de larmes qui sont relarguées : les préplaquettes, qui sont ensuite scindées en plaquettes uniques libérées dans le sang.<sup>(4,5,7,8)</sup>

Chaque mégacaryocyte mature produit 1000 à 3000 plaquettes. Les plaquettes sont des cellules anucléées dont le nombre varie entre 150 et 400 G/L chez un adulte sain. Leur diamètre est compris entre 2 et 3  $\mu$ m pour un volume moyen de 7 à 10 fl.<sup>(9)</sup>

Environ 30 % de la masse plaquettaire de l'organisme est séquestrée de manière réversible dans la rate. La durée de vie des plaquettes est de 7 à 12 jours, et à l'état normal, les plaquettes vieilles sont éliminées par les macrophages du système réticulo-histiocytaire de la rate.<sup>(10)</sup>

### 1.1.2 Plaquettes et hémostasie primaire

**La fonction** principale des plaquettes est d'assurer l'hémostasie : elles sont les premiers éléments à intervenir pour arrêter le saignement dû à une lésion vasculaire, limiter les pertes sanguines et permettre la cicatrisation. Après que les plaquettes ont eu formé une première barrière limitant le saignement, le caillot est consolidé par la formation d'un réseau de fibrine organisé autour d'agrégats plaquettaires.

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.

#### 1.1.2.1 Adhésion et étalement

Une brèche vasculaire mettant à nu le sous-endothélium, expose les fibres de collagène et le facteur Willebrand (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 au récepteur plaquettaire GPIb-IX-V. Cette adhésion de la plaquette provoque son activation, induit des changements de forme et la sécrétion des granules.

### 1.1.2.2 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 sécrété, le thromboxane A<sub>2</sub>... Les voies d'activation aboutissent à une augmentation de la concentration cytoplasmique de calcium induisant des phosphorylations ou déphosphorylations de protéines de la signalisation qui régulent les modifications structurelles 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 et augmentent ainsi la taille du clou plaquettaire.

### 1.1.2.3 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.

## 1.2 Syndrome de Bernard-Soulier

### 1.2.1 Historique, incidence.

La première description clinique de ce syndrome revient aux praticiens français, Jean Bernard et Jean-Pierre Soulier en 1948.<sup>(11)</sup> Les deux hématologues ont décrit le cas d'un jeune patient de sexe masculin qui présentait un phénotype hémorragique sévère, un temps de saignement prolongé, et

une numération plaquettaire diminuée avec des plaquettes de taille très augmentée (macrothrombopénie).

Ainsi de manière littérale, ils ont nommé le trouble "Dystrophie thrombocytaire-hémorragique congénitale" (Dystrophie thrombocytaire hémorragique). D'autres cas présentant un profil identique, ont été rapportés par la suite. <sup>(12-14)</sup>

En 1975, l'une des trois principales protéines contenant des glucides à la surface des plaquettes, la GPIb, se révèle être absente dans les plaquettes de patients SBS. <sup>(15)</sup> Vers 1980, le défaut biochimique est découvert suite à la mise en évidence d'un déficit de 4 polypeptides : GPIb $\alpha$ , GPIb $\beta$ , GPIX, et GPV. Ces GPs sont associées à la surface des plaquettes pour former un récepteur de la membrane plaquettaire appelé le complexe GPIb-IX-V. <sup>(16)</sup>

Dans la littérature, la maladie est maintenant communément appelée syndrome de Bernard-Soulier (SBS). Ce syndrome est extrêmement rare car seulement une centaine de cas ont été rapportés dans des articles publiés, principalement dans les populations du Japon, d'Europe et d'Amérique du Nord.

La prévalence a été estimée à moins de 1/1 000 000, mais elle est probablement sous-estimée du fait de la difficulté diagnostique.

## 1.2.2 Le complexe GPIb-IX-V

### 1.2.2.1 Structure

Les caractéristiques structurales et fonctionnelles du complexe GPIb-IX-V sont représentées schématiquement sur la figure 3. Le complexe comprend 4 sous-unités de polypeptides transmembranaires distinctes, GPIb $\alpha$ , GPIb $\beta$ , GPIX et GPV, avec un ratio respectivement de 2 : 4 : 2 : 1. (Fig.3A)

Ces sous-unités s'associent dans le réticulum endoplasmique, puis subissent une étape de maturation dans l'appareil de Golgi avant de se localiser à la surface cellulaire.

Après l'élimination du peptide signal, les GPs mûres consistent en un domaine extracellulaire N-terminal contenant des répétitions riches en leucine (LRR), une hélice

transmembranaire et une queue cytoplasmique relativement courte. Le domaine N-terminal de la GPIb $\alpha$  est le principal site de liaison pour les protéines adhésives, et les facteurs de coagulation. <sup>(17)</sup>

**La GPIb $\alpha$  (ou CD42b)** est une protéine de 135 kDa liée par un pont disulfure à la chaîne **GPIb $\beta$  (ou CD42c)** de 25 kDa. Une ou deux GPIb $\beta$  sont liées à la GPIb $\alpha$  par un ou deux ponts disulfures, formant la GPIb.

**La GPIX (ou CD42a)** de 22 kDa est étroitement attachée de façon non-covalente au dimère GPIb $\alpha$ - $\beta$  dans un rapport molaire de 1 :1, formant ainsi le complexe GPIb-IX.

Quant à la **GPV (ou CD42d)**, dont le poids moléculaire est de 83 kDa, elle est plus lâchement associée à GPIb et GP IX dans un rapport molaire de 0,5 :1.

### 1.2.2.2 Les ligands de la Gplb $\alpha$

Les sites de liaison extracellulaires du complexe GPIb-V-IX sont tous situés dans le domaine N terminal de 45 kDa de la GPIb $\alpha$ .

-**Le facteur Willebrand** est une glycoprotéine adhésive multimérique de très haut poids moléculaire (500 à 20 000 kDa). Chaque monomère contient un domaine A1 de liaison à la GPIb $\alpha$ , un domaine A3 d'association au collagène, un motif peptidique RGD de liaison aux intégrines  $\alpha_{IIb}\beta_3$  et  $\alpha_v\beta_3$  et un site liant le facteur VIII. Dans un vaisseau sain, les plaquettes n'interagissent pas avec le facteur Willebrand circulant soluble. Après lésion vasculaire, le facteur Willebrand recruté par son domaine A3 sur le collagène sous endothélial et en changeant de conformation sous l'effet du flux sanguin permet la capture des plaquettes *via* la GPIb $\alpha$ .

-**La thrombine**, enzyme clé de la coagulation, est aussi un puissant agoniste plaquettaire. Elle agit *via* des récepteurs de la famille PAR (*Protease Activated Receptors*) et également *via* la GPIb $\alpha$  par un mécanisme différent.

-La GPIb $\alpha$  interagit également avec **l'intégrine leucocytaire  $\alpha M\beta_2$  (Mac-1)**, la **P-sélectine**, les **facteurs XI et XII de la coagulation**. <sup>(18)</sup> (Fig.3 B et C)

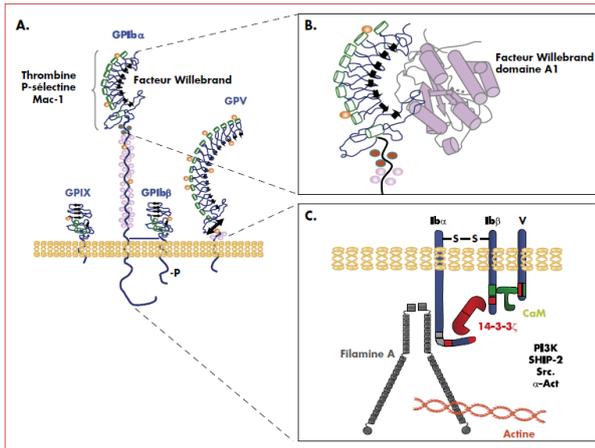


Figure 3 : Structure du complexe GPIb-V-IX et domaines fonctionnels source (18)

A) La partie LR N-terminale de la GPIb $\alpha$  (45 kDa) contient les sites de liaison pour le facteur Willebrand, la thrombine, la P-sélectine et l'intégrine  $\alpha$ Mb2 (Mac-1). Une région étirée richement O-glycosylée est située en aval du domaine LR.

B) Le domaine A1 du facteur Willebrand interagit avec les extrémités N et C-terminales de la région LR.

C) la partie intracellulaire du complexe interagit avec trois partenaires directs. La filamine A (280 kDa) se lie au domaine 560-575 de la GPIb $\alpha$  permettant un pontage avec l'actine sous-membranaire. La protéine 14-3-3 $\zeta$  se lie à la fois à la GPIb $\alpha$  (régions 580-590 et 605-610) et à la GPIb $\beta$  (Phospho Ser166). La calmoduline (CaM) se lie à la GPIb $\beta$  et à la GPV. La PI3 kinase, SHIP-2, Src et l' $\alpha$ -actinine ( $\alpha$ -Act) interagissent indirectement.

## 1.2.3 Gènes et mode de transmission

### 1.2.3.1 Structure des gènes

Les quatre sous-unités de la glycoprotéine sont codées séparément par des gènes correspondant à différents chromosomes.

Le gène codant pour la GPIb $\alpha$  (*GP1BA*) est situé sur le bras court du chromosome 17 (en 17p12), celui de la GPIb $\beta$  (*GP1BB*) se situe sur le bras long du chromosome 22 (en 22q11.2) et les gènes codant pour la GPIX (*GP9*) et GPV (*GP5*) sont situés sur le bras long du chromosome 3 (3q21 et 3q29 respectivement).

Comme les polypeptides de ce complexe, les gènes partagent un certain nombre de caractéristiques et de similitudes structurales. Les quatre gènes appartiennent à la famille des protéines riches en leucine et sont exclusivement exprimés au niveau des plaquettes dans les conditions physiologiques. Ils ont une structure simple avec la séquence codante contenue dans un seul exon, à l'exception du gène *GP1BB* qui contient un intron de 10 bases après le codon de départ.

Tous sont également relativement dépourvus d'introns, avec seulement le gène *GP9* qui en contient 2. (13,19,20) (Fig.4)

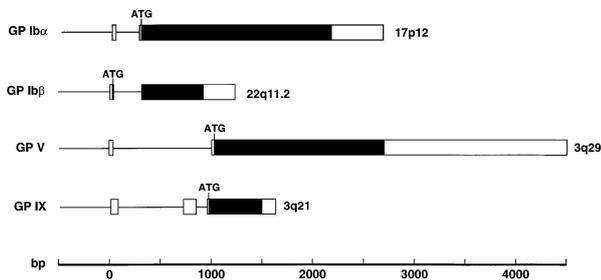


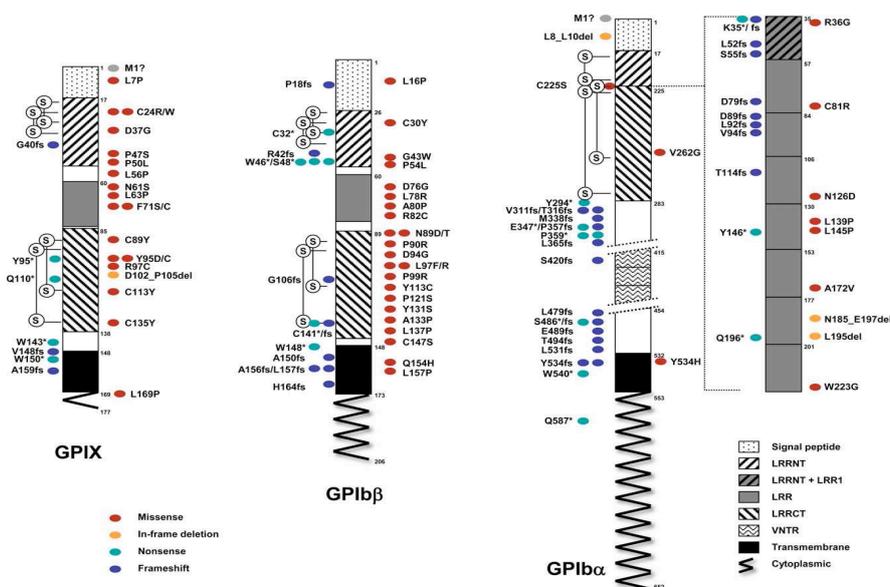
Figure 4: Structures des gènes codant pour les 4 polypeptides du complexe GP Ib-IX-V source : (13)

Les exons sont représentés sous forme de boîtes séparés par les différents introns. La position du codon d'initiation à la transcription (ATG) est également indiquée.

Le SBS se transmet selon un mode autosomique récessif, souvent dans un contexte de consanguinité.

Les anomalies génétiques peuvent être séparées en trois classes majeures :

- 1) mutations faux-sens ou délétions de quelques nucléotides qui codent pour un complexe anormal / instable avec une expression de surface fortement diminuée ;
- 2) des mutations non-sens conduisant à des sous-unités tronquées ;
- 3) des insertions ou des délétions conduisant à un décalage du cadre de lecture avec l'apparition d'un codon stop prématuré. (Fig.5)



Les positions sont conformes aux numéros d'accès UniProt P07359, P13224 et P14770, respectivement. Les positions de LRRNT, qui contient également LRR1, LRR2-8, et LRRCT de GPIbα sont selon Blenner et al. (2014). Les liaisons disulfure putatives dans GPIIX sont basées sur la conservation de séquence de GPIIX avec GPIbβ comme indiqué par McEwan et al.(2011).

Figure 5 : Représentation schématique de GPIb alpha, GPIb β et GPIIX montrant les différents domaines. source : (21)

## Formes hétérozygotes de la maladie

En plus des formes récessives classiques du SBS, certaines mutations rares des gènes *GP1BA* ou *GP1BB* peuvent être associées une macro-thrombopénie modérée ou mineure, généralement asymptomatique, qui se transmet selon un mode autosomique dominant.

Notamment le variant Bolzano, qui a été identifié dans une vaste cohorte italienne de 216 sujets atteints de macro-thrombopénie. Ce variant a été retrouvé dans 42 familles apparemment sans lien, mais toutes partageant le même haplotype, suggérant que la mutation s'est produite dans un chromosome commun ancestral. Cette mutation génétique entraîne une substitution p.Ala156Val, ce qui réduit la capacité de GPIb $\alpha$  à interagir avec VWF. <sup>(22)</sup>

### 1.2.4 Physiopathologie

#### 1.2.4.1 Défaut d'adhésion plaquettaire

Le syndrome de Bernard-Soulier est une maladie autosomique récessive rare caractérisée par des anomalies du complexe GPIb-IX-V. Les mutations génétiques impliquées dans ce syndrome concernent les gènes codant pour les sous-unités GPIb $\alpha$ , GPIb $\beta$  et GPIX empêchant l'expression du complexe au niveau de la membrane plaquettaire. En conséquence, les plaquettes sont incapables d'adhérer au sous-endothélium vasculaire. <sup>(17)</sup>(Fig.6).

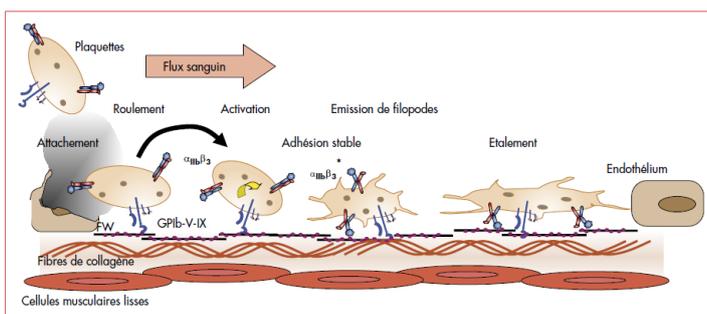


Figure 6 : Rôle du complexe GPIb-V-IX dans l'adhésion et l'activation des plaquettes au site de lésion vasculaire.  
source : (18)

Aucune mutation n'a été identifiée dans le gène *GP5* comme étant associée au SBS.

Dans la forme classique biallélique, les mutations entraînent une quasi-absence d'expression du complexe à la surface des plaquettes.

La forme monoallélique entraîne une diminution d'expression d'environ la moitié et une altération modérée, voire nulle, de la fonction plaquettaire. <sup>(22)</sup>

#### 1.2.4.2 Défaut de mégacaryopoïèse.

Alors que l'absence du complexe GPIb-V-IX explique le défaut fonctionnel des plaquettes, les mécanismes à l'origine de la macro-thrombopénie ne sont pas totalement élucidés. Les études *in vitro* à partir de cultures de progéniteurs hématopoïétiques issus de patients suggèrent que la différenciation des MKs n'est pas affectée, mais plutôt la capacité de ceux-ci à former des proplaquettes.

- Système membranaire de démarcation altéré.

Pour explorer les mécanismes sous-jacents de la maladie, la mégacaryopoïèse a été étudiée avec un modèle de souris déficiente en GPIb $\beta$ . Le nombre de progéniteurs mégacaryocytaires, leur différenciation, leur maturation et leur niveau d'endomitoses étaient normaux chez ces souris déficientes.

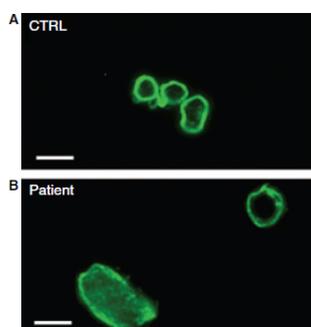
Cependant, les mégacaryocytes de stade III présentaient des défauts ultrastructuraux avec une zone périphérique et un système de membrane de démarcation moins bien développé. Ce dernier apparaît « vacuolé » ou « désordonné ». La proportion de cellules capables d'allonger les proplaquettes était diminuée de 41% et les plaquettes augmentées de volume. <sup>(23)</sup>

Des résultats similaires ont été retrouvés chez les modèles murins déficients en GPIb $\alpha$  avec des anomalies de la mégacaryopoïèse au stade tardif. <sup>(24)</sup>

- Anomalie de la répartition de l' $\alpha$  tubuline et réorganisation défectueuse des microtubules

L'analyse de la mégacaryopoïèse *in vitro* chez six sujets hétérozygotes pour la mutation Ala156Val chez le GPIb $\alpha$  (mutation Bolzano) a montré que la formation de proplaquettes était réduite d'environ 50% par rapport aux contrôles. <sup>(25)</sup>

L'analyse par immunofluorescence de la formation de proplaquettes dans cette étude a révélé une altération de l'organisation de la distribution de la  $\alpha$ -tubuline chez les patients (Fig.7 B) par rapport aux témoins (Fig.7 A).



Le témoin (A) et les plaquettes sanguines périphériques du patient CR (B) coloré à l'anti-tubuline sont rapportés (barre d'échelle = 5  $\mu$ m). L'une des plaquettes des deux patients (à gauche) montre les anomalies de la distribution de la tubuline observées dans les extrémités des plaquettes.

Figure 7 : Morphologie des plaquettes sanguines périphériques et distribution de la tubuline chez les patients hétérozygotes pour la mutation de Bolzano. source(25)

Ces observations sont cohérentes avec une réorganisation défectueuse des faisceaux de microtubules formant le noyau de proplaquettes mutants. Les proplaquettes du patient semblaient perdre leur forme ronde typique.

Des résultats similaires ont été trouvés lors de l'étude de Strassel et al. sur l'assemblage des microtubules dans le modèle mutant en GPIIb $\beta$  (GPIIb $\beta$  -/-). Les plaquettes étaient de taille augmentées (de 30% supérieur aux GPIIb $\beta$  +/+). Le nombre de microtubules était deux fois plus grand dans les proplaquettes des souris déficientes. (23)

Ces résultats suggèrent que le complexe GPIIb-V-IX pourrait réguler la réorganisation de la tubuline, éventuellement par une interaction directe ou indirecte. (23)

- Lien avec la filamine A (FLNA)

Un nombre croissant d'études met en cause le défaut d'ancrage au réseau d'actomyosine à la membrane plasmique dans le mécanisme de la macro-thrombopénie. (26)

Cet ancrage se fait via la FLNA entre la partie intra cellulaire de la GPIIb alpha et le réseau d'actine. Les filamines sont de grosses protéines dimériques assurant la stabilisation du réseau d'actine filamenteuse et l'ancrage de ce réseau aux glycoprotéines transmembranaires, notamment le complexe GPIIb-V-IX et l'intégrine  $\alpha$ IIb $\beta$ 3. (7)

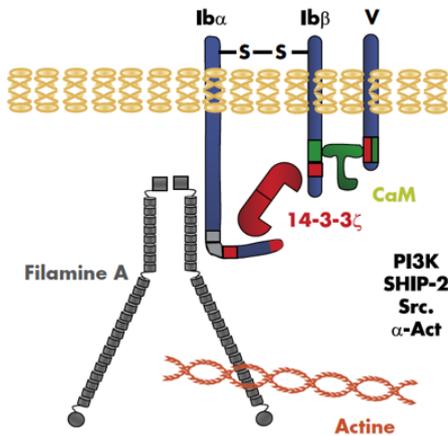


Figure 8 : Sites de liaison avec la filamine A  
Source : (18)

La partie intracellulaire du complexe interagit avec trois partenaires directs.  
La filamine A se lie au domaine 560-575 de la GPIb $\alpha$  permettant un pontage avec l'actine sous-membranaire.  
La protéine 14-3-3 se lie à la fois à la GPIb $\alpha$  (régions 580-590 et 605-610) et à la GPIb $\beta$  (Phospho Ser166).  
La calmoduline (CaM) se lie à la GPIb $\beta$  et à la GPV. La PI3 kinase, SHIP-2, Src et l' $\alpha$ -actinine ( $\alpha$ -Act) interagissent indirectement.

La maturation en MK et la formation de proplaquettes nécessitent une réorganisation dynamique du cytosquelette d'actomyosine et des microtubules. Dans un nouveau modèle dans lequel les niveaux d'expression de la filamine A et B pouvaient être manipulés on constate :

- que l'abaissement des filamines A et B a généré des plaquettes géantes en culture.
- que les interactions de la filamine A / GPIb $\alpha$  sont nécessaires pour une biosynthèse et un adressage efficace du complexe GPIb à la surface plaquettaire.

Ainsi l'interaction entre le domaine cytoplasmique de GPIb $\alpha$  et son partenaire de liaison cytosquelettique la filamine, est un déterminant majeur de la formation des plaquettes, et le déficit de l'une ou l'autre des protéines entraîne une macro-thrombopénie. <sup>(27)</sup>

## 1.2.5 Présentation clinique

### 1.2.5.1 Patients homozygotes

S'agissant d'une pathologie de l'hémostase primaire, les saignements affectent principalement les tissus cutané-muqueux, et les hématomes majeurs sont rarement observés, contrairement à l'hémophilie. <sup>(19)</sup>

La sévérité et la fréquence des saignements varient selon les individus.

Dans la plupart des cas, les symptômes hémorragiques se manifestent rapidement après la naissance ou pendant la petite enfance. Les manifestations cliniques comprennent habituellement

le purpura, les épistaxis, les saignements gingivaux ou des ménorragies, et plus rarement des saignements gastro-intestinaux ou urologiques.

Les épisodes hémorragiques graves peuvent être associés à des traumatismes ou à des interventions chirurgicales.

La tendance hémorragique sévère contraste souvent avec une thrombopénie parfois modérée.  
(17,19,21,22,28)

Sur la cohorte de 14 patients homozygotes de la populations Islandaise parue en 2015 dans l'AJH, les symptômes les plus fréquents étaient les ecchymoses, les saignements prolongés (plus de 10 minutes) pour des coupures cutanées superficielles, les épistaxis et les gingivorragies. Toutes les femmes de la cohorte rapportaient une ménorragie à l'origine d'une anémie ayant nécessité une supplémentation martiale.<sup>(28)</sup>

#### 1.2.5.2 Patients hétérozygotes

Les membres apparentés au 1<sup>er</sup> degré dits « porteurs sains » (patients hétérozygotes) sont habituellement asymptomatiques.

Cependant, dans la même étude islandaise, des saignements ont été observés pour les hétérozygotes (n=30) avec une différence statistiquement significative comparée à la population témoin (n=29). Les symptômes le plus souvent décrits étaient les ecchymoses, des saignements cutanés mineurs et des épistaxis prolongées. En revanche, les ménorragies ne différaient pas de façon significative des témoins.<sup>(28)</sup>

### 1.2.6 Diagnostic biologique

#### 1.2.6.1 Pré analytique

L'exploration plaquettaire exige de respecter certaines conditions pré-analytiques : ponction veineuse franche, écart des 3-4 premiers millilitres de sang, maintien du sang à température ambiante et, pour les explorations fonctionnelles, réalisation des tests entre 30 min et 2 h après le

prélèvement (jusqu'à 4 h). Le recueil complet des médicaments pris par le patient au cours des dix derniers jours est nécessaire à l'interprétation des résultats des tests fonctionnels.<sup>(29)</sup>

### 1.2.6.2 Numération plaquettaire et étude du frottis sanguin

La numération sanguine est réalisée sur sang anticoagulé par EDTA avec un contrôle microscopique systématique sur étalement coloré en cas d'anomalie du compte plaquettaire, du volume moyen calculé ou de la distribution de taille signalée par l'appareil.

- **Principes techniques de la numération plaquettaire**

L'automate d'hématologie cellulaire considère les cellules du sang comme des particules dont il mesure divers critères physiques, parmi lesquels la taille, la capacité à interrompre le passage du courant électrique, la résistance à la traversée d'un courant de haute fréquence, ou la dispersion et l'absorption lumineuses. Les plaquettes peuvent être énumérées de plusieurs manières : mesure manuelle par microscopie (Malassez), automatisée impédancemétrie ou optique, et enfin, par cytométrie en flux.

#### **Mesure manuelle par microscopie**

Il s'agit de compter au microscope la numération plaquettaire du patient. Une quantité de sang (sur EDTA) définie est diluée dans une solution déjà aliquotée (dilution au centième).

La solution diluée (1 µL) est déposée dans une cellule de comptage (quadrillage de 10 carreaux /10 carreaux). On compte alors les plaquettes au microscope, dans cette cellule, et on calcule leur nombre par litre de sang. Soit  $n$  le nombre d'éléments comptés, et le volume étant  $V = 1 \mu\text{L}$  (totalité du quadrillage) puis multiplié par le facteur de dilution.

**Compte plaquettaire =  $n \times 10^6 \times 100$  (en Giga/L)**

Ce mode de mesure n'est utilisé que dans certains cas, et a complètement été remplacé par la mesure automatisée des plaquettes.

### Mesure automatisée par Impédancemétrie

Un échantillon de sang total prélevé sur EDTA est dilué dans une solution tampon isosmotique puis aspiré au travers d'un orifice qui sépare deux chambres, l'une contenant une électrode positive et l'autre une électrode négative. Chaque particule traversant l'orifice produit momentanément une augmentation de la résistance électrique qui est enregistrée comme une impulsion. En outre, la taille de cette impulsion est proportionnelle à la taille de la particule correspondante.<sup>(30)</sup> (Fig.9)

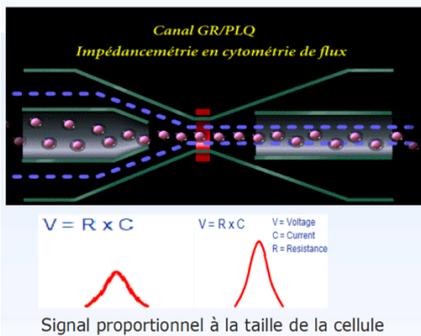


Figure 9 : Représentation schématique du flux cellulaire et de la mesure par impédance.  
Source (31)

Les impulsions sont enregistrées individuellement puis classées au sein d'histogrammes : les plaquettes et les globules rouges (GR) sont comptées sur le même canal de dilution et l'automate considère les particules de petite taille comme des plaquettes et les autres particules comme des GR.

Les seuils identifiant les particules comptées comme des plaquettes varient de 2 à 6 fL pour le seuil inférieur (discrimination des plaquettes et du bruit de fond) et de 20 à 40 fL pour le seuil supérieur (discrimination avec les GR). (Fig.10)

Puis étude du profil de l'histogramme des volumes plaquettaires et production d'une courbe lissée (améliorant la précision du décompte). Certains automates ont un seuil mobile plutôt que fixe pour discriminer plaquette et GR.<sup>(30)</sup>

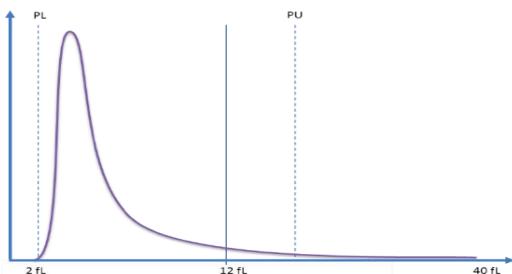


Figure 10 : Courbe de distribution plaquettaire obtenue par le canal impédance du SYSMEX et leurs seuils -Source : (32)

Des messages d'alerte apparaissent quand l'automate ne réussit pas à extrapoler une courbe lissée ou à séparer nettement les plaquettes des GR.

### Mesure automatisée par diffraction lumineuse (optique)

Les particules d'un échantillon de sang dilué sont aspirées et cheminent individuellement dans un capillaire. Chaque particule traverse un faisceau lumineux (ou laser) et va à la fois interrompre ce faisceau (chaque interruption correspond au passage d'une particule, ce qui permet ultérieurement d'en obtenir le nombre) et diffracter ce faisceau lumineux.

La quantité de lumière diffractée à 1, 2, 3 ou même 4 angles (selon les automates) est proportionnelle au volume, mais aussi renseigne sur le contenu de la particule.

Les plaquettes sont identifiées sur un histogramme bi paramétrique : volume/indice de réfraction. <sup>(30)</sup> (Fig.11)

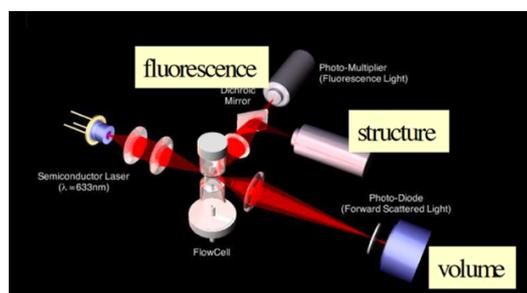


Figure 11 : Représentation schématique du système optique.  
Source (31)

Sur ce canal optique il existe trois seuils différents :

1. Un discriminateur bas (PL), variant entre 2 et 6 fL, permet d'éviter la sélection de débris cellulaires ou bruit de fond. Ce seuil minimal, mobile, s'adapte ainsi selon les patients et selon la taille des éléments mesurés.
2. Un seuil fixe à 12 fL, qui définit le pourcentage de grandes plaquettes par le calcul du rapport entre le nombre d'événements associés à une taille supérieure à 12 fL et le nombre total de plaquettes. C'est la fraction de plaquettes de grandes tailles.

3. Un discriminateur haut (PU), variant entre 12 et 40 fL, permet de définir le seuil maximal au-delà duquel les événements détectés ne seront plus associés à la numération plaquettaire.

Ce mode de comptage est généralement plus juste pour énumérer les plaquettes en cas de macro-thrombopénie.

Plusieurs automates réalisent la numération des plaquettes par impédance mais peuvent, soit à la demande soit systématiquement, énumérer en plus les plaquettes par technique optique. En incorporant un composé coloré ou fluorescent au réactif de dilution, il est en outre possible de mesurer d'autres paramètres plaquettaires, comme par exemple la fraction immature (IPF) (ou nombre de plaquette réticulées).

#### La numération des plaquettes par technique immunologique (cytométrie en flux)

Elle se réalise directement sur certains automates (Abbott) avec un anticorps monoclonal anti-plaquettes (CD61 ou CD41). Le principe de la cytométrie est expliqué ci-après. Cette méthode de comptage permet d'identifier les plaquettes par leur taille et leur index de réfraction, grâce à un faisceau laser incident et l'automate analyse la lumière diffractée par différents angles. En plus d'information concernant la taille et la structure, le marquage immunologique des plaquettes par le CD61 ou CD41 permet un compte fiable des plaquettes. En effet ce marquage est spécifique des plaquettes car il n'est pas exprimé à la surface d'autres cellules. Cette méthode est recommandée pour sa précision dans les situations de forte thrombopénie.

#### Limites du comptage des macroplaquettes de la numération plaquettaire automatisée : risque de sous-estimation en cas de macro-thrombopénie

Le compte des macroplaquettes est souvent difficile avec une fausse diminution : les plaquettes ont un volume supérieur au seuil discriminant avec les globules rouges et sont alors comptées avec les GR, voire les leucocytes.

Les automates signalent le plus souvent ces grandes plaquettes avec un message d'alerte, mais dont la spécificité est faible car croisée avec la présence de petits agrégats de plaquettes, voire de noyaux d'érythroblastes. La courbe de distribution des plaquettes est anormale au niveau du discriminateur haut PU (fragments, microcytes, plaquettes géantes) avec un non-retour de la courbe à la ligne de base. (Fig.12)

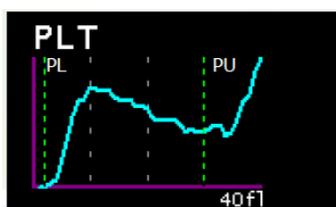


Figure 12 : courbe de distribution anormale des PTQ en impédance du SYSMEX XE 5000.  
Source (31)

La numération des plaquettes doit être vérifiée par des méthodes alternatives (cellule de comptage, mode optique).<sup>(30)</sup>

En cas de thrombopénie, surtout pour un patient non connu, il faut regarder le frottis sanguin, au moins pour confirmer la présence de plaquette géantes (ou visualiser des agrégats de plaquettes ou des érythroblastes).

La numération des plaquettes par méthode optique est parfois moins imprécise. La présence d'un nombre élevé de grandes plaquettes, surtout en cas de thrombopénie vraie associée, est une situation de choix pour utiliser la méthode immunologique de numération des plaquettes à l'aide d'anticorps monoclonaux.

- **Macro-thrombopénie et syndrome de Bernard Soulier**

La numération plaquettaire est variable principalement en raison de la présence de plaquettes géantes et varie généralement entre 20 et 140 G/L chez les homozygotes.<sup>(29,33)</sup>

La thrombopénie se caractérise par la présence en excès de macroplaquettes et de plaquettes géantes sur le frottis sanguin.

Les plaquettes sont dites macroplaquettes lorsque leur taille est supérieure à la moitié d'un globule rouge normocytaire. Les plaquettes géantes sont quant à elles d'un diamètre égal ou supérieur à celui du globule rouge de référence. Cette classification ne peut s'appliquer que lorsque les hématies sont de taille physiologique.<sup>(34)</sup>

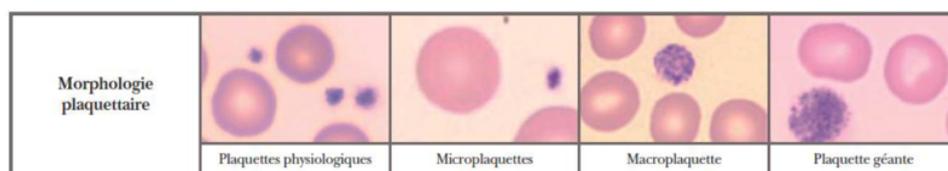


Figure 13 : Variations de taille plaquettaire en microscopie optique.  
Source : (34)

Selon les résultats d'une cohorte de patients Islandais, les homozygotes avaient une thrombocytopénie modérée à sévère (8-56 Giga/L) et les plaquettes nettement plus volumineuses que celles des témoins (15,1-19,7 fL *versus* 6,6-9,8 fL). Cependant, la numération plaquettaire en impédance/optique sous-estimait à la fois la numération plaquettaire et le VMP car la thrombocytopénie était moins sévère selon la numération plaquettaire par marquage immunologique (cytométrie en flux) (39-73 G/L). Bien que leurs comptes plaquettaires étaient le plus souvent normaux, les hétérozygotes avaient une numération plaquettaire significativement plus faible (à la fois par comptage optique, 189 G/L et numération par cytométrie, 182 G/L) que chez les témoins sains (263 G/L numération optique, 268 G/L numération par cytométrie) ( $p < 0,001$  pour les deux comparaisons). Les hétérozygotes avaient également des plaquettes légèrement plus grandes (médiane de 9,7 fL) que le groupe témoin (7,8 fL) ( $p < 0,001$ ).<sup>(28)</sup>

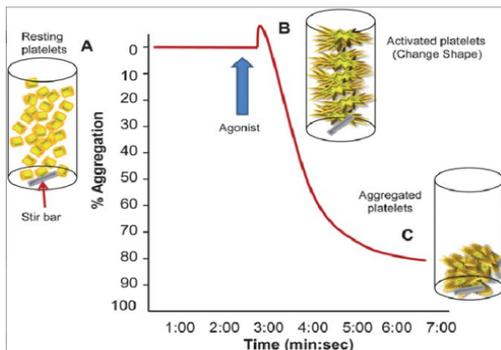


Figure 14 : image de macroplaquette d'un patient porteur du SBS. Taille proche de celle d'une hématie. source (35)

### 1.2.6.3 Agrégométrie

L'agrégométrie est un test spécifique d'exploration des fonctions plaquettaires. L'agrégomètre est un photomètre constitué d'une source lumineuse avec un socle pouvant recevoir une ou plusieurs cuvettes en verre siliconé. Les cuvettes sont conservées à 37°C grâce à un bloc thermostaté. Le socle est couplé à un agitateur magnétique maintenant les cellules en suspension, afin de faciliter l'homogénéisation du milieu et créer un mouvement continu.

Lors de l'ajout d'agonistes plaquettaires, les plaquettes activées commencent à changer de formes et s'agrègent. L'agrégation entraîne un éclaircissement du milieu se traduisant par une augmentation de la transmission lumineuse (TL). (Fig.15)



(A) Le plasma riche en plaquettes agité en l'absence d'agoniste plaquettaire équivaut à 0% de transmission lumineuse (ligne de base). La modification de la forme des plaquettes due à l'activation plaquettaire induite par l'addition d'un agoniste plaquettaire entraîne une courte diminution de la transmission lumineuse (B). Lorsque les agrégats de plaquettes forment une augmentation de la transmission de la lumière, celle-ci est enregistrée par le dispositif et calculée en pourcentage d'agrégation (C).

Figure 15 : Test de la fonction plaquettaire : agrégométrie et courbe de transmission lumineuse. Source (36)

Une cellule photoélectrique mesure en continu la variation de la transmission lumineuse. Cette variation est enregistrée et transmise à un ordinateur pour être transcrite sous la forme d'une courbe d'agrégation (TL/temps). L'aspect des courbes dépend de la nature et de la concentration de l'agoniste utilisé.<sup>(37,38)</sup> (Fig.16)

La réalisation de ce test fait l'objet de recommandations précises de la société internationale de thrombose et d'hémostase<sup>(37)</sup>

Le test est réalisé en plasma riche en plaquettes (PRP) préparé par centrifugation du sang citraté 10 min à 1000-1200tr (mais peut être abaissé à 800-900 tr en cas de thrombopénie), à température ambiante, sans frein, ou par sédimentation en cas de plaquettes géantes. En cas de taux plaquettaire < 150 G/L, les résultats seront interprétés avec prudence.<sup>(37)</sup>

La transmission lumineuse correspondante au PRP avant activation est de 0 % du fait que les plaquettes libres sous agitation forment un milieu opaque. Un point 100 % de transmission lumineuse est déterminé par l'utilisation d'un PPP (Plasma Pauvre en Plaquettes).

Dans la suite de la procédure analytique, le technicien va ajouter un agoniste induisant l'activation plaquettaire et de ce fait l'agrégation des plaquettes. Ce phénomène va se propager à l'ensemble des éléments du milieu réactionnel, se traduisant par une augmentation progressive du passage lumineux et la formation d'une sigmoïde au niveau du tracé d'enregistrement, témoin d'une agrégation progressive de l'ensemble des plaquettes.

Les résultats sont représentés sous la forme d'une courbe d'agrégation. Le paramètre le plus utilisé est le pourcentage maximal d'agrégation.

L'anomalie distinctive des plaquettes SBS est un défaut isolé de l'agglutination induite par la ristocétine. Les réponses d'agrégation à des agonistes tels que l'ADP ou le collagène sont normales, mais des réponses diminuées à la thrombine peuvent être observées. (Fig.16)

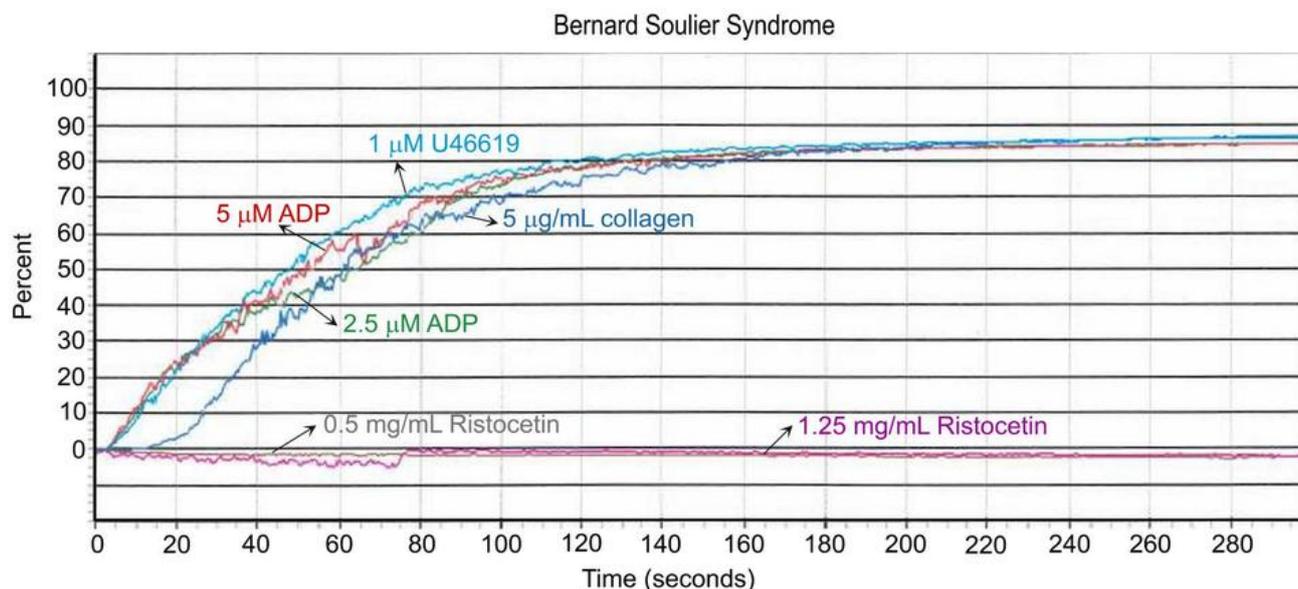


Figure 16 : courbe d'agrégométrie chez un patient porteur de SBS homozygote. Courbe plate en réponse à la ristocétine forte dose. source : (39)

Après contrôle de la ligne de base et de l'absence d'agrégation spontanée, un panel d'agonistes est ajouté, le plus souvent : ADP, adrénaline, collagène, acide arachidonique. L'agglutination induite par la ristocétine (1,2 et 0,5mg/mL) est testée systématiquement. Ils agissent respectivement :

- **L'acide arachidonique** : est métabolisé par le système des cyclo-oxygénases (COX) afin de former le thromboxane A2 (TXA2) et permet ainsi l'étude de la voie d'activation des plaquettes par le TXA2.
- **L'adénosine diphosphate (ADP)** : permet d'explorer l'agrégation plaquettaire via l'interaction avec les récepteurs membranaires de type P2Y (P2Y12 et P2Y1 majoritairement).
- **L'adrénaline** : permet l'exploration de la voie d'activation plaquettaire par le biais des récepteurs adrénergiques.
- **Le collagène** : L'adhésion des plaquettes aux fibres de collagène va provoquer la sécrétion d'ADP par les grains denses ainsi que la synthèse de TXA2 provoquant ainsi l'agrégation plaquettaire. Ceci s'observe à faible concentration de collagène. Lors de l'ajout d'une forte

concentration, l'agrégation va être indépendante du TXA2 par mobilisation du calcium intracellulaire.

**- La ristocétine** : Initialement utilisée en tant qu'antibiotique, la ristocétine a la capacité de provoquer la fixation du facteur vWF à la membrane plaquettaire via GPIb. Il induit ainsi l'agglutination plaquettaire. Il ne devrait pas être considéré comme un agoniste en tant que tel car n'induit pas d'agrégation des plaquettes.

Concernant la pathologie de Bernard-Soulier, il a été décrit précédemment que les patients présentent un déficit au niveau du complexe récepteur GPIb/IX/V. Ceci se traduit par un défaut d'interaction des plaquettes avec le vWF. La réponse à la ristocétine est ainsi altérée, l'agglutination n'étant pas possible. Néanmoins la réponse aux autres agonistes reste normale.<sup>(40)</sup> La réponse de l'agrégation à la ristocétine chez les patients hétérozygotes est similaire à celle de la population témoin saine.<sup>(28)</sup>

Le compte plaquettaire conditionnant la réalisation de l'agrégométrie est fixé entre 100 et 300 G/L et ne doit pas être inférieur à 100 G/L. En cas de SBS homozygote, la thrombopénie peut être profonde. Dans ce cas, la cytométrie en flux est préférable pour le diagnostic du syndrome de Bernard Soulier.

#### 1.2.6.4 Cytométrie

La cytométrie en flux (CMF) offre une variété de possibilités pour explorer les plaquettes de façon relativement simple et rapide. Le cytomètre nécessite la combinaison de 3 systèmes :

**-Fluidique** : Pour introduire et canaliser les cellules par hydrofocalisation dynamique (les cellules passent en suspension dans une veine liquide).

**-Optique** : Une source d'excitation et de récupération des signaux. Chaque cellule passe devant une source d'excitation lumineuse. Les fluorochromes associés aux cellules marquées vont émettre un signal lumineux qui sera détecté par un photomultiplicateur (PMT) à une longueur d'onde variable selon de le fluorochrome utilisé.

**-Electronique** : Pour convertir les signaux optiques en signaux électroniques proportionnels et les numériser pour les analyser avec un ordinateur.

De manière plus pratique, la cellule à identifier passe de manière unitaire dans une gaine liquide, devant un faisceau laser et l'automate analyse la lumière diffractée par différents angles.

- La lumière transmise au petit angle FSC (Forward Scattered light) correspond au rayon lumineux traversant l'élément cellulaire. Il renseigne sur la taille cellulaire.
- La lumière diffractée au grand angle SSC (Side Scattered light) correspond au rayon lumineux diffracté par l'élément cellulaire et renseigne sur la structure de celui-ci. (Fig.17)

Une troisième dimension a été apportée via le marquage fluorescent. En effet il est possible d'analyser l'intensité de cette fluorescence, correspondant à l'intensité de marquage et ainsi à la quantité du contenu cellulaire marqué par le fluorochrome.

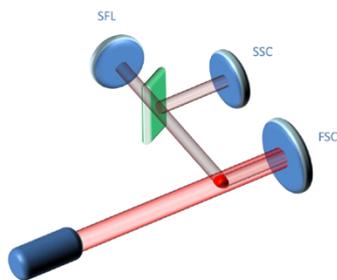


Figure 17 : Schéma simplifié de la technologie de fluorocytométrie tridimensionnelle.  
FSC: Forward Scattered Light. SSC: Side Scattered Light. SFL: Side Fluorescent light.  
Source (32)

Le prélèvement (sang EDTA) est mis en incubation avec les anticorps marqués du fluorochrome. Après une étape de lyse des GR et de lavage, l'échantillon peut être passé sur le cytomètre.

Lors du passage de la cellule devant le faisceau lumineux d'un laser, les signaux émis sont séparés par des filtres optiques, collectés par des photomultiplicateurs (PMT), amplifiés, numérisés, traités et stockés. (Fig.18)

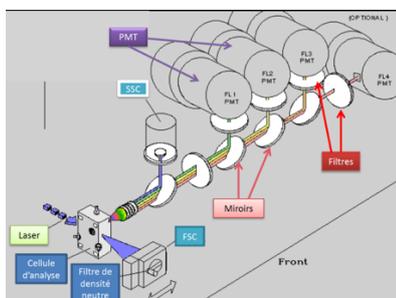


Figure 18 : Représentation schématique du banc optique du cytomètre en flux  
Source (41)

Les différents signaux optiques émis par la cellule doivent être focalisés, séparés, puis acheminés vers des systèmes de détection, photomultiplicateurs ou photodiodes. Ils sont pour cela sélectionnés par différents circuits optiques, composés d'une alternance de miroirs et de filtres. La lumière est recueillie et transformée en signal électrique par un photomultiplicateur ou une photodiode (PMT).<sup>(41-43)</sup>

Les résultats obtenus et analysés sont le nombre d'événements comptés (nombre de plaquettes), le pourcentage d'événements totaux et la moyenne d'intensité de fluorescence (MFI). Représentation des paramètres mesurés sous forme d'**histogramme (1 paramètre)**. (Fig.19)

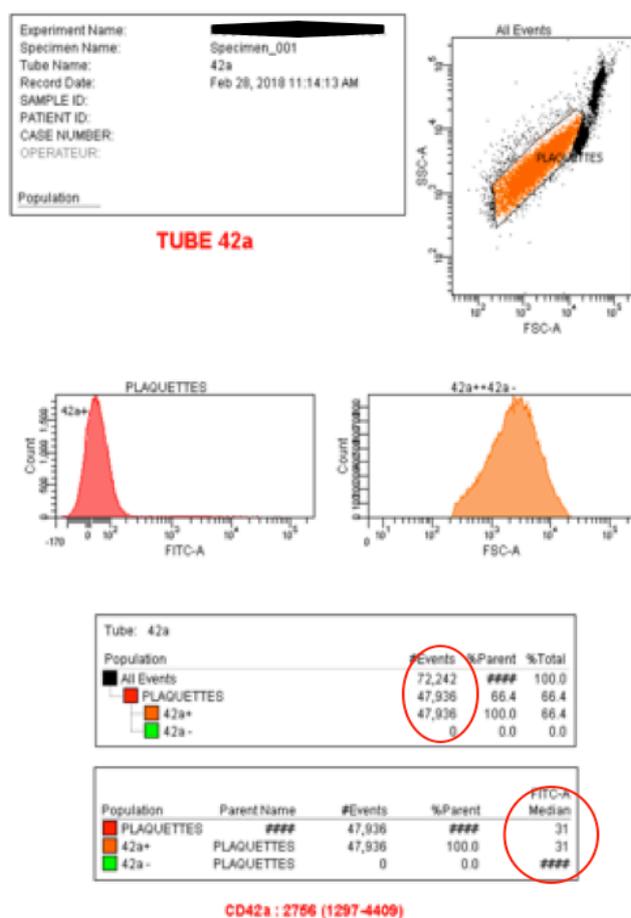


Figure 19 : exemple de résultat de cytométrie pour le marqueur CD42 a chez un patient homozygote.

Source : service d'Hématologie GHSR 2016

Entourés en rouge : le nombre d'événements comptés par le cytomètre, et la moyenne de fluorescence pour le CD42a.

Le panel d'anticorps le plus utilisé en dépistage de thrombopathie allie les anticorps reconnaissant la GpIb-V-IX et la GPIIb-IIIa ainsi que la P-sélectine, marqueur d'activation des

plaquettes. Les anticorps monoclonaux CD41 (IIb) et CD61 (IIIa) dirigés contre le complexe glycoprotéique GPIIb-IIIa mettent en évidence la thrombasthénie de Glanzmann. Dans ce cadre de notre étude, ils servaient alors d'indicateur de la taille des plaquettes.<sup>(44)</sup>

Les anticorps monoclonaux CD42b (Ib) et CD42a (IX) dirigés contre le complexe glycoprotéique membranaire Ib-IX récepteur du facteur Willebrand révèlent la maladie de Bernard-Soulier. Chez les homozygotes le complexe GPIb-IX-V est habituellement indétectable ou exprimé à des niveaux très bas, comme indiqué dans la plus grande série de cas de 13 patients atteints de SBS. Dans cette étude, les hétérozygotes exprimaient normalement GPIb $\alpha$  et GPIIX et ne pouvaient pas être identifiés par cytométrie en flux.<sup>(28)</sup>

D'autres publications mettent en évidence que les hétérozygotes ont également une expression de surface de la GP Ib-IX diminuée de 50% par rapport aux témoins.<sup>(45)</sup>

En cas de SBS homozygote :

- Une augmentation de la moyenne de fluorescence du CD41 et CD61 est classiquement observée à cause de la taille des plaquettes. Une plaquette géante présente plus de GP de surface qu'une plaquette de taille normale.
- Une diminution significative de l'intensité moyenne de fluorescence (MFI) du CD42a et du CD42b est rencontrée. (Fig.20).

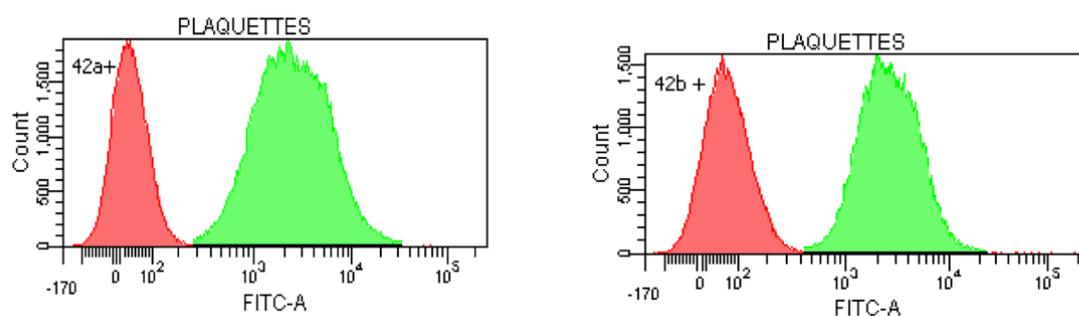


Figure 20 : Résultats de la CMF pour le CD42 a et b du patient SBS homozygote (rouge) comparé à un témoin normal (vert) sous forme d'histogramme.

Source : service d'Hématologie GHSR 2016

En vert le témoin et en rouge le patient

### 1.2.6.5 Diagnostic génétique

Le conseil génétique devrait suivre les normes établies pour toutes les maladies autosomiques récessives.

L'analyse génétique est la technique qui permet de définir de manière fiable et précise la pathologie en cause chez un patient par la détermination de la mutation du gène en cause.

Dans la maladie de Bernard soulier, elle constitue le diagnostic de certitude et est nécessaire pour un conseil génétique familial et les études généalogiques.<sup>(46)</sup>

L'analyse des gènes GPIBA, GPIBB et GP9 peut se faire soit en analyse de la mutation ciblée (si elle est connue), soit en séquençage complet des régions codantes (par la méthode de Sanger ou en séquençage nouvelle génération(NGS)).

Les méthodes mises en œuvre font appel à la PCR (Polymerase Chain Reaction).

Le diagnostic des formes pour lequel le diagnostic n'est pas clair, (macro-thrombopénie isolée) on utilise de manière plus aisée la technique NGS (Next Generation Sequencing) ou « Séquençage Haut Débit ».

## 1.2.7 Prise en charge/ traitements disponibles

La sévérité des saignements est imprévisible dans le SBS, l'éducation thérapeutique et la prise en charge rapide des patients sont primordiaux.

### 1.2.7.1 La prévention

Quelques éléments sont à prendre en compte dans l'éducation thérapeutique et la prise en charge. En effet le patient ne doit pas pratiquer de sports de contact afin d'éviter les traumatismes, être vacciné contre l'hépatite B, éviter d'utiliser des anti-inflammatoires non stéroïdien, préserver l'hygiène dentaire pour minimiser les saignements gingivaux.

Il doit être informé de la conduite à tenir lors de la ménarche avec un risque d'hémorragie excessive.<sup>(47)</sup>

### 1.2.7.2 Mesures topiques

-Les plaies superficielles peuvent être gérées par compression ou utilisation d'une éponge de gélatine ou d'une compresse imbibée d'acide tranexamique.

-Le contrôle de l'épistaxis : dans de nombreux cas, l'emballage antérieur ou postérieur (méchage) est nécessaire en dehors de l'utilisation d'autres mesures hémostatiques. Le retrait du nez doit être effectué très doucement en raison d'un risque important de resaignement.<sup>(47)</sup>

### 1.2.7.3 Agents antifibrinolytiques

L'acide tranexamique ou l'acide epsilon-aminocaproïque administré seul peut être très utile pour arrêter ou diminuer l'hémorragie chez les patients souffrant d'épistaxis, de saignement gingival ou de ménorragie.

Ces agents sont également utiles pour la prévention du saignement après des interventions chirurgicales mineures.

Les deux agents peuvent être administrés par voie intraveineuse ou orale. Pour l'utilisation orale de l'acide epsilon aminocaproïque, une dose de 60-80 mg / kg 3-4 fois par jour est donnée, et pour l'acide tranexamique, une dose de 15-25 mg / kg 3 -4 fois par jour est recommandée.<sup>(47)</sup>

### 1.2.7.4 Transfusion de plaquettes

La transfusion de plaquettes a été le mode de traitement le plus efficace pour les épisodes hémorragiques et en prophylaxie pendant la chirurgie.

Les principales préoccupations concernant l'utilisation de composants sanguins chez les patients présentant des dysfonctions plaquettaires sévères sont le développement potentiel d'anticorps allo-immuns contre les antigènes HLA et / ou contre les glycoprotéines .

Si les donneurs HLA et ABO compatibles ne sont pas disponibles, les composants sanguins déleucocytés doivent être utilisés. L'utilisation de concentré plaquettaire d'aphérèse de donneurs uniques réduit le risque d'allo-immunisation contre  $\alpha_{IIb}\beta_3$ , diminuant ainsi le risque d'être réfractaire aux transfusions de plaquettes.

Les transfusions de plaquettes après la chirurgie doivent être poursuivies jusqu'à ce que la cicatrisation des plaies ait été réalisée et pendant au moins 2 jours après la fin des épisodes hémorragiques graves.

#### 1.2.7.5 Gestion par rFVIIa

Le mécanisme par lequel le rFVIIa arrête le saignement n'a pas été rigoureusement élucidé, mais a été attribué à :

- L'augmentation génération de thrombine liée à l'activation directe de facteur X par rFVIIa lié aux surfaces plaquettaires par un mécanisme indépendant du facteur tissulaire.

- L'amélioration de l'adhésion des plaquettes à la matrice extracellulaire endothéliale et au collagène en conditions de flux, par la thrombine générée.

- La restauration de l'agrégation plaquettaire en présence de facteur X, de facteur II et de fibrinogène par polymérisation de la fibrine formée par la génération de thrombine indépendante du facteur tissulaire.

La posologie consiste en au moins 80 µg/kg de FVIIa administré par voie intraveineuse toutes les 2,5 heures.<sup>(47)</sup>

#### 1.2.8 Diagnostic différentiel

L'exploration d'une thrombopénie chronique est une situation classique. La cause la plus fréquente reste le purpura thrombopénique immunologique PTI.

Le PTI est la cause la plus fréquente des thrombopénies périphériques immunologiques. La thrombopénie résulte classiquement de la destruction accélérée des plaquettes revêtues d'autoanticorps par le système monocyto-macrophagique, en particulier dans le foie et dans la rate. La principale manifestation du PTI est le saignement cutané ou muqueux. Les hémorragies sévères, en particulier cérébroméningées sont rares. Les traitements visent à réduire la destruction périphérique des plaquettes : corticoïdes, immunoglobulines forte dose et splénectomie. Plus récemment, les anticorps monoclonaux dirigés contre les lymphocytes B, ou encore les analogues de la TPO sont utilisés pour les PTI réfractaires.<sup>(48)</sup>

Cependant, il est important de savoir remettre en cause ce diagnostic en cas d'atypie, d'association syndromique, d'antécédents familiaux ou d'évolution inhabituelle. (Fig.21, tableau.1)

Le SBS est difficile à distinguer sur la seule base des manifestations cliniques et a souvent été diagnostiqué à tort comme un purpura thrombocytopénique idiopathique (PTI).

Une thrombopénie constitutionnelle doit être envisagée devant un ou plusieurs éléments parmi les suivants :

- la présence de la thrombopénie depuis l'enfance surtout s'il existe une histoire familiale de thrombopénie ou de syndrome hémorragique ;
- l'absence de réponse aux traitements classiques des thrombopénies auto-immunes (corticoïdes, immunoglobulines intraveineuses) ;
- la présence d'anomalies morphologiques des plaquettes : taille anormale, absence de granules ;
- la présence de corps de Döhle dans les polynucléaires ;
- l'association avec des signes extra-hématologiques (surdité, néphropathie, cataracte, retard mental, malformations osseuses, etc.) (4)

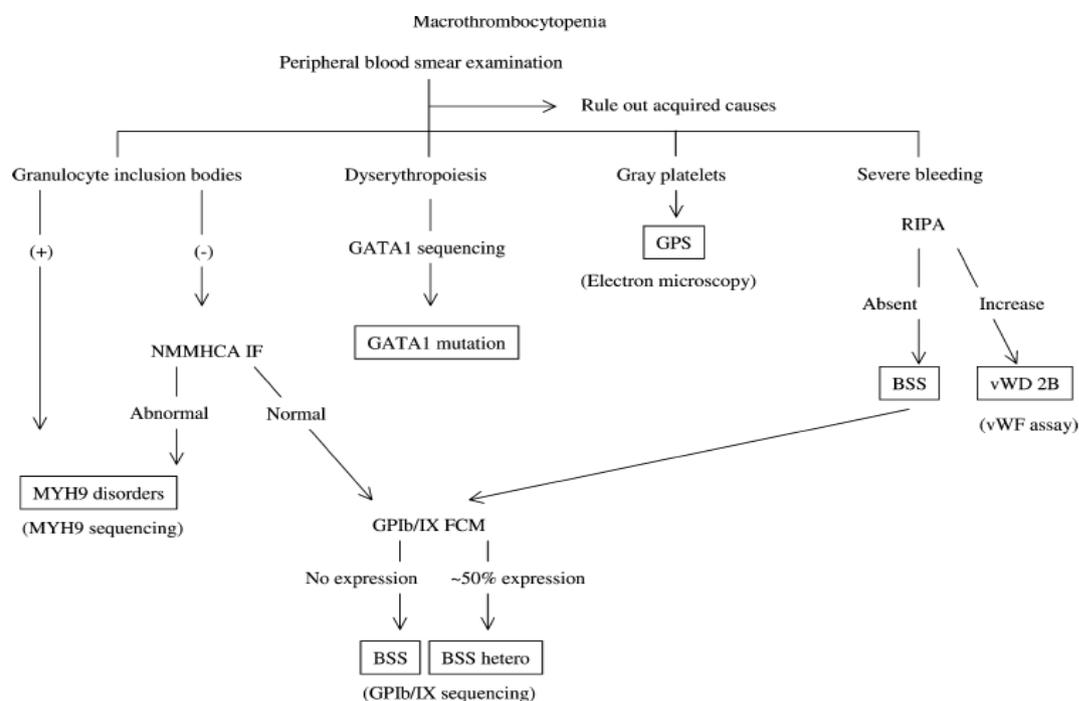


Figure 21 : Algorithme de diagnostic pour les patients atteints de macro-thrombopénie non syndromique.

Source :{49}

Les parenthèses comprennent des analyses confirmatoires. NMMHCA IF: analyse par immunofluorescence de neutrophiles NMMHCA; RIPA: agglutination plaquettaire induite par la ristocétine; SBS: syndrome de Bernard-Soulier; SBS hétéro: syndrome de Bernard-Soulier hétérozygote; vWD 2B: la maladie de von Willebrand type 2B; GPIb / IX FCM: analyse cytom trique en flux du complexe GPIb / IX; GPS: plaquette grise syndrome.

Les principales autres macro-thrombopénies constitutionnelles sont résumées dans le tableau suivant :

Maladies	Transmission	gène	chromosome	Données cliniques et biologiques	ONIM
Anomalies du cytosquelette plaquettaire macro-thrombopénie avec inclusions leucocytaires / troubles MYH9 *	AD	MYH9	22q12-13	Macro-thrombopénie, granulocyte avec inclusions avec / sans SD d'Alport	155100, 605249, 53640, 153650
Anomalies dans les facteurs de transcription Thrombocytopénie de Paris-Trousseau /syndrome de Jacobsen	AD	FLI1	11q23	Syndrome de gènes contigus dû à microdélétion 11q23 Dysmegakaryopoiesis associé à des granules $\alpha$ géants Retard de croissance et retard psychomoteur	188025, 600588/47791
Macrothrombopenie liée à l'X avec dyserythropeïese	XL	GATA1	Xp11	Dyserythropeïese avec ou sans trait $\beta$ -thalassemique	300367, 314040
Syndrome des plaquettes grises	AR	NBEAL2	3p21	Plaquettes grises, myelofibrose et splénomégalie	139090

Tableau 1 : caractéristiques des principales macro-thrombopénies congénitales.  
source : (49)

### 1.3 Problématique et objectifs de l'étude

Bien que le syndrome de Bernard Soulier soit connu depuis le XXe siècle et que les gènes en cause aient été identifiés il y a plus de 20 ans, aucune étude n'a été menée sur de grandes cohortes. Dans la plupart des cas, seuls des cas isolés ont été rapportés, rendant la comparaison de leur présentation clinique et la recherche de corrélations génotype / phénotype non réalisable. La communauté scientifique n'a toujours pas de base de données génétique et biologique complète sur la maladie.

L'histoire du peuplement de la Réunion, son caractère insulaire et sa géographie en font un lieu propice à l'étude de traits phénotypiques communs, pour plusieurs maladies génétiques qui se transmettent de génération en génération.

En effet, pour cette maladie rare dont l'incidence mondiale est estimée à moins de 1/1000000, on y constate une prévalence beaucoup plus élevée sur l'île de la Réunion.

A ce jour il a été diagnostiqué 13 homozygotes, provenant de 7 familles différentes, et 12 hétérozygotes apparentés. Nous pouvons estimer une prévalence de 13 patients/850000 habitants, ce qui est bien supérieur à la prévalence mondiale connue. Ce chiffre étant sûrement sous-évalué en raison des difficultés diagnostiques connues de cette pathologie

L'analyse génétique effectuée chez les 25 patients a montré qu'ils portaient la même mutation portant sur le gène *GP1BB*.

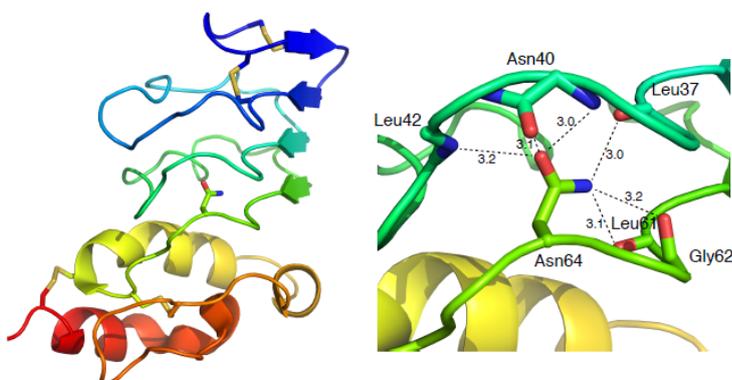
Le séquençage de la région codante *GP1BB* a révélé la même transition c.265A> G (NM\_000407.4). Cette mutation prédit un changement d'acide aminé p.Asn89Asp dans GPIIb $\beta$  (remplaçant l'asparagine en aspartate) ; avec pour modification : p.Asn64Asp sur la protéine mature (numérotation selon la nomenclature de l'Organisation du génome humain-<http://varnomen.hgvs.org/>). (Fig.22).



Figure 22 : ASN 64 un résidu très conservé  
Source (50)

Il s'agit d'un résidu bien conservé qui est essentiel pour maintenir la structure tridimensionnelle du motif de répétition riche en leucine.

Les acides aminés Asn89 hydrophiles sont enfouis avec la chaîne latérale pointant vers le noyau hydrophobe et, pour cette raison, leur substitution avec des résidus chargés est nuisible au maintien de la conformation de la protéine. <sup>(17)</sup> (Fig.23)



Ci-contre : vue rapprochée du vaste réseau de liaisons hydrogène qui entoure Asn64 avec 6 liaisons très soudées avec des atomes de squelette polaires. Distance en angström.

Figure 23 : Localisation de ASN 64 .À gauche: structure du domaine extracellulaire GPIIb $\beta$ .  
Source : (51)

Une vaste étude des arbres généalogiques de ces 7 familles en apparence non apparentées a révélé une ancêtre commune née en 1671 en Inde. ( Fig.24) <sup>(51)</sup>

Cette ancêtre commune remonte à 10-14 générations. De nombreux bateaux venant d'Europe faisaient escale à la Réunion avant de rejoindre l'Inde. De jeunes indo-portugaises en particulier de la côte Malabar du côté de Goa sont arrivées sur l'île en Novembre 1678, avec l'arrivée du "Rossignol" en provenance de Surate.

C'est un certain Teixeira da Motta, né de père portugais et de mère indienne qui ramena de l'Inde ces 14 filles de mères indiennes, pour les unir à des colons français. Parmi les indiennes arrivées de GOA en Novembre 1678 sur le "Rossignol", c'est une certaine Thérèse HEROS, métisse indienne, née vers 1671, décédée vers 1729 à ST PAUL, qui de deux unions successives donnera les cas de notre étude.

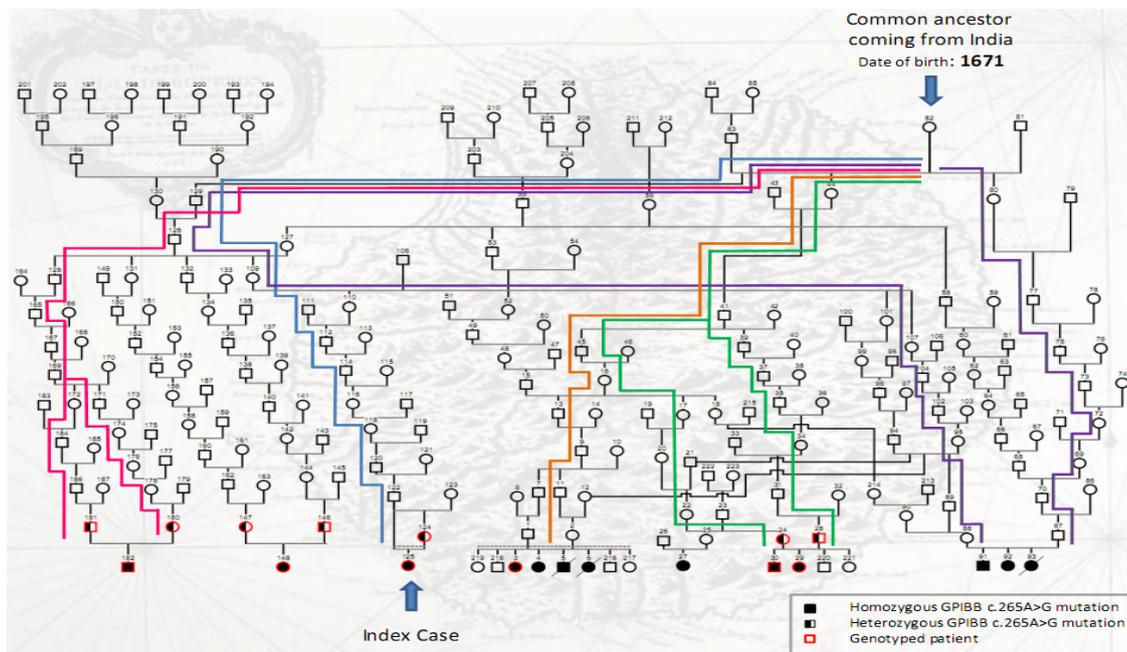


Figure 24 : arbre généalogique représentant 7 familles ,13 cas, ayant un ancêtre commun. source (51)

L'effet fondateur est donc supposé. C'est un phénomène qui survient en général quand un petit sous-groupe d'une population plus grande s'établit comme une entité séparée et isolée. Le pool génétique du sous-groupe porte seulement une fraction de la diversité génétique de la population parentale résultant en une fréquence accrue de certaines maladies dans le sous-groupe, en particulier les maladies connues pour être autosomiques récessives. <sup>(52,53)</sup>

Le syndrome de Bernard Soulier est difficile à diagnostiquer du fait de sa rareté et de sa méconnaissance. Comme la plupart des thrombopathies congénitales, il est souvent diagnostiqué à tort comme un PTI, donnant lieu à des errances diagnostiques et des traitements inappropriés (corticothérapie au long cours, immunosuppresseurs) voire délétères (splénectomie).

Le but de ce travail était d'étudier les caractéristiques clinico-biologiques des cas diagnostiqués rétrospectivement à la Réunion, afin de déterminer les caractéristiques qui permettraient de faciliter le dépistage des patients hétérozygotes ou homozygotes.

## 2 MATERIEL ET METHODE

### 2.1 Source de données-critères d'inclusion.

Pour mener à bien notre étude, nous avons analysé et vérifié les données de listes de patients pour lesquels le diagnostic de Bernard Soulier a été retenu. Nous avons croisé les listes obtenues à partir des registres internes informatisés des deux services d'hématologie biologique hospitaliers de l'île avec celles extraites du dossier patient informatisé du CHU.

Nous avons choisi une période d'observation de 11 ans, entre le 1er janvier 2007 et le 31 mai 2018, afin d'inclure un nombre significatif de patients.

Les analyses génétiques ont été effectuées par L'EFS de Strasbourg dans le cadre de l'étude menée par le Dr LANZA et ses collaborateurs.

Tous les patients porteurs de la mutation à l'état homozygote et hétérozygote ont été inclus afin de définir les critères clinico-biologiques de cette population.

### 2.2 Recueil des données cliniques

Les données cliniques des patients étaient recueillies de façon rétrospective à partir des dossiers médicaux, et complétées par consultations téléphoniques ou physiques. Les données recueillies étaient :

-le sexe,

- l'âge au diagnostic, avec les antécédents de diagnostic de PTI
- les antécédents personnels chirurgicaux
- les antécédents familiaux des patients, notamment la notion d'une histoire hémorragique, thrombopénique familiale
- les traitements en cours et passés
- la présence d'anticorps anti-plaquettes et si le patient est réfractaire aux transfusions
- si une splénectomie a été pratiquée
- le nombre de grossesses et le nombre d'accouchements
- les épisodes hémorragiques classés en fonction de leur gravité : le phénotype de saignement était établi selon le questionnaire mis à disposition par la société internationale de thrombose et d'hémostase (ISTH Bleeding assessment tool) ; les scores allant de 0 (absence de saignement) à 4 (gravité ayant nécessité une transfusion). Le détail se trouve dans la figure 25, en fonctions du type de saignement. <sup>(54)</sup>

Les scores ISTH obtenus étaient comparés à une population de référence, en appariant pour chaque patient le sexe et l'âge, selon les valeurs normales proposée par l'ISTH. <sup>(55)</sup> (Tableau 2)

Normal adult and paediatric data collected with four different BATs.

	Adults			Children		
	Female (n = 705)	Male (n = 335)	P value	Female (n = 169)	Male (n = 159)	P value
Mean age (years) (range)	43 (18–88)	43 (18–82)	0.788	9 (0.4–17)	9 (0.7–17)	0.610
Blood group O (%)	188/469 (40)	87/192 (45)	0.861	27/65 (42)	31/80 (39)	0.714
VWF:Ag (IU mL <sup>-1</sup> ), mean (range)	1.25 (n = 408) (0.52–3.99)	1.29 (n = 188) (0.50–4.35)	0.476	1.01 (n = 48) (0.50–3.97)	0.91 (n = 53) (0.41–2.52)	0.298
VWF:RCo (IU mL <sup>-1</sup> ), mean (range)	1.12 (n = 307) (0.50–2.90)	1.16 (n = 149) (0.50–4.24)	0.439	0.92 (n = 23) (0.32–2.72)	0.74 (n = 22) (0.35–1.22)	0.147
FVIII:C (IU mL <sup>-1</sup> ), mean (range)	1.21 (n = 387) (0.50–2.75)	1.21 (n = 185) (0.52–3.12)	0.814	1.17 (n = 41) (0.66–2.40)	1.17 (n = 44) (0.57–2.08)	0.989
Median bleeding score (range)	1 (0–6)	0 (0–4)	<0.001	0 (0–2)	0 (0–2)	0.599

Mean values for the following laboratory results are shown: VWF:Ag (von Willebrand factor antigen, n = 697), VWF:RCo (von Willebrand factor:ristocetin co-factor, n = 501), and FVIII:C (factor VIII coagulant activity, n = 657). Shaded boxes show BS data. BS range in normal children is 0–2 for males and females (P = 0.599), 0–3 for adult males, and 0–5 for adult females (P < 0.001).

**Tableau 2 : Données adultes et pédiatriques normales recueillies à l'aide de quatre outils d'évaluation différents. Source : ISTH/SSC Haemophilia. 2014**

Les valeurs moyennes pour les résultats de laboratoire suivants sont indiquées : L'échelle de score de saignement chez les enfants normaux est 0-2 (moyenne 0) pour les hommes et les femmes (P = 0,599), 0-4 (moyenne 0) pour les hommes adultes, et 0-6 (moyenne 1) pour les femmes adultes (P < 0,001).

SYMPTOMS (up to the time of diagnosis)	SCORE				
	0 <sup>s</sup>	1 <sup>s</sup>	2	3	4
Epistaxis	No/trivial	- > 5/year or - more than 10 minutes	Consultation only*	Packing or cauterization or antifibrinolytic	Blood transfusion or replacement therapy (use of hemostatic blood components and rFVIIa) or desmopressin
Cutaneous	No/trivial	For bruises 5 or more (> 1cm) in exposed areas	Consultation only*	Extensive	Spontaneous hematoma requiring blood transfusion
Bleeding from minor wounds	No/trivial	- > 5/year or - more than 10 minutes	Consultation only*	Surgical hemostasis	Blood transfusion, replacement therapy, or desmopressin
Oral cavity	No/trivial	Present	Consultation only*	Surgical hemostasis or antifibrinolytic	Blood transfusion, replacement therapy or desmopressin
GI bleeding	No/trivial	Present (not associated with ulcer, portal hypertension, hemorrhoids, angiodyplasia)	Consultation only*	Surgical hemostasis, antifibrinolytic	Blood transfusion, replacement therapy or desmopressin
Hematuria	No/trivial	Present (macroscopic)	Consultation only*	Surgical hemostasis, iron therapy	Blood transfusion, replacement therapy or desmopressin
Tooth extraction	No/trivial or none done	Reported in ≤25% of all procedures, no intervention**	Reported in >25% of all procedures, no intervention**	Resuturing or packing	Blood transfusion, replacement therapy or desmopressin
Surgery	No/trivial or none done	Reported in ≤25% of all procedures, no intervention**	Reported in >25% of all procedures, no intervention**	Surgical hemostasis or antifibrinolytic	Blood transfusion, replacement therapy or desmopressin
Menorrhagia	No/trivial	Consultation only* or - Changing pads more frequently than every 2 hours or - Clot and flooding or - PBAC score>100 <sup>#</sup>	- Time off work/school > 2/year or - Requiring antifibrinolytics or hormonal or iron therapy	- Requiring combined treatment with antifibrinolytics and hormonal therapy or - Present since menarche and > 12 months	- Acute menorrhagia requiring hospital admission and emergency treatment or - Requiring blood transfusion, Replacement therapy, Desmopressin, or - Requiring dilatation & curettage or endometrial ablation or hysterectomy)
Post-partum hemorrhage	No/trivial or no deliveries	Consultation only* or - Use of syntocin or - Lochia > 6 weeks	- Iron therapy or - Antifibrinolytics	- Requiring blood transfusion, replacement therapy, desmopressin or - Requiring examination under anaesthesia and/or the use of uterin balloon/package to tamponade the uterus	- Any procedure requiring critical care or surgical intervention (e.g. hysterectomy, internal iliac artery ligation, uterine artery embolization, uterine brace sutures)
Muscle hematomas	Never	Post trauma, no therapy	Spontaneous, no therapy	Spontaneous or traumatic, requiring desmopressin or replacement therapy	Spontaneous or traumatic, requiring surgical intervention or blood transfusion
Hemarthrosis	Never	Post trauma, no therapy	Spontaneous, no therapy	Spontaneous or traumatic, requiring desmopressin or replacement therapy	Spontaneous or traumatic, requiring surgical intervention or blood transfusion
CNS bleeding	Never	-	-	Subdural, any intervention	Intracerebral, any intervention
Other bleedings <sup>^</sup>	No/trivial	Present	Consultation only*	Surgical hemostasis, antifibrinolytics	Blood transfusion or replacement therapy or desmopressin

Figure 25 : score ISTH de saignement.  
Source (54)

### 2.3 Recueil des données biologiques

Les données biologiques des patients inclus en rétrospectif étaient recueillies dans les fichiers patients du laboratoire. La numération plaquettaire retenue étant celle du jour du passage de la cytométrie (passage concomitant).

### 2.3.1 Numération et volume plaquettaire moyen (VMP)

Le prélèvement de sang périphérique était effectué selon le manuel de prélèvement du GHSR, c'est-à-dire effectué sur EDTA. La vérification de la conformité de l'échantillon est effectuée lors de la réception du prélèvement. La numération des plaquettes (G/L) et le VMP (fL) étaient obtenus sur l'automate Sysmex® XE-5000, avec un comptage en mode optique ou un comptage manuel en cellule Unopet® si agrégats plaquettaires ou thrombopénie <50 G/L avec des alarmes de l'automate. Le VMP était rendu lorsque l'automate ne décelait pas une trop forte anisothombocytose.

### 2.3.2 Cytométrie

Le laboratoire d'hématologie du GHSR dispose d'un cytomètre BD FACSCANTO II™

Les analyses ont été effectuées sur sang périphérique contenu dans l'EDTA, après passage sur l'automate XE-5000 afin d'obtenir la numération plaquettaire du jour ainsi que d'effectuer un frottis pour décrire la morphologie plaquettaire, avec un volume de sang suffisant pour permettre l'acquisition d'un million de leucocytes.

Le panel d'anticorps utilisé a été conçu pour screener les thrombopathies Glanzmann et Bernard-Soulier.<sup>(56)</sup>

Les anticorps utilisés sont les suivants, tous couplés au fluorochrome FITC (fluorescein isothiocyanate) :

- IgG1-FITC (*Becton Dickinson*®) : constitue le contrôle isotypique avec un anticorps polyclonal.
- CD41a-FITC (*Dako*®) : reconnaît la GPIIb (Thrombasthénie de Glanzmann)
- CD61-FITC (*Dako*®) : reconnaît la GPIIIa (Thrombasthénie de Glanzmann)
- CD42a-FITC (*Becton Dickinson*®) : reconnaît la GPIX (Bernard Soulier)
- CD42b-FITC (*Pharmingen*®) : reconnaît la GPIb $\alpha$  (Bernard Soulier)

Les anticorps monoclonaux CD41 (IIb) et CD61 (IIIa) dirigés contre le complexe glycoprotéique GPIIb-IIIa mettent en évidence la thrombasthénie de Glanzmann.

Les anticorps monoclonaux CD42b (Ib) et CD42a (IX) dirigés contre le complexe glycoprotéique membranaire Ib-IX récepteur du facteur Willebrand révèlent la maladie de Bernard Soulier. Cinq tubes sont utilisés pour l'analyse (un Ac/tube) et 100 µL de sang de patient sont utilisés pour chaque tube. Après incubation et lavage selon la procédure rédigée par le laboratoire, une fois les tubes passés, les résultats étaient analysés grâce au logiciel BD FACSDiva™ Software. Les résultats sont obtenus en moyenne de fluorescence (MFI). Un témoin était systématiquement passé de manière concomitante aux patients.

### 2.3.3 Génétique

Toutes les analyses génétiques ont été réalisées au laboratoire de l'EFS de Strasbourg (Dr LANZA, Dr DUPUIS).

### 2.3.4 Expression des résultats – Statistiques

Les valeurs qualitatives étaient exprimées en pourcentage. Les valeurs quantitatives étaient exprimées en moyenne et écart-type. Les résultats étaient analysés par des tests statistiques T de Student sur des échantillons appariés ou indépendants selon la configuration afin de comparer si les moyennes des variables quantitatives étaient significativement différentes entre les différents groupes.

Les scores moyens d'ISTH étaient comparés par des tests statistiques T de Student en considérant les échantillons comme appariés. Les moyennes de valeurs de fluorescence en cytométrie étaient comparées par une analyse de la variance (ANOVA) sur les trois groupes de populations : témoins, hétérozygotes, homozygotes. Une comparaison par test de Bonferroni a permis de déterminer les différences significatives entre les moyennes des groupes. Le seuil de significativité retenu était de 95% (p value <0,05).

Le faible nombre de sujets dans l'échantillon, ne suivant pas une loi normale, tous les résultats étaient vérifiés selon des tests non paramétriques

Le seuil de significativité retenu était de 95% (p value <0,05).

### 3 RESULTATS

Entre 2007 et 2018, 13 patients homozygotes et 12 patients hétérozygotes ont été diagnostiqués et pris en charge dans notre centre.

L'analyse des communes de naissance des patients a mis en évidence que 98 % d'entre eux étaient nés dans la commune où se trouve notre centre (Saint-Pierre) ou dans une commune limitrophe (Saint-Louis – Le Tampon – Petite-Ile) (Fig. 26, tableau 3).

Ville de naissance	Homozygote	Hétérozygote	Cohorte totale
Saint-Pierre	61,5%	33 %	48 %
Saint-Louis	23%	46 %	32%
Le Tampon	8%	17 %	12%
Petite-Ile	8%	0	4%
L'Etang Salé	0	8 %	4%

Tableau 3 : Pourcentage de répartition des patients selon la ville de naissance

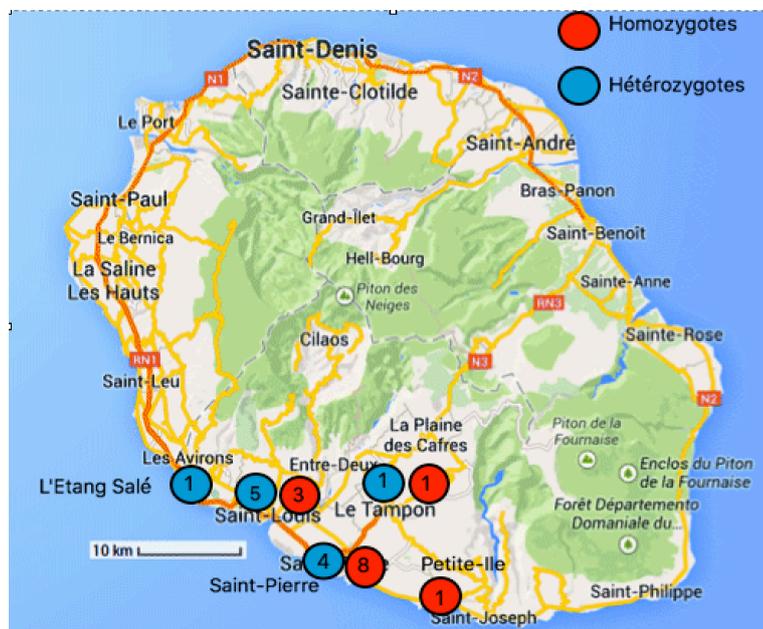


Figure 26 : lieux de naissance des patients de l'étude.

## 3.1 Caractéristiques générales des patients inclus dans l'étude

### 3.1.1 Population de patients homozygotes

Cette population était constituée de 13 patients, dont 8 femmes (62%) et 5 hommes (38%). L'âge moyen au diagnostic était de 16 ans +/-19,6 ans. Ce qui semble tardif pour une pathologie constitutionnelle avec une diathèse hémorragique importante présente dès l'enfance. Il est à noter que 50% des patients avaient plus de 21 ans au diagnostic avec un âge maximal de 54 ans et minimal de 8 mois.

Homozygote	Âge actuel	Âge au diagnostic de BSS	Âge début symptômes	Errance diagnostique
1	46	44	4	40
2	19	8	1	7
3	10	1	1	0
4	37	1	1	0
5	34	9	9	0
6	35	14	unknown	0
7	11	1	0	0
8	43	14	14	0
9	30	15	6	9
10	7	1	0	1
11	56	53	0	53
12	13	0	0	0
13	53	50	2	48
Moyenne	30	16	3	12

Tableau 4 : Tableau représentant l'âge actuel, l'âge au diagnostic, l'âge au début des symptômes et l'errance diagnostique de la population homozygote (en année).

Chez 5 patients homozygotes sur 13, le diagnostic de SBS a été évoqué dès la naissance ou durant la première année de vie, soit lors de la découverte fortuite d'une thrombopénie importante (patients 3 et 12) avec la notion de consanguinité familiale, soit lors d'un saignement important et inhabituel (saignement important à la poussée dentaire ou hémorragie méningée chez les patients 4 et 11 respectivement).

La notion d'antécédents familiaux de SBS a facilité le diagnostic notamment pour les patients 5 et 6 qui sont sœurs, appartenant à une grande fratrie de 8 enfants, dont deux sont décédés avec un diagnostic de SBS.

Le diagnostic de SBS a été réalisé chez la patiente 5 lors de la puberté à l'apparition d'une ménarche hémorragique ayant nécessité une transfusion. Sa sœur (patiente 6) présentait des ecchymoses, des gingivorragies et des ménorragies.

La patiente 8 a été diagnostiquée également lors de l'apparition d'une ménarche hémorragique.

L'errance diagnostique a été beaucoup plus longue pour les patients 1, 2, 9, 11 et 13. Elle était en moyenne de 12 ans.

En effet, concernant le patient 1 : dans ses antécédents, nous retenons une thrombopénie congénitale sévère explorée à plusieurs reprises, notamment en 1976 et 1982 à l'Hôpital Saint-Louis dans le Service du Professeur Jean BERNARD où était, à l'époque, diagnostiquée une probable anomalie de maturation des mégacaryocytes d'origine inconnue.

Cette thrombopénie a entraîné de nombreux saignements avec de multiples transfusions et notamment un hématome de la cuisse opéré en 1992. En 2006, à 33 ans, il est suivi et traité pour une « thrombopénie dans le cadre d'un purpura thrombopénique idiopathique ancien découvert dans l'enfance ». Il est alors sous corticothérapie au long cours, perfusions de gammaglobulines polyvalentes lorsque la thrombopénie était trop profonde et EXACYL, HEMOCLAR en cas d'ecchymose et COALGAN en cas d'épistaxis. Le patient présente des signes cutanés d'imprégnation de corticoïdes avec un faciès semi-lunaire, un buffalo neck, une cataracte bilatérale.

C'est en 2016, à 43 ans, que la reprise de l'histoire de ce patient, ainsi que des analyses spécialisées (cytométrie et génétique) ont permis le diagnostic de SBS.

Concernant le patient 11 : dans ses antécédents celui-ci était connu pour une thrombopénie néonatale avec suivi initial à PARIS par le Professeur JEAN BERNARD, se manifestant parfois par des hématuries, une hémospérmié, et des gingivorragies.

Il a été étiqueté PTI chronique sévère depuis l'enfance, et présente une résistance à la corticothérapie orale, aux IgIV. Il est traité par EXACYL, supplémentation martiale, cures d'IgIV, puis en 2013 est introduit le REVOLADE (50mg/jour), un agoniste oral de la thrombopoïétine (TPO). C'est en 2015 que des investigations réalisées permettent de conclure que le patient ne présente pas un PTI mais un SBS avec sur le frottis sanguin la présence de plaquettes géantes et une absence d'expression du complexe Ib-V-IX en CMF.

Concernant la patiente 13 : un diagnostic de PTI a été posé dans l'enfance et traité initialement par splénectomie à l'âge de deux ans, puis la patiente a été perdue de vue par les hématologues. C'est en 2015 (à l'âge de 50 ans) que la reprise de l'anamnèse oriente vers une thrombopénie congénitale avec :

- Une notion de thrombopénie chronique depuis l'enfance chez son frère, dans un contexte hémorragique, celui-ci étant décédé vers l'âge de 40 ans dans des circonstances indéterminées ainsi que la notion d'une thrombopénie chronique ancienne chez son père (âgé de 86 ans).
- La présence de méno-métrorragies chroniques.
- Un bilan biologique permettant de retenir le diagnostic de SBS (cytométrie et génétique).

Parmi les homozygotes, 38,5 % (5 patients sur 13) avaient dans leurs antécédents un diagnostic erroné de PTI : 60 % d'entre eux ont reçu des corticoïdes au long cours avec les complications connues de ce traitement. En effet, chez le patient 1 on note l'apparition d'une cataracte, fragilité cutanée, prise de poids, des signes cutanés d'imprégnation de corticoïde avec un faciès semi-lunaire.

Deux patients ont été splénectomisés, l'un à l'âge de 6 ans, et l'autre à l'âge de 2 ans (patient 9 et 13 respectivement), lors de la prise en charge erronée d'un PTI réfractaire.

### 3.1.2 Population de patients hétérozygotes

Elle était constituée de 12 patients, dont 58 % de femmes (Sexe Ratio 0,7). L'âge moyen de la population était de 47 ans. La moyenne d'âge lors du diagnostic d'hétérozygotie était de 39 ans +/- 15,2 ans. Il est à noter que 50% des patients étaient diagnostiqués après l'âge de 38 ans, avec un minimum de 18 ans et un maximum de 71 ans.

La plupart des hétérozygotes de l'étude étaient des apparentés au premier degré des propositus homozygotes. Le diagnostic de leur hétérozygotie a de fait été porté lors du diagnostic d'homozygotie du parent.

Hétérozygote	Âge actuel	Âge au diagnostic de BSS
2	55	43
3	41	29
4	21	18
5	46	34
6	83	71
7	51	39
8	67	55
14	20	20
16	54	42
17	50	38
19	27	27
20	52	52
Moyenne	47	39

Tableau 5 : tableau représentant l'âge actuel et l'âge au diagnostic des hétérozygotes (en années).

Une seule patiente (hétérozygote 4) a été génotypée à Marseille (CRPP) en 2015 à l'âge de 18 ans. Le début des symptômes se situe vers l'âge de 10 ans avec des gingivorragies et une thrombopénie de découverte fortuite (88 G/L). La persistance de la thrombopénie a incité à adresser la patiente à un médecin spécialiste. L'anamnèse orientait vers une thrombopénie familiale (règles abondantes chez sa mère, la notion d'hématomes faciles et de règles abondantes chez sa sœur aînée, âgée de 25 ans, son père aurait par ailleurs présenté une pathologie plaquettaire dans l'enfance, sans plus de précision). Le bilan de cytométrie réalisé, ainsi que la présence de macroplaquettes au frottis, ont permis d'évoquer le SBS. Cependant, le diagnostic de certitude n'a été posé qu'en 2015 grâce au résultat génétique. Les parents n'ont pas été testés.

Deux autres patients hétérozygotes ont rapporté des symptômes hémorragiques antérieurs au diagnostic d'hétérozygotie : le patient « hétérozygote 2 » (père de l'homozygote 2) a été étiqueté PTI à l'âge de 42 ans (taux plaquettes : 101 G/L) devant une thrombopénie chronique, initialement de découverte fortuite. Les symptômes à type de gingivorragies sont rapportés depuis l'enfance sans avoir suscité de consultation particulière. Aucun traitement n'a été administré. Le diagnostic de SBS hétérozygote a été porté à l'âge de 43 ans, lors du diagnostic d'homozygotie de son enfant.

Il en est de même pour le patient hétérozygote 3 (mère de l'homozygote 3) : les symptômes ont débuté à l'âge de 6 ans à type d'épistaxis et de gingivorragies avec une nette diminution des symptômes à l'adolescence. Elle n'a jamais consulté pour cela et a par ailleurs un compte plaquettaire normal (178 G/L). Le diagnostic d'hétérozygotie a été porté à l'âge de 29 ans (lors du diagnostic de sa fille de 8 mois).

L'errance diagnostique (calculée à 22 ans) est à pondérer compte-tenu du fait que la plupart des patients sont peu symptomatiques.

### 3.1.3 Consanguinité

Une consanguinité a été retrouvée chez 5 patients sur 13. Les patients 5 et 6 sont sœurs et leurs parents sont cousins germains. La patiente 4 est issue de l'inceste du grand père sur la mère. Les arbres généalogiques ont par ailleurs trouvé une consanguinité remontant à 7 générations pour la patiente 3 et à 4 générations pour le patient 12.

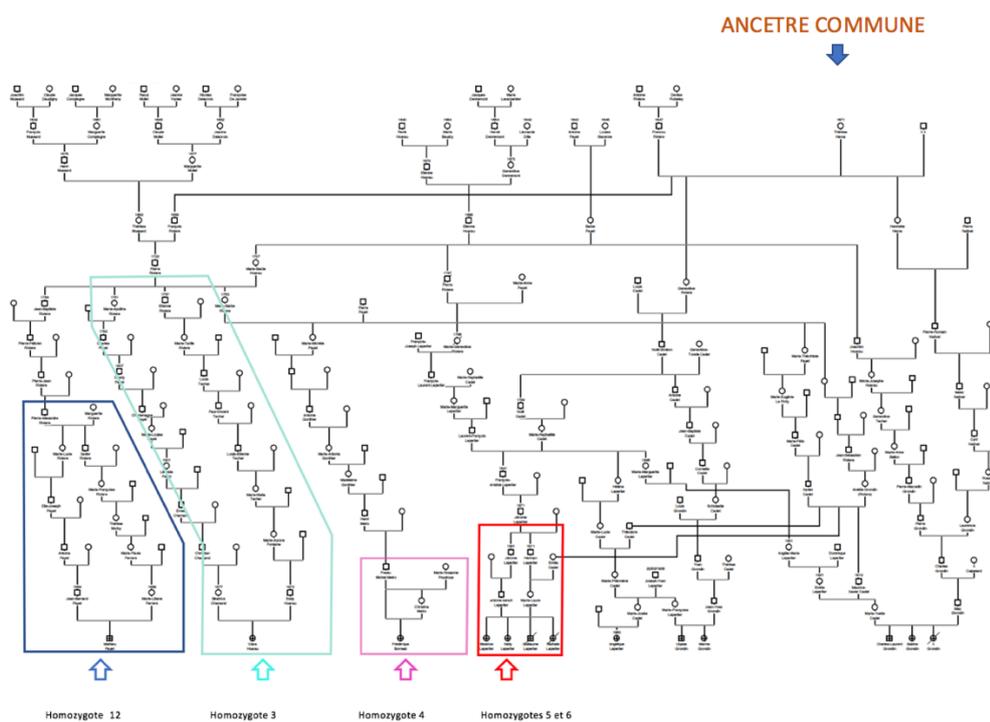


Figure 27 : Arbre généalogique montrant la consanguinité retrouvée chez 4 familles.

## 3.2 Caractéristiques du syndrome hémorragique

### 3.2.1 Population de patients homozygotes

Le score hémorragique pour la population homozygote allait de 5 (patient 3) à 22 (patient 1). (Tableau 6)

Les saignements étaient significatifs chez 92% des patients (score >5), et 62% des patients avaient un score supérieur à 10 (le score normal étant compris entre 0-3 chez les hommes adultes, 0-5 chez les femmes adultes et 0-2 chez les enfants).<sup>(55)</sup>

Le score moyen chez les hommes homozygotes (score à 13) était plus élevé que chez les femmes (score à 10,5).

Homozygote	CUTANE	BLESSURES MINEURES	NEZ	GENGIVES	EXTRACTION DENTAIRE	DIGESTIF	HEMATURIE	HEMATOME MUSCULAIRE	SNC	AUTRE	POST CHIRURGICAL	MENORRAGIE	HEMORRAGIE du POST- PARTUM	ISTH total
1	3	1	4	1	4	0	1	4	0	0	4	NA	NA	22
2	0	0	4	4	0	0	0	0	0	0		NA	NA	8
3	1	1	0	3	0	0	0	0	0	0		NR	N	5
4	1	2	3	2	0	0	0	0	0	4*		4	NP	16
5	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	4	4	3	14
6	1	2	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	NP	6
7	1	0	3	3	2	0	0	0	0	0		NR	NP	9
8	1	0	1	1	4	0	0	0	0	4**	4	4	0	15
9	1	1	4	4	4	0	0	0	0	0		NA	NA	14
10	1	0	0	4	0	0	0	0	4	0		NR	N	9
11	1	1	3	1	0	2	2	0	0	0	0	NA	NA	10
12	1	3	4	4	0	0	0	1	0	0		NA	NA	13
13	1	0	4	0	0	2	0	0	0	0	3	1	UNKNOWN	11

Tableau 6 : Scores hémorragiques détaillés des patients homozygotes

N : nullipare

FCR : fausse couche à répétition

NR : non réglée

NA : non applicable car homme

NP : non parturiente

Patient 4 : (\*) : 3 épisodes de ruptures hémorragiques du corps jaune avec hémopéritoine massif

Patient 8 : (\*\*): hémopéritoine massif sur hémorragie folliculaire

Les saignements les plus fréquents étaient par ordre de fréquence :

-Pour les saignements spontanés : les **gingivorragies** (92%), les **épistaxis** (85%), les **ecchymoses cutanées** (85%) et les **saignements prolongés pour des plaies mineures** (61%), et les **ménorragies** (100% des femmes)

-Pour les saignements provoqués : les **saignements après extractions dentaires** (100% des patients ont rapporté des saignements importants), et les **saignements post-chirurgicaux** (67%).

Les saignements les plus graves (score ISTH à 4) étaient plus fréquents lors des **épistaxis** avec 5 patients sur 13 ayant été transfusés, ainsi que les **gingivorragies** (4/13). Pour les extractions dentaires : 80% des patients ayant subi des extractions dentaires avaient nécessité une transfusion pré- et post-opératoire.

Un seul patient a présenté un **saignement spontané intra-cérébral**. Il s'agissait de la patiente 10 qui a présenté, à l'âge de 9 mois, une hémorragie du lobe occipital, méningée, sous arachnoïdienne, ainsi qu'une hémorragie vitréenne diffuse bilatérale.

L'hématome a été évacué avec une hémostase correcte. Les séquelles actuelles sont la cécité (hémorragie vitréenne bilatérale). Elle présente par ailleurs des gingivorragies importantes.

Concernant la population féminine, les **saignements gynécologiques** étaient fréquemment rapportés et constituaient souvent le mode de découverte de la pathologie (ménarche hémorragique nécessitant une transfusion chez les patientes 5,4 et 8 et des méno-métrorragies chroniques chez les patientes 4, 8 et 13)

Sur un total de 5 femmes ménarches, les ménorragies étaient présentes dans 100% des cas, avec 60% d'entre elles qui nécessitaient un traitement hormonal combiné et des antifibrinolytiques. Par ailleurs, 40% nécessitaient un traitement hormonal substitutif en continu afin d'instaurer une aménorrhée thérapeutique.

Deux patientes avaient présenté un saignement « autre » de type de rupture de corps jaune :

**Patiente 4** : ménarche hémorragique, avec des méno-métrorragies chroniques sous traitement hormonal en continu, a eu un curetage évacuateur en 2002 pour hématométrie spontanée ; 3 épisodes de ruptures hémorragiques du corps jaune avec hémopéritoine massif (prise en charge en réanimation pour choc hémorragique) survenant dans un contexte d'arrêt de pilule pour un désir de grossesse ; 2 FCS, nécessitant des hospitalisations et une GEU droite (hydrosalpinx, salpingotomie).

**Patiente 8** : ménarche hémorragique, sous LUTENYL en continu. A présenté un hémopéritoine massif sur hémorragie folliculaire ayant nécessité une annexectomie gauche d'emblée. La patiente avait arrêté son traitement oestroprogestatif en raison d'un désir de grossesse.

### 3.2.2 Population de patients hétérozygotes

Les scores hémorragiques allaient de 0 à 8 (le score normal étant entre 0-3 chez les hommes adultes, 0-5 chez les femmes adultes et 0-2 chez les garçons et les filles).<sup>(55)</sup>

Seule une femme avait un score total > 5 et un homme un score > 3. Le score moyen chez les hommes hétérozygotes (score à 1,4) était plus bas que chez les femmes (score à 3,1), ceci pouvant s'expliquer par les cycles menstruels chez la femme.

Les saignements spontanés les plus fréquents dans la population hétérozygote étaient les **saignements gingivaux** (50%), les **saignements prolongés pour des plaies mineures** (42%) et les **épistaxis** (33%).

Les saignements provoqués les plus fréquents sont survenus **après des extractions dentaires** (25 % des patients ont bénéficié d'extractions dentaires avec un saignement rapporté dans plus de 25% des procédures.)

Concernant les femmes, 57 % d'entre-elles présentaient des **ménorragies**.

Les patients hétérozygotes ne présentaient aucun autre type de saignement.

Hétérozygote	CUTANÉ	BLESSURES MINEURES	NEZ	GENCIVES	EXTRACTION DENTAIRES	DIGESTIF	HEMATURIE	HEMATOME MUSCULAIRE	SNC	AUTRE	POST CHIRURGICAL	MÉNORRAGIE	HEMORRAGIE du POST-PARTUM	ISTH total
2	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	NA	NA	1
3	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
4	0	1	2	1	2	0	0	0	0	0	0	2	NP	8
5	0	0	0	1	2	0	0	0	0	0	0	NA	NA	3
6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	NA	NA	0
7	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	4
8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	NP	0
16	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	NA	1
17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
19	1	1	1	1	2	0	0	0	0	0	0	1	NP	7
20	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	NA	2

Tableau 7 : Scores hémorragiques détaillés des patients hétérozygotes

NA : non applicable car homme

NP : nullipare

### 3.2.3 Comparaison des scores hémorragiques en fonction du statut allélique

La population témoin a été constituée de façon suivante : chaque patient de l'étude a été apparié à un témoin selon l'âge et sexe, dont le score moyen de saignement est rapporté dans l'article de M. Elbatarny ( 2014, *Haemophilia*), établissant les scores normaux des saignements des enfants et adultes selon l' ISTH (société internationale de thrombose et d'hémostase ).<sup>(55)</sup> Les 3 populations avaient des scores ISTH significativement différents (ANOVA p=0,000).

Il existait une différence significative entre :

-la moyenne des scores ISTH de la population hétérozygote et la population témoin ( $p= 0,03$ ).

- la moyenne des scores ISTH de la population homozygote et la population témoin ( $p= 0,00$ ).

- la moyenne des scores ISTH de la population homozygote et la population hétérozygote

( $p= 0,00$ ).

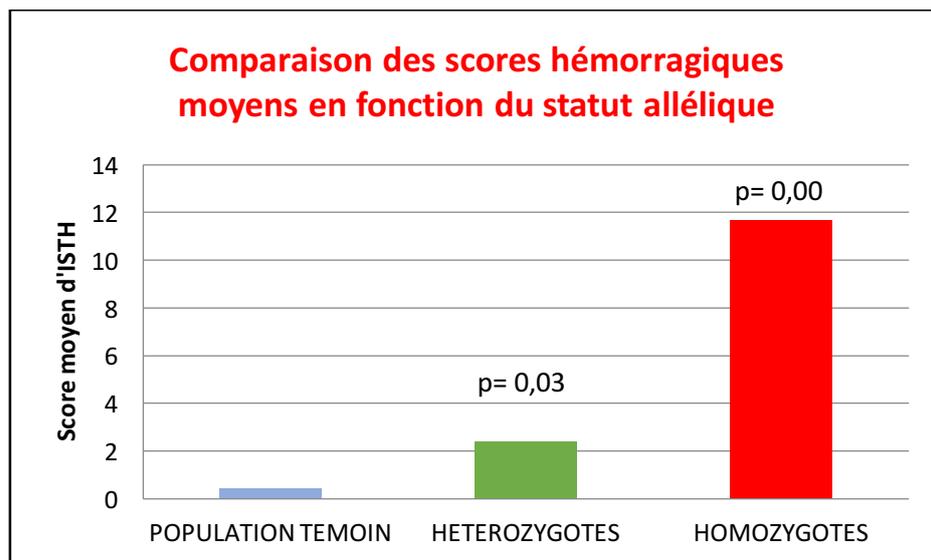


Figure 28 : Comparaison des scores hémorragiques moyens en fonction du statut allélique

### 3.2.4 Prise en charge thérapeutique

Aucun traitement n'a été dispensé aux patients hétérozygotes.

Seules les précautions standards étaient mises en place en cas de chirurgie prévue (groupe, RAI, plaquettes mises à disposition en cas de nécessité de transfusion).

-les symptômes hémorragiques étaient traités par de l'acide tranexamique en si besoin selon les cas (gingivorragies et épistaxis), avec un méchage hémostatique (COALGAN® Alginate de calcium) pour les épistaxis non taris ou sous forme de compresse imbibée.

-Une supplémentation martiale était mise en place si besoin ou de manière chronique selon les cas.

-Une hémostase chirurgicale a été effectuée chez la patiente 4 (électrocoagulation des kystes hémorragiques du corps jaune) et le patient 11 (hémostase intranasale par électrocoagulation).

-Le Novoseven® (facteur VII recombinant) a été utilisé chez la patiente 10 lors d'un traumatisme crânien et de saignements gingivaux.

-Un traitement oestroprogestatif au long cours était pratiqué chez 38% des femmes (3 patientes sur 8).

Parmi les 13 patients homozygotes, 8 patients ont été transfusés en plaquettes, ou culots globulaires.

La recherche d'ac anti plaquette n'a été effectuée que chez 3 d'entre eux et n'était positive que chez un seul patient.

### 3.3 Données biologiques

#### 3.3.1 Numération plaquettaire et VMP de la population homozygote

Tous les patients avaient une macro-thrombopénie modérée (> 30 G/L) avec une numération plaquettaire moyenne de 58,2 G/L +/- 26,7 et un VMP moyen à 15 (valeurs de référence : 8,0 - 13,0 fL). Seulement 30% des VMP ont pu être rendus en raison d'une forte anisoplaquettose.

Homozygote	Taux plaquettes normes labo 150 – 400 G/L	VMP normes labo 8,0 - 13,0 fl.	Méthode de comptage
Hoz 1	45	Non rendu	Cellule
Hoz 2	43	17	Optique
Hoz 3	77	Non rendu	Optique
Hoz 4	30	20	Optique
Hoz 5	42	9,5	Optique
Hoz 6	35	Non rendu	Optique
Hoz 7	112	Non rendu	Optique
Hoz 8	32	Non rendu	Optique
Hoz 9	95	Non rendu	Optique
Hoz 10	61	Non rendu	Optique
Hoz 11	36	Non rendu	Optique
Hoz 12	64	15	Optique
Hoz 13	85	Non rendu	Cellule
Moyenne	58	15	

Tableau 8 : Numération plaquettaire et VMP de la population homozygote mesurée sur l'automate XE-5000

#### 3.3.2 Numération plaquettaire et VMP de la population hétérozygote

La moyenne du taux des plaquettes était de 149 G/L +/- 46,4. Le compte plaquettaire était

normal chez 5 patients sur 12. Un seul patient présentait une thrombopénie >100 G/L. Le compte plaquettaire retenu était celui du laboratoire, effectué sur le XE-5000 lors de de l'analyse conjointe de la cytométrie.

Le volume moyen plaquettaire était de 12,7 fL, cependant les VMP ont pour la plupart été non rendus en raison de l'anisoplaquettose.

Les patients hétérozygotes présentaient quelques macroplaquettes au frottis.

Hétérozygotes	Taux plaquettes normes labo 150 – 400 G/L	VMP normes labo 8,0 - 13,0 fl.	Méthode de comptage
Htz 2	101	13	Optique
Htz 3	178	12,6	Optique
Htz 4	99	14,4	Optique
Htz 5	118	Non rendu	Optique
Htz 6	106	Non rendu	Optique
Htz 7	205	13	Optique
Htz 8	206	12	Optique
Htz 14	227	12,1	Optique
Htz 16	136	Non rendu	Optique
Htz 17	106	Non rendu	Optique
Htz 19	173	12,3	Optique
Htz 20	135	Non rendu	Optique
Moyenne	149	12,7	

Tableau 9 : Numération plaquettaire et VMP de la population hétérozygote mesurée sur l'automate XE-500

### 3.3.3 Etude de l'expression des glycoprotéines plaquettaires par cytométrie en flux

Un témoin sain était passé à chaque analyse de cytométrie et constituait donc notre population saine de référence. Il y a donc le même nombre de patients que de témoins ;

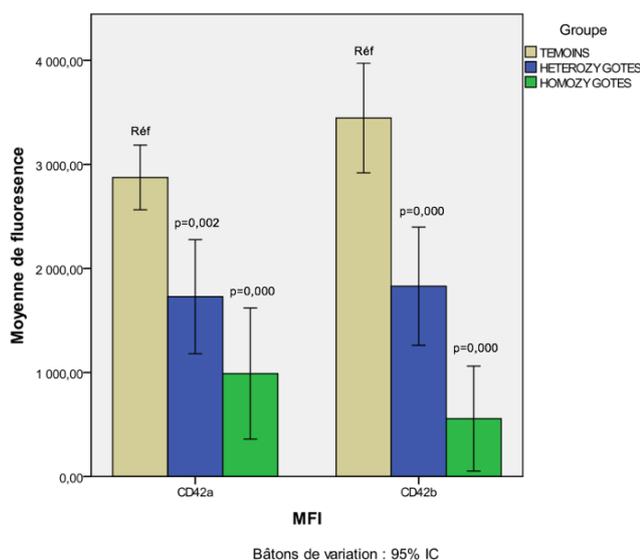


Figure 29 : comparaison des intensités moyennes des fluorescence des différents groupes pour le CD42 a et b (GPIb-XI-V)

La diminution de l'expression de surface de la glycoprotéine GPIIb-XI-V était statistiquement significative dans la population des homozygotes par rapport aux témoins.

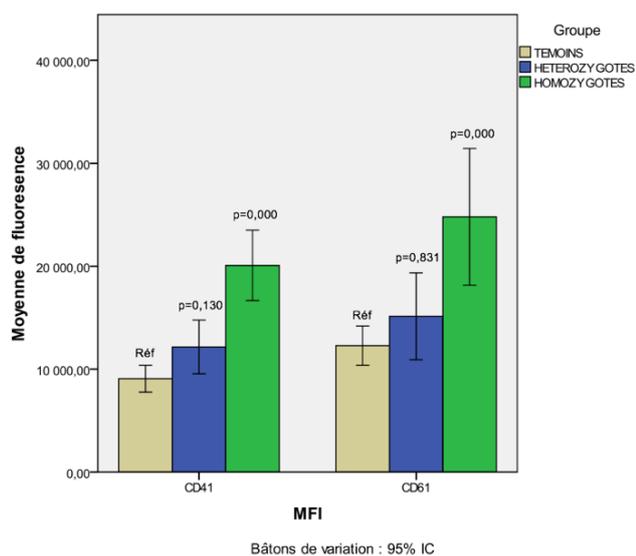


Figure 30 : comparaison des intensités moyennes des fluorescences des différents groupes pour le CD41 et 61 (GPIIb-IIIa).

Il existe une différence statistiquement significative concernant l'expression de surface des CD41 et CD61 (GPIIb-IIIa) entre la population des homozygotes et les témoins. Les plaquettes des patients homozygotes étaient de taille bien plus importante que celles des témoins, ceci pourrait expliquer la surexpression retrouvée.

La diminution de l'expression de surface de la glycoprotéine GpIb-XI-V était également statistiquement significative dans la population des hétérozygotes par rapport aux témoins, mais moindre par rapport aux homozygotes.

Dans ce groupe, on notait également une différence concernant l'expression de surface de la GPIIb-IIIa, qui pourrait être expliquée par la taille augmentée des plaquettes, mais cette différence n'était pas significative.

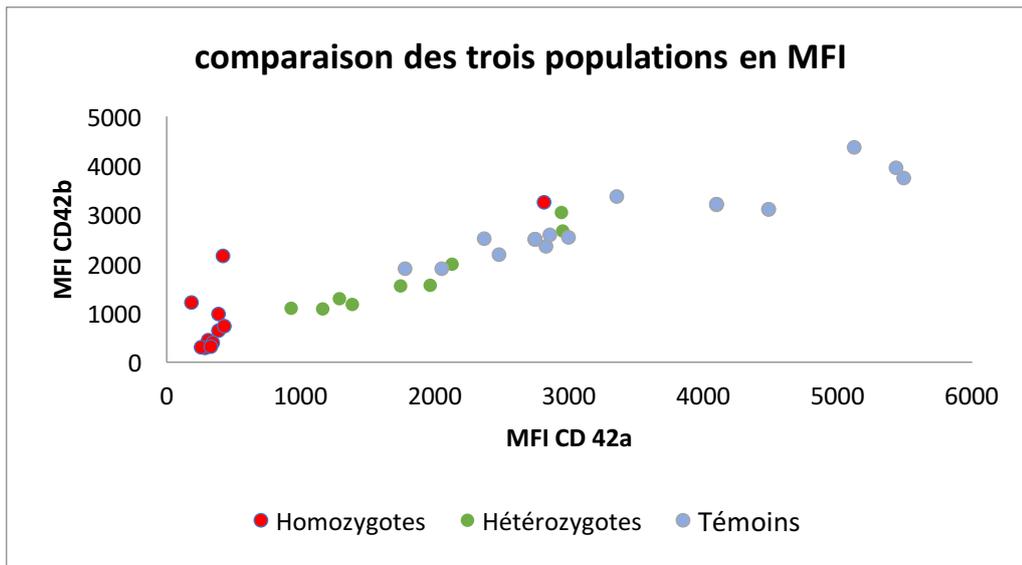


Figure 31 : Nuage de points représentatifs des trois populations selon les MFI exprimés avec le CD42 a et b

Il existait une zone grise pour la distinction entre hétérozygotes et témoins ne permettant pas de distinguer réellement un défaut d'expression de la GPIb-IX-V.

## 4 DISCUSSION

La population réunionnaise était estimée à 850700 habitants en 2015 par l'INSEE. Du fait d'un fort taux de natalité elle est probablement légèrement supérieure aujourd'hui. En se basant uniquement sur les cas de notre série cela permettrait de faire l'hypothèse d'une prévalence d'environ 13 cas homozygotes pour 1 000 000, ce qui est très supérieur à la prévalence habituellement rapportée de < 1 cas pour 1 000 000.

Outre la prévalence, la forte concentration des lieux de naissance des patients aux abords immédiats de notre centre (98 % des patients étaient nés dans la commune de Saint-Pierre ou les communes limitrophes), peut faire suspecter un biais de recrutement et pourrait évoquer une incidence réelle encore supérieure, du fait d'un sous-diagnostic dans les communes plus éloignées.

Cependant les données croisées avec les listes des patients du CHU de Bellepierre (au nord de l'île) qui disposent eux aussi de l'analyse des glycoprotéines de surface plaquettaire, a montré qu'il n'y avait pas de cas de Bernard-Soulier diagnostiqués dans ce centre. On peut émettre

l'hypothèse que les familles issues de l'ancêtre commune se seraient installées préférentiellement dans le sud de l'île.

L'histoire clinique et le parcours de prise en charge des patients de l'étude illustrent la problématique du diagnostic et de la prise en charge des patients Bernard-Soulier homozygotes et a fortiori hétérozygotes dans la population réunionnaise. Il s'agissait de déterminer les critères phénotypiques et biologiques de ces patients afin d'améliorer la prise en charge diagnostique de cette pathologie. En effet le but de ce travail était également de sensibiliser les cliniciens au diagnostic de SBS à la Réunion.

Les résultats de ce travail confirment le retard diagnostique de cette pathologie puisque l'errance diagnostique a été estimée en moyenne à 17 années sur l'ensemble de la cohorte et respectivement de 12 ans chez les homozygotes et 22 ans chez les hétérozygotes. D'autre part, près de 40% des patients homozygotes ont initialement été diagnostiqués à tort comme ayant un PTI et ont reçu des traitements médicaux inappropriés, voire délétères. En effet, 60 % de ces patients avaient reçu des corticoïdes au long cours avec les complications qui peuvent découler de ce type de traitement, ou le recours à la splénectomie chez deux patients.

Les données de la littérature rapportent des diagnostics erronés similaires. Par exemple dans l'étude de Savoia et al. de 2011, sur 13 patients étudiées, 4 ont eu un diagnostic erroné de thrombocytopénie auto-immune (soit environ 30%), traités avec des immunoglobulines, stéroïdes et / ou splénectomisés.<sup>(45)</sup>

Concernant les patients hétérozygotes, il est important de noter qu'ils sont généralement asymptomatiques, ce qui ne facilite pas le diagnostic. La macro-thrombopénie est souvent découverte fortuitement lors d'un examen de routine, ou dans le cadre d'une enquête familiale.<sup>(49)</sup>

L'âge moyen au diagnostic était de 39 ans chez les hétérozygotes et 16 ans chez les homozygotes. Cette différence peut s'expliquer par le fait que les patients homozygotes avaient une diathèse hémorragique (score moyen à 12) plus importante que les patients hétérozygotes (score moyen à 3), ce qui les amène à consulter plus facilement.

Concernant le phénotype hémorragique mis en évidence dans cette étude, celui-ci était similaire à celui de la littérature, avec de façon non surprenante, une prédominance des saignements cutanéomuqueux.

Les saignements les plus fréquents et graves chez les homozygotes étaient : les épistaxis, les saignements provoqués par des gestes invasifs, et les ménorragies.

Les saignements les plus fréquents chez les hétérozygotes concernaient également les organes cutanéomuqueux et n'étaient jamais graves.

Nos résultats montrent également qu'il existe une certaine hétérogénéité dans la sévérité du syndrome hémorragique. Dans notre étude, certains patients homozygotes ont un score hémorragique beaucoup plus important que d'autres (5 à 24). Nous pouvons rapporter notamment la gravité d'événements hémorragiques à type d'hémopéritoine avec choc hémorragique sur grossesse extra-utérine et corps jaune hémorragique que les patientes homozygotes 4 et 8 ont présentés, ainsi que l'hémorragie spontanée du lobe occipital, méningé, sous arachnoïdienne et vitréenne diffuse bilatérale à l'âge de 9 mois de la patiente 10 (aucune malformation artérioveineuse n'avait été retrouvée à la relecture de l'IRM envoyée à l'hôpital Bicêtre).

Un biais de recueil peut être aussi suspecté concernant les saignements post-chirurgicaux des homozygotes. En effet, parmi les 46 % des patients qui ont eu une chirurgie, seuls 15% avaient nécessité une hémostase chirurgicale ou des antifibrinolytiques, et 15% avaient nécessité un support transfusionnel ou de la desmopressine. Dans cette étude, malheureusement, il existe un grand nombre de données manquantes (53%), pouvant être expliqué par un manque d'informations colligées. En effet, nous aurions pu suspecter beaucoup plus de saignements post-chirurgicaux dans cette pathologie.

Près de la moitié des patients hétérozygotes inclus avaient un score hémorragique entre 0 et 1, correspondant à des saignements bénins et ne nécessitant pas d'intervention médicale, alors que d'autres ont des scores plus élevés (allant jusqu'à 8). Des résultats similaires sont retrouvés dans l'étude de Savoia et al. de 2011 sur la recherche de corrélation génotype-phénotype, dont l'étude de 7 hétérozygotes montre qu'ils sont plutôt asymptomatiques.<sup>(45)</sup> Tandis que l'étude de Bragadottir et al. parue en 2015 dans l'*American journal of Haematology* rapporte des saignements statistiquement significatifs dans la population hétérozygotes.<sup>(28)</sup> Cela dénote une certaine hétérogénéité clinique chez les hétérozygotes.

Enfin, le sexe ratio de la population étudiée était en faveur des femmes (sex-ratio = 0,7 soit 15 femmes pour 10 hommes) ce qui peut paraître étonnant dans le cadre d'une pathologie autosomique récessive. Le biais possible serait un sur-diagnostic chez ces patientes lié à leur symptomatologie hémorragique gynécologique.

Cependant, il est étonnant de constater que les scores hémorragiques moyens étaient plus importants chez les hommes (13) que chez les femmes (10,5) dans la population homozygote. En revanche, le contraire a pu être observé dans la population hétérozygote et pourrait s'expliquer par le fait que les femmes sont les seules à présenter des complications spécifiques supplémentaires à type d'hémorragie génitale et du post-partum.

Sur le plan biologique, les patients homozygotes avaient une macro-thrombopénie modérée (58,2+/-26,7 G/L) contrastant avec l'importance du syndrome hémorragique.

Les patients hétérozygotes avaient une thrombopénie généralement mineure (149 +/- 46,4 G/L), avec une anisocytose marquée et quelques macroplaquettes au frottis.

L'agrégométrie plaquettaire - lorsqu'elle met en évidence une absence ou une forte diminution de l'agrégation à la ristocétine - permet de dépister le SBS, mais sa réalisation pose aussi des problèmes techniques et d'interprétation, notamment lorsque les patients sont thrombopéniques. L'agrégométrie n'a pas pu être réalisée en raison d'une trop forte thrombopénie chez les patients homozygotes.

Selon les résultats de la cytométrie, les patients homozygotes ont une expression de surface de la glycoprotéine GPIb-XI-V effondrée de manière statistiquement significative et une expression très augmentée de la GPIIb-IIIa.

Les patients hétérozygotes avaient également une diminution de l'expression de surface de la GpIb-XI-V statistiquement significative par rapport aux témoins, mais moindre que les patients homozygotes. Il serait intéressant dans un travail prospectif plus large d'évaluer un seuil de dépistage, basé sur les MFI ou le pourcentage d'expression par rapport aux témoins, permettant de distinguer les différentes formes de la maladie.

Il apparaît que la cytométrie de flux dans le cadre de cette spécificité réunionnaise serait à mettre en place de façon plus large afin de mieux dépister cette pathologie. Cette technique offre la possibilité d'explorer les plaquettes de façon relativement simple et rapide. Cette méthode est

réalisable en sang total à partir d'un faible volume de sang, même en cas de thrombopénie. Ce qui permet de s'affranchir de la réalisation de l'agrégométrie.

À notre connaissance, la plus importante série présentant les caractéristiques cliniques et biologiques de patients atteints de SBS rapportée à ce jour est celle présentée par Savoia A et al en 2011, avec 13 patients inclus<sup>(45)</sup>. Il s'agissait de patients originaires d'Italie (10 patients) et d'Inde (3 patients) avec un total de 10 familles distinctes étudiées. Cela positionnerait notre série comme la plus importante issue d'un groupe de population homogène, présentant la même mutation, fondatrice.

Une mutation similaire affectant la région conservée ASN 64 de la GpIb $\beta$  a été décrite chez un patient de 16 ans d'origine algérienne résidant en France, dans l'étude de Strassel et al. de 2002.<sup>(50)</sup> Il s'agissait d'une substitution de l'Asn par une thréonine en position 64 sur la protéine mature. Ce changement survenant sur un résidu très conservé de la région riche en leucine terminale, modifie la conformation des ponts disulfures de la partie extracellulaire de la GPIb $\beta$  sur la protéine mature, affectant la maturation et l'adressage du complexe à la surface plaquettaire. Le phénotype de saignement était très sévère et nécessitait des transfusions itératives.

De notre travail il ressort également que les traitements utilisés dans la prise en charge du SBS se résumaient à l'utilisation d'agents antifibrinolytiques en cas de saignement actif (gingivaux, épistaxis ou ménorragie), ou en préventif (pré ou post-opératoire) et de transfusions plaquettaires. Le Novoseven<sup>®</sup> a pu être utilisé hors AMM selon les protocoles en cas d'hémorragie per-opératoire lorsqu'il y avait échec des transfusions plaquettaires.

Il est intéressant de noter également l'utilisation du Nplate<sup>®</sup> (ROMIPLOSTIM, agoniste du récepteur de la thrombopoïétine) hors AMM, comme alternative thérapeutique chez le patient 10, avec une amélioration de sa symptomatologie hémorragique. Cette décision a été prise devant l'inefficacité de l'acide tranexamique sur la symptomatologie hémorragique à type de gingivorragies quotidiennes déclenchées par la prise alimentaire, d'ecchymoses multiples et de rectorragies modérées une à deux fois par jour (deux coloscopies ont été réalisées chez ce patient et n'avaient pas mis en évidence de lésions spécifiques).

En France, ce traitement est indiqué dans le purpura thrombopénique idiopathique (PTI) chronique de l'adulte en échec aux traitements de première ligne (corticoïdes, immunoglobulines)

chez les patients réfractaires à la splénectomie et chez les patients non splénectomisés mais auxquels la splénectomie ne peut être proposée .<sup>(57)</sup>

Le patient a été informé des effets indésirables de ce traitement, du fait que celui-ci était proposé hors AMM et n'avait jamais été utilisé dans cette indication, son consentement a été recueilli. La posologie initiale était de 1 µg/kg/semaine puis majoré de 1 µg/kg toutes les 2 semaines jusqu'à ce qu'une efficacité clinique soit constatée. Deux mois plus tard, à une posologie de 5 µg/kg/semaine, le taux de plaquettes du patient, initialement à 30 G/l, était en hausse et variait entre 50 et 110 G/l. L'expression du complexe GPIIb-V-IX à la surface des plaquettes était toujours absente. On observait toutefois une bonne réponse clinique avec disparition complète des gingivorragies, des épistaxis et des ecchymoses, une diminution de la fréquence des rectorragies, et correction de la carence martiale. Après 4 mois de traitement par ROMIPLOSTIM la tolérance demeurait bonne et le patient souhaitait poursuivre cette thérapeutique.

Les résultats de ce travail de thèse nous a permis d'élaborer un algorithme décisionnel permettant de suspecter cette pathologie, incluant des critères cliniques et biologiques mis en évidence dans la population d'étude, représentés dans la figure 32 et dans le tableau 10.

Patients homozygotes	Patients hétérozygotes
<ul style="list-style-type: none"> <li>-patient originaire de Saint-Pierre</li> <li>-diathèse hémorragique cutanéomuqueuse importante (score hémorragique ISTH élevé)</li> <li>-antécédents personnels et familiaux de thrombopénie</li> <li>- Macro-thrombopénie modérée</li> <li>- Présence excessive de plaquettes géantes au frottis</li> <li>-Cytométrie en flux : expression effondrée pour la GPIIb-IX-V et très augmentée pour la GPIIb-IIIa</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-patient originaire de Saint-Pierre</li> <li>-symptomatologie hémorragique cutanéomuqueuse frustrée (score hémorragique ISTH faible)</li> <li>-antécédents personnels et familiaux de thrombopénie</li> <li>- Macro-thrombopénie mineure</li> <li>- Présence excessive de macroplaquettes au frottis</li> <li>-Cytométrie en flux : expression diminuée pour la GPIIb-IX-V et partiellement augmentée pour la GPIIb-IIIa</li> </ul>

Tableau 10 : Critères d'orientation diagnostique permettant de suspecter une hétérozygotie ou une homozygotie pour la maladie.

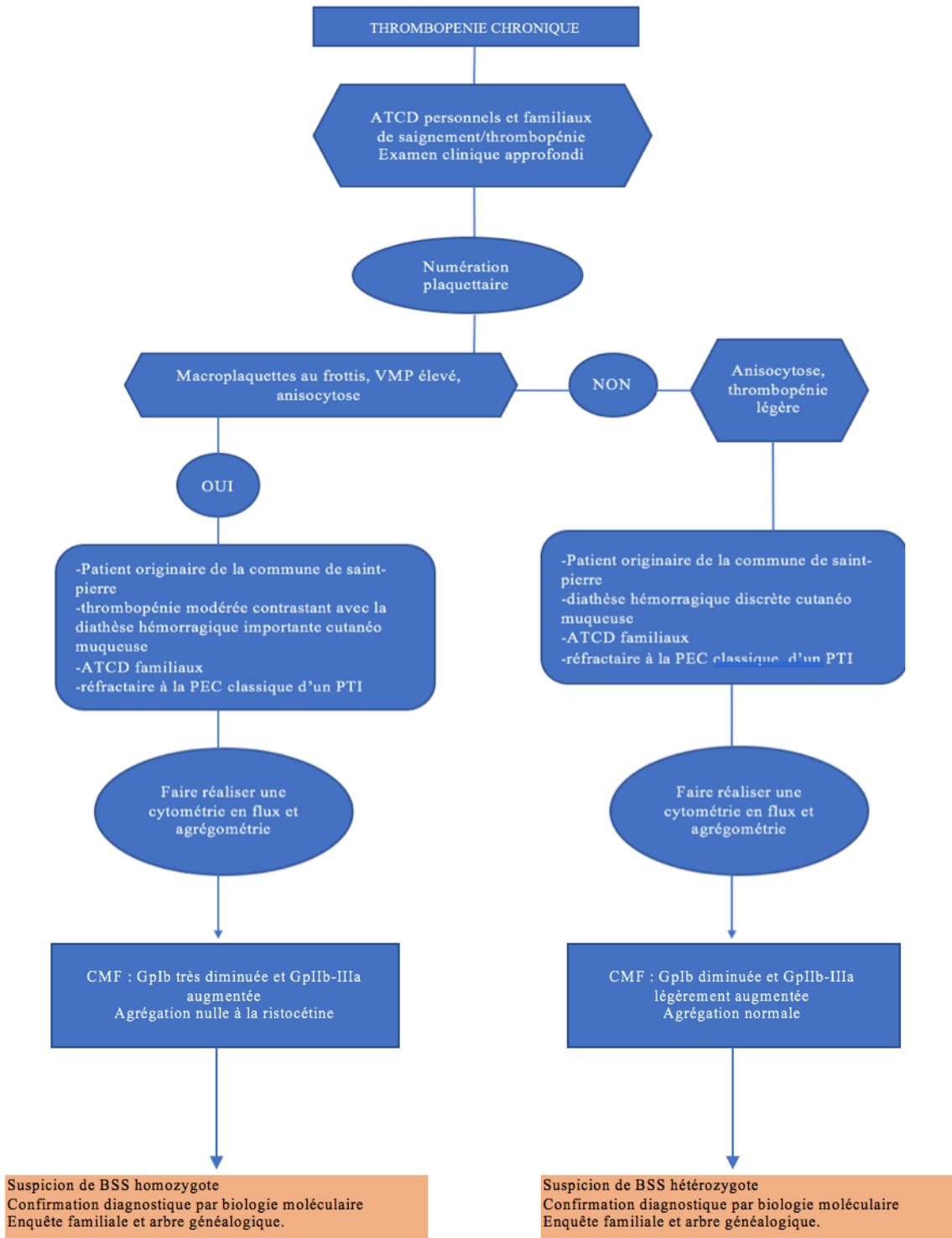


Figure 32 : Algorithme décisionnel devant une thrombopénie chronique chez un patient réunionnais.

En ce qui concerne les perspectives qui découlent de ce travail, il pourrait être intéressant d'envisager une étude plus large, prospective, multi-site (Nord, Ouest, Sud), incluant des patients réunionnais présentant une macro-thrombopénie chronique, avec des antécédents familiaux de

thrombopénie, réfractaire au traitement classique du PTI, pour lesquels un screening génétique mutationnel pour le gène *GPIBB* serait réalisé de manière systématique.

Une telle étude permettrait aussi possiblement de documenter au mieux le phénotype de saignement des homozygotes et des hétérozygotes, améliorer la prise en charge des homozygotes, et ainsi éviter les traitements délétères. Pour les hétérozygotes, de proposer un conseil génétique avec dépistage du conjoint pour la mutation, et une enquête familiale.

## 5 CONCLUSION

Les résultats de cette étude illustrent bien la difficulté diagnostique de cette pathologie et soulignent l'importance de préciser les caractéristiques clinico-biologiques qui permettraient d'améliorer le dépistage du syndrome de Bernard-Soulier dans la population réunionnaise.

Il en ressort que ce syndrome doit toujours être suspecté chez les individus présentant une thrombopénie avec de grandes plaquettes en particulier s'ils viennent de la région de Saint-Pierre, et si la thrombopénie contraste avec le phénotype hémorragique.

Enfin, il s'agit de savoir remettre en cause le diagnostic de PTI s'il est posé, en cas de thrombopénie prolongée, d'antécédents familiaux, de mauvaise réponse aux traitements, et d'évoquer l'hypothèse d'une thrombopénie constitutionnelle. Le risque hémorragique n'est pas à corréler au nombre de plaquettes, et le phénotype hémorragique, même s'il intéresse essentiellement les muqueuses, ne présage pas du risque de saignements chirurgicaux et post-chirurgicaux. Des études prospectives supplémentaires seraient nécessaires pour caractériser au mieux cette population afin d'améliorer la prise en charge globale des patients. Cela demande un travail collégial des spécialistes médicaux, cliniciens, biologistes et généticiens.

## BIBLIOGRAPHIE

1. La Réunion. In: Wikipédia [Internet]. 2018 [cité 16 juill 2018]. Disponible sur: [https://fr.wikipedia.org/w/index.php?title=La\\_R%C3%A9union&oldid=150298996](https://fr.wikipedia.org/w/index.php?title=La_R%C3%A9union&oldid=150298996)
2. Combeau Y. De Bourbon à La Réunion, l'histoire d'une île (du XVIIe au XXe siècle). Hermès. 2002;(32-33):91.
3. 850 700 habitants au 1er janvier 2015 - Insee Flash Réunion - 116 [Internet]. [cité 16 juill 2018]. Disponible sur: <https://www.insee.fr/fr/statistiques/3290942>
4. Baccini V, Alessi MC. Les thrombopénies constitutionnelles : démarche diagnostique. Rev Médecine Interne. 1 févr 2016;37(2):117-26.
5. Thon JN, Italiano JE. Platelets: production, morphology and ultrastructure. Handb Exp Pharmacol. 2012;(210):3-22.
6. Machlus KR, Thon JN, Italiano JE. Interpreting the developmental dance of the megakaryocyte: a review of the cellular and molecular processes mediating platelet formation. Br J Haematol. avr 2014;165(2):227-36.
7. Léon C, Dupuis A, Gachet C, Lanza F. Apport des modèles murins dans les thrombopénies constitutionnelles. Hématologie. 1 sept 2015;21(5):262-79.
8. Dunois-Lardé C, Baruch D. Production de plaquettes in vitro. Transfus Clin Biol. 1 avr 2011;18(2):158-64.
9. Lebreton L, Tuffigo M, Pillois X, Fiore M. [New perspectives on the role of  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 integrin in defective megakaryopoiesis]. Med Sci MS. mars 2016;32(3):290-6.
10. Jandrot-Perrus M, Nurden P. Des fonctions plaquettaires aux implications thérapeutiques. Rev Médecine Interne. 1 déc 2010;31(Supplement 3):S319-23.
11. BERNARD J. Sur une nouvelle variété de dystrophie thrombocytaire-hémorragique congénitale. Semi Hop Paris. 1948;24:3217-23.
12. de la Salle C, Lanza F, Cazenave JP. Biochemical and molecular basis of Bernard-Soulier syndrome: a review. Nouv Rev Fr Hematol. 1995;37(4):215-22.
13. López JA, Andrews RK, Afshar-Kharghan V, Berndt MC. Bernard-Soulier syndrome. Blood. 15 juin 1998;91(12):4397-418.
14. Howard MA, Hutton RA, Hardisty RM. Hereditary Giant Platelet Syndrome: A

Disorder of a New Aspect of Platelet Function. *BMJ*. 9 juin 1973;2(5866):586-8.

15. Caen JP, Levy-Toledano S. Interaction between Platelets and Von Willebrand Factor provides a New Scheme for Primary Haemostasis. *Nature New Biol*. 1 août 1973;244(135):159-60.
16. Clemetson KJ, McGregor JL, James E, Dechavanne M, Lüscher EF. Characterization of the platelet membrane glycoprotein abnormalities in Bernard-Soulier syndrome and comparison with normal by surface-labeling techniques and high-resolution two-dimensional gel electrophoresis. *J Clin Invest*. août 1982;70(2):304-11.
17. Savoia A, Kunishima S, De Rocco D, Zieger B, Rand ML, Pujol-Moix N, et al. Spectrum of the mutations in Bernard-Soulier syndrome. *Hum Mutat*. sept 2014;35(9):1033-45.
18. Lanza F, Gachet C, David T, Mangin P. Signalisation via le complexe GPIb-V-IX plaquettaire. *Hématologie*. 29 sept 2008;14(4):273-84.
19. Lanza F. Bernard-Soulier syndrome (Hemorrhagiparous thrombocytic dystrophy). *Orphanet J Rare Dis*. 16 nov 2006;1:46.
20. Li R, Emsley J. The Organizing Principle of Platelet Glycoprotein Ib-IX-V Complex. *J Thromb Haemost JTH*. avr 2013;11(4):605.
21. Andrews RK, Berndt MC. Bernard-Soulier syndrome: an update. *Semin Thromb Hemost*. sept 2013;39(6):656-62.
22. Noris P, Perrotta S, Bottega R, Pecci A, Melazzini F, Civaschi E, et al. Clinical and laboratory features of 103 patients from 42 Italian families with inherited thrombocytopenia derived from the monoallelic Ala156Val mutation of GPIb (Bolzano mutation). *Haematologica*. 1 janv 2012;97(1):82-8.
23. Strassel C, Eckly A, Léon C, Petitjean C, Freund M, Cazenave J-P, et al. Intrinsic impaired proplatelet formation and microtubule coil assembly of megakaryocytes in a mouse model of Bernard-Soulier syndrome. *Haematologica*. juin 2009;94(6):800-10.
24. Ware J, Russell S, Ruggeri ZM. Generation and rescue of a murine model of platelet dysfunction: the Bernard-Soulier syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 14 mars 2000;97(6):2803-8.
25. Balduini A, Malara A, Pecci A, Badalucco S, Bozzi V, Pallotta I, et al. Proplatelet formation in heterozygous Bernard-Soulier syndrome type Bolzano. *J Thromb Haemost JTH*. mars 2009;7(3):478-84.
26. Pecci A, Balduini CL. Lessons in platelet production from inherited thrombocytopenias. *Br J Haematol*. avr 2014;165(2):179-92.

27. Kanaji T, Ware J, Okamura T, Newman PJ. GPIIb/IIIa regulates platelet size by controlling the subcellular localization of filamin. *Blood*. 1 janv 2011;blood-2011-08-376566.
28. Bragadottir G, Birgisdottir ER, Gudmundsdottir BR, Hilmarsdottir B, Vidarsson B, Magnusson MK, et al. Clinical phenotype in heterozygote and biallelic Bernard-Soulier syndrome--a case control study. *Am J Hematol*. févr 2015;90(2):149-55.
29. Payraastre B, Alessi M-C, Sie P. Pathophysiology of inherited platelet disorders. *Hématologie*. 2014;1-2;(1):20-35.
30. Tessier-Marteau A, Geneviève F, Godon A, Macchi L, Zandecki M. Anomalies et erreurs de détermination de l'hémogramme avec les automates d'hématologie cellulaire. *Ann Biol Clin (Paris)*. 1 juill 2010;68(4):393-407.
31. SYSMEX XE 5000CM. Présentation et principes. formation mars 2016.
32. François-Xavier DOUCET. Optimisation du diagnostic des thrombopénies constitutionnelles par l'utilisation des paramètres plaquettaires morphométriques. UNIVERSITE DE LORRAINE; 2016.
33. Diz-Küçükkaya R. Inherited platelet disorders including Glanzmann thrombasthenia and Bernard-Soulier syndrome. *ASH Educ Program Book*. 12 juin 2013;2013(1):268-75.
34. V. Latger-Cannard and T. Lecompte,. "Thrombopénies constitutionnelles : intérêt des paramètres plaquettaires et de la morphologie," *Hématologie*, vol. LIV, no. 310, pp. 1-9,. In 2013.
35. Confrontations ABP [Internet]. [cité 8 juill 2018]. Disponible sur: <http://www.hematocell.fr/confrontationsabp/dossiers.php?act=view&id=213>
36. Santos-Martinez M, Prina-Mello A, Medina C, Radomski M. Analysis of platelet function: Role of microfluidics and nanodevices. Vol. 136. 2011. 5120 p.
37. 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*. 10 avr 2013;
38. Chakroun T, Elalamy I. Agrégométrie. [Httpwwwem-Premiumcomdocelecuc-Bordeauxfrdatatraitesbioemb-47632](http://www.em-premium.com/docelecuc-Bordeauxfrdatatraitesbioemb-47632) [Internet]. 16 mai 2007 [cité 20 août 2018]; Disponible sur: <http://www.em.premium.com/article/61444/resultatrecherche/1>
39. LABORATORY APPROACH TO PLATELET DISORDERS - PDF [Internet]. [cité 8 juill 2018]. Disponible sur: <https://docplayer.net/65656602-Laboratory-approach-to-platelet-disorders.html>

40. Elalamy et al. - 2013 - The usefulness of platelet function evaluation in .pdf [Internet]. [cité 22 août 2018]. Disponible sur: [https://www.jle.com/download/abc-298547-lexploration\\_fonctionnelle\\_plaquettaire\\_interets\\_en\\_pratique\\_clinique-biblio73-W32uNn8AAQEAAACcbVc4AAAAAF-u.pdf](https://www.jle.com/download/abc-298547-lexploration_fonctionnelle_plaquettaire_interets_en_pratique_clinique-biblio73-W32uNn8AAQEAAACcbVc4AAAAAF-u.pdf)
41. Docteur Kitller Isabelle. cours sur les Bases de la cytométrie. 2016.
42. La cytométrie en flux dans un laboratoire d'hémostase. Rev Francoph Lab. 1 juin 2007;2007(393):63-71.
43. Cours de cytométrie [Internet]. [cité 22 août 2018]. Disponible sur: <http://cytobase.montp.inserm.fr/Cours/Cours.html>
44. Beltrame MP, Malvezzi M, Zanis J, Pasquini R. Flow cytometry as a tool in the diagnosis of Bernard-Soulier syndrome in Brazilian patients. Platelets. juin 2009;20(4):229-34.
45. Savoia A, Pastore A, De Rocco D, Civaschi E, Di Stazio M, Bottega R, et al. Clinical and genetic aspects of Bernard-Soulier syndrome: searching for genotype/phenotype correlations. Haematologica. 1 mars 2011;96(3):417-23.
46. Diagnosis of inherited platelet function disorders: guidance from the SSC of the ISTH. J Thromb Haemost. 18 nov 2014;13(2):314-22.
47. Seligsohn U. Treatment of inherited platelet disorders. Haemoph Off J World Fed Hemoph. juill 2012;18 Suppl 4:161-5.
48. Godeau B. Purpura thrombopénique immunologique. [Httpwwwem-Premiumcomdocelecu-Bordeauxfrdatatraitessa13-68194](http://www.em-premium.com/docelecu-Bordeauxfrdatatraitessa13-68194) [Internet]. 17 juin 2015 [cité 20 août 2018]; Disponible sur: <http://www.em.premium.com/article/984556/resultatrecherche/23>
49. Kunishima S, Saito H. Congenital macrothrombocytopenias. Blood Rev. 1 mars 2006;20(2):111-21.
50. Strassel C, Pasquet J-M, Alessi M-C, Juhan-Vague I, Chambost H, Combrié R, et al. A novel missense mutation shows that GPIIb/IIIa has a dual role in controlling the processing and stability of the platelet GPIIb/IIIa adhesion receptor. Biochemistry. 22 avr 2003;42(15):4452-62.
51. Lanza F, Baas M-J, Dupuis A, Randrianaivo-Ranjatoelina H, Jacquemont M-L, Dreyfus M, Lavenu-Bombled C, Gachet C. Founder effect for a novel GPIIb/IIIa mutation in Bernard-Soulier patients from La Réunion island. Abstracts of the XXIV Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. J Thromb Haemost 11:1-1322. 2013;
52. Drayna D, Drayna D. Founder Mutations [Internet]. Scientific American. [cité 8 juill

2018]. Disponible sur: <https://www.scientificamerican.com/article/founder-mutations-2006-06/>

53. Founder effect. In: Wikipedia [Internet]. 2018 [cité 8 juill 2018]. Disponible sur: [https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Founder\\_effect&oldid=847191055](https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Founder_effect&oldid=847191055)

54. Rodeghiero F, Tosetto A, Abshire T, Arnold DM, Collier B, James P, et al. ISTH/SSC bleeding assessment tool: a standardized questionnaire and a proposal for a new bleeding score for inherited bleeding disorders. *J Thromb Haemost JTH*. sept 2010;8(9):2063-5.

55. Elbatarny M, Mollah S, Grabell J, Bae S, Deforest M, Tuttle A, et al. Normal range of bleeding scores for the ISTH-BAT: adult and pediatric data from the merging project. *Haemoph Off J World Fed Hemoph*. nov 2014;20(6):831-5.

56. Barsounaick Jean-Paul CA. Technique de thrombopathie en cytométrie en flux. ANA-H2-MO-020.Laboratoire d'hématologie GHSR. 2015.

57. Haute Autorité de Santé - NPLATE [Internet]. [cité 8 août 2018]. Disponible sur: [https://www.has-sante.fr/portail/jcms/c\\_813331/fr/nplate?xtmc=&xtr=1](https://www.has-sante.fr/portail/jcms/c_813331/fr/nplate?xtmc=&xtr=1)