SOMMAIRE

ABREVIATIONS 1

FIGURES ET TABLEAUX 4

INTRODUCTION 7

I. EXPLORATION BIOLOGIQUE DES THROMBOPATHIES CONSTITUTIONNELLES 9

1. Physiologie plaquettaire 9

1.1. Mégacaryopoïèse 9

1.2. Structure des plaquettes 12

1.2.1. Membrane 13

1.2.2. Cytosquelette 13

1.2.3. Organelles plaquettaires 14

1.2.3.1. Granules α 14

1.2.3.2. Granules denses (δ) 17

1.2.3.3. Lysosomes 17

1.3. Rôle des plaquettes dans l'hémostase primaire 18

1.3.1. Activation plaquettaire 19

1.3.1.1. Voies de signalisation impliquant les molécules adhésives 20

a) Le complexe GPIb-IX-V 21

b) La GPVI 23

c) Les intégrines 24

1.3.1.2. Voies de signalisation impliquant les agonistes solubles 26

a) Les récepteurs à la thrombine : PAR1 et PAR4 27

b) Les récepteurs à l'ADP : P2Y1 et P2Y12 28

c) Les récepteurs au thromboxane A2 (TXA2) : TPα 29

d) Les récepteurs à l'épinéphrine (adrénaline) 31

e) Les récepteurs à la sérotonine (5-HT) 31

1.3.1.3. Voies d'inhibition de l'activation plaquettaire 31

1.3.2. Agrégation plaquettaire 33

1.3.2.1. Signalisation « inside-out » de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ 33

a) Voies de signalisation « inside-out » impliquées dans l'agrégation plaquettaire 33

b) CalDAG-GEFI : nœud de signalisation intra-plaquettaire 33

1.3.2.2. Signalisation « outside-in » de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ 36

2. Outils diagnostiques 38

2.1. Préanalytique 38

2.2. Numération plaquettaire et microscopie optique 39
2.3. Microscopie électronique 41
2.4. Immunofluorescence 42
2.5. Tests globaux d'exploration de l'hémostase primaire 42
2.5.1. Temps de saignement 42
2.5.2. Temps d'occlusion plaquettaire 43
2.6. Agrégation plaquettaire 45
2.7. Cytométrie en flux 49
2.8. Etude de la sécrétion plaquettaire 51
2.8.1. Dosage du contenu des granules plaquettaires 51
2.8.1.1. Granules α 51
a) Dosage des protéines solubles des granules α 51
b) Etude des protéines membranaires des granules α 51
2.8.1.2. Granules denses 52
a) Etude des protéines membranaires des granules denses 52
b) Détermination du contenu en nucléotides plaquettaires 52
c) Dosage de la sérotonine 52
2.8.2. Tests fonctionnels de la sécrétion granulaire 53
2.8.2.1. Granules α 53
2.8.2.2. Granules denses 53
a) Lumi-agrégométrie : Test à la luciférine luciférase 53
b) Test de sécrétion de la sérotonine (SRA : serotonin release assay) 53
c) Autres tests fonctionnels de sécrétion de la sérotonine 54
d) Test à la mépacrine 54
2.9. Biologie moléculaire 55
3. Stratégie diagnostique et classification des principales thrombopathies constitutionnelles 57
3.1. Stratégie diagnostique 57
3.2. Classification des principales thrombopathies constitutionnelles 60
3.2.1. Pathologies des récepteurs glycoprotéiques des protéines adhésives ou d'agrégation 60
3.2.1.1. Thrombasthénie de Glanzmann 60
3.2.1.2. Syndrome de Bernard-Soulier 61
3.2.1.3. Déficit en GPVI 61
3.2.1.4. Pseudo-maladie de Willebrand plaquettaire 61
3.2.2. Pathologies des récepteurs des agonistes solubles 62
3.2.2.1. Déficit en P2Y12 62

3.2.2.2. Déficit en récepteur du TXA2 62
3.2.3. Pathologies des voies de signalisation 62
3.2.3.1. Déficit en CalDAG-GEFI 63
3.2.3.2. Déficit en Kindline : leukocyte adhesion deficiency III (LAD-III) 63
3.2.3.3. Syndrome de Noonan 64
3.2.4. Pathologies sécrétoires 64
3.2.4.1. Défauts des granules α 64
a) Syndrome des plaquettes grises 64
b) Thrombopathie Québec, ARC syndrome, syndrome de Paris-Trousseau 65
3.2.4.2. Défauts des granules denses 66
a) Syndrome du pool vide 66
b) Syndrome de Chediak-Higashi, Syndrome d'Hermansky-Pudlak, Syndrome de Griscelli 66
3.2.5. Anomalies de l'activité procoagulante des plaquettes 67
3.2.5.1. Syndrome de Scott 67
II. CARACTERISATION FONCTIONNELLE DE THROMBOPATHIES NOUVELLEMENT RAPPORTEES : EXEMPLE DU DEFICIT EN CALDAG-GEFI 69
1. Description et caractérisation de la première mutation sur le gène *RASGRP2* décrite chez l'homme 69
1.1. Caractérisation initiale des patients 69
1.1.1. Anamnèse et présentation clinique 69
1.1.2. Exploration biologique initiale des fonctions plaquettaires 69
1.2. Caractérisation d'un déficit en CalDAG-GEFI 72
1.2.1. Expression de la protéine CalDAG-GEFI 72
1.2.2. Evaluation de l'activation de Rap1b 72
1.2.3. Etude de l'adhésion et de l'étalement plaquettaires en condition statique 74
1.2.4. Etude de l'adhésion en condition de flux 74
2. Caractérisation fonctionnelle de mutations nouvellement identifiées sur le gène *RASGRP2* 76
2.1. Mutations nouvellement identifiées sur le gène *RASGRP2* 76
2.1.1. Mutation 2 76
2.1.2. Mutation 5 78
2.2. Objectifs 78
2.3. Matériels et méthodes 78
2.3.1. Isolement plaquettaire 79
2.3.2. Adhésion et étalement plaquettaires en condition statique 79
2.3.3. Construction des plasmides 80

2.3.4. Transfection des cellules GripTite® 293 MSR et HeLa 81
2.3.5. Fractionnement des organites subcellulaires 82
2.3.6. Détection des protéines par Western Blot 83
2.3.7. Analyse par immunofluorescence 84
2.3.8. Analyses statistiques 85
2.4. Résultats 85
2.4.1. Implication de CalDAG-GEFI dans la signalisation « outside-in » de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ 85
2.4.2. Rôle du domaine C1 de CalDAG-GEFI dans la localisation intra cellulaire de la protéine 88
2.5. Discussion 92

CONCLUSION 97

BIBLIOGRAPHIE 99

ABRÉVIATIONS

β-TG	β thomboglobuline
AC	Adénylate cyclase
ADAMTS13	A Disintegrin And Metalloprotease with ThromboSpondin Type 1 repeats, 13e membre
AMPc	Adénosine 3',5'-monophosphate cyclique
ARNm	ARN messager
BAT	Bleeding Assessment Tool
BFU-MK	Burst forming unit-megakaryocte
BLOC	Biogenesis of lysosome-related organelles complex 3
BSA	Bovine serum albumin
CalDAG-GEFI	Calcium and DAG-regulated guanine exchange Factor I
CCD	Charged-coupled device
Cdc25	Cell division cycle 25
CEHT	Centre d'Exploration des Pathologies Hémorragiques et Thrombotiques
CFU – GEMM	Colony Forming Unit Granulocytaire, Erythroblastique, Mégacaryocytaire et Monocytaire
CFU – GM	Colony Forming Unit granulocytaire et monocytaire
CFU-MK	Colony forming unit-megakaryocyte
CHU	Centre hospitalo-universitaire
COX-1	Cyclooxygénase 1
CRP	Collagen related peptide
CSH	Cellule souche hématopoïétique
DAG	Diacylglycerol
DAPI	Diamidino-2-phénylindole
E.coli	Escherichia Coli
EDTA	Acide éthylène diamine tétraacétique
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
ERGIC	Endoplasmic reticulum-golgi intermediate compartment
F-actine	Filamentous-actine
GAP	GTPase activating protein
GDP	Guanosine diphosphate

GEF	Guanine exchange factor
GP	Glycoprotéine
GPCRs	Récepteurs couplés aux protéines G
GTP	Guanosine triphosphate
HA	Hémagglutinine
HET	Héterozygote
HOM	Homozygote
HPLC	Chromatographie liquide haute performance
HRP	House radish peroxidase
Ig	Immunoglobuline
IP3	Inositol tri phosphate
IPF	Immature platelet fraction
ISTH	International Society on Thrombosis and Haemostasis
ITAM	Immunoreceptor tyrosine-based activatory motifs
LAT	Linker for activation of T cells
LC-MS	Chromatographie en phase liquide - Spectrométrie de masse
LRO	Lysosome related organelles
MEP	Progéniteur commun erythroblastique-mégacaryocytaire
MES	2-(N-morpholino) ethane sulfonic acid
MET	Microscopie électronique à transmission
MFI	Mean Fluorescence Intensity
MK	Megakaryocyte
MRP4	Multidrug-resistant protein 4
NGS	Next-generation sequencing
NO	Monoxyde d'azote
OPT	o-Phthalaldehyde
PAR	Protease-activated receptor
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PE	Phycoérythrine
PF4	Facteur 4 plaquettaire
PG	Prostaglandine
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase

PKC	Protéine kinase C
PL	Phospholipase
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acétate
PRP	Plasma riche en plaquettes
PS	Phosphatidylsérine
PTI	Purpura thrombopénique idiopathique
PVDF	Polyvinylidene difluoride
RAS-MAPK	Ras-Mitogen-activated protein kinase
RCPG	Récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G
RE	Réticulum endoplasmique
REM	Ras exchange motif
RIAM	Rap1-GTP-interacting adaptor molecule
RIPA	Radioimmunoprecipitation assay
SCO	Système canaliculaire ouvert
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SEM	Microscopie électronique à balayage
SEM	Erreur standard de la moyenne
SLP76	Src homology 2 domain-containing leukocyte protein of 76 kD
SSC	Scientific and Standardization Committee
STD	Système tubulaire dense
Syk	Spleen tyrosine kinase
TAB	Tyrode albumine buffer
TGN	Tran Golgi network
TIH	Thrombopénie induite par l'héparine
TPα	Thromboxane/prostaglandin α
TPO	Thrombopoïètine
TRITC	Tetramethyl rhodamine isothiocyanate
TSP-1	Thrombospondine-1
TST	Tris saline tween
TXA2	Thromboxane A2
VPM	Volume plaquettaire moyen
VWF	Facteur von Willebrand
WT	Wild type

FIGURES ET TABLEAUX

Figure 1 Représentation schématique de l'hématopoïèse

Figure 2 Différenciation mégacaryocytaire

Figure 3 Photographies de frottis de myélogramme en microscopie optique représentant les différents stades de maturation des mégacaryocytes

Figure 4 Morphologie et ultrastructure plaquettaire

Figure 5 Changement de forme des plaquettes au cours de leur activation

Figure 6 Représentation schématique de la formation d'un thrombus

Figure 7 Représentation schématique simplifiée des mécanismes impliqués dans l'activation plaquettaire

Figure 8 Structure du complexe GPIb-IX-V et domaines fonctionnels

Figure 9 Relation structure/fonction du facteur von Willebrand

Figure 10 Représentation schématique de la structure de la GPVI et des principales voies de signalisation associées

Figure 11 Images de microscopie électronique à transmission (A), schématisation (B) et diagramme en ruban (C) des conformations adoptées par le domaine extracellulaire des intégrines

Figure 12 Schématisation de l'activation des récepteurs PARs

Figure 13 Représentation schématique de l'activation plaquettaire induite par l'ADP et l'ATP

Figure 14 Représentation schématique du métabolisme de l'acide arachidonique

Figure 15 Représentation schématique des voies de signalisation impliquées dans l'activation plaquettaire

Figure 16 Représentation schématique du cycle des GTPases

Figure 17 Représentation schématique de la structure de CalDAG-GEFI

Figure 18 Représentation schématique de la signalisation « inside-out » de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$

Figure 19 Régulation de l'activation de Rap1b dans les plaquettes

Figure 20 Représentation schématique des stades de l'étalement plaquettaire

Figure 21 Représentation schématique des signalisations « inside-out » et « outside-in » de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$

Figure 22 Photographie d'un frottis sanguin en microscopie optique présentant des amas plaquettaires

Figure 23 Images de microscopie électronique présentant l'ultrastructure plaquettaire

Figure 24 Représentation schématique du système de mesure du temps d'occlusion plaquettaire PFA-100®

Figure 25 Représentation de la réponse plaquettaire mesurée en agrégométrie

Figure 26 Tracé typique d'agrégation des plaquettes en PRP en réponse au collagène

Figure 27 Tracés d'agrégation d'un patient sain en réponse aux différents agonistes plaquettaires

Figure 28 Evaluation de l'activation plaquettaire par cytométrie en flux

Figure 29 Représentation schématique des voies impliquées dans la sécrétion des granules plaquettaires et des tests disponibles pour diagnostic biologique des pathologies héréditaires de la sécrétion plaquettaire

Figure 30 Algorithme diagnostique des thrombopathies constitutionnelles

Figure 31 Caractérisation des fonctions plaquettaires des patients

Figure 32 Première mutation de *RASGRP2* identifiée chez l'Homme (mut1)

Figure 33 Evaluation de l'activation de Rap1b dans les plaquettes des patients porteurs de la mut1 de *RASGRP2* et dans des cellules transfectées avec la forme mutée de la protéine

Figure 34 Adhésion en flux des plaquettes des patients porteurs de la mut1 de CalDAG-GEFI

Figure 35 Effets des mutations 2 (mut2) et 5 (mut5) sur la séquence peptidique de CalDAG-GEFI

Figure 36 Activation de Rap1b dans les plaquettes de patients porteurs de la mut2 de *RASGRP2*

Figure 37 Agrégation plaquettaire des patients porteurs de la mut2 de *RASGRP2*

Figure 38 Expression cellulaire de HA-CalDAG-GEFI WT et ΔC1

Figure 39 Organigramme de centrifugation différentielle d'un homogénat cellulaire montrant la composition attendue des culots obtenus

Figure 40 Etude de l'adhésion et de l'étalement plaquettaires en l'absence de CalDAG-GEFI

Figure 41 Effet de l'ajout de Mn^{2+} sur l'étalement plaquettaire en présence de TRAP-6 chez les patients déficients en CalDAG-GEFI

Figure 42 Localisation subcellulaire des formes native (WT) et mutée (mut5 de *RASGRP2*) de CalDAG-GEFI

Figure 43 Images représentatives de la localisation subcellulaire des formes native (WT) et tronquée (ΔC1) de la protéine CalDAG-GEFI dans des cellules HeLa.

Figure 44 Images représentatives de la localisation subcellulaire des formes native (WT) et tronquée (ΔC1) de la protéine CalDAG-GEFI dans des cellules GripTite® 293 MSR

Tableau 1 Constituants des granules α

Tableau 2 Constituants des granules denses

Tableau 3 Constituants des lysosomes

Tableau 4 Agonistes plaquettaires utilisés en agrégométrie et leur récepteur ou fonction plaquettaires cibles

Tableau 5 Hiérarchisation des tests biologiques utiles au diagnostic des thrombopathies constitutionnelles

Tableau 6 Séquences nucléotidiques des amorces utilisées pour la construction des vecteurs d'expression de HA-*RASGRP2* formes sauvage (WT) et tronquée (CalDAG-GEFI ΔC1)

Tableau 7 Tableau récapitulatif des différents anticorps primaires et secondaires utilisés en Western blot en fonction de la protéine/étiquette cible

Tableau 8 Tableau récapitulatif des différents anticorps primaires et secondaires et des sondes utilisés en immunomarquage en fonction de la cible

INTRODUCTION

La première description exacte des plaquettes a été publiée par Max Schultze en 1854 (1). Il les considère pour la première fois comme un constituant physiologique du sang circulant, et recommande instamment l'étude plus approfondie de ces « sphérules ». En 1882, le médecin italien Giulio Bizzozero démontrera la valeur de cette recommandation dans une étude beaucoup plus exhaustive (2). Il montra que ces « granules » sont les premiers composants sanguins adhérant aux parois des vaisseaux endommagés *in vivo* et, *in vitro*, qu'elles sont capables d'adhérer à des fils sur lesquels se dépose alors de la fibrine. Il les nommera *piastrine* en italien, traduit en français par *petites plaques* puis *plaquettes*. Les plaquettes sanguines sont décrites depuis la fin de XIXe siècle comme le support des états permettant le maintien de la fluidité du sang et l'arrêt des hémorragies.

Les plaquettes jouent en effet un rôle primordial dans le processus de l'hémostase ; elles sont, avec le facteur von Willebrand, l'un des acteurs majeurs de l'hémostase primaire, formant par leur agrégation le clou plaquettaire qui arrête l'hémorragie en cas de brèche vasculaire, et constituant également une surface procoagulante, support des réactions de coagulation.

Quand la fonction des plaquettes est altérée, le sujet s'expose à un risque accru d'hémorragies. Les thrombopathies constitutionnelles correspondent à un groupe hétérogène de pathologies rares liées à des atteintes fonctionnelles plaquettaires dont la fréquence est estimée à 1/10 000 individus en France. Les variants à l'origine de ces maladies génétiques affectent des protéines impliquées dans les processus d'activation, d'adhésion, d'agrégation plaquettaire ou encore dans leur activité procoagulante. L'étude de ces thrombopathies nécessite une connaissance approfondie de la physiopathologie plaquettaire, qui sera abordée dans la première partie de ce travail.

Les formes les plus sévères comme la thrombasthénie de Glanzmann ou le syndrome de Bernard-Soulier sont le plus souvent détectés tôt dans l'enfance, alors que les thrombopathies d'expression clinique plus modérée ne sont parfois découvertes qu'à l'âge adulte. Les thrombopathies ont, dans la majorité des cas, une expression clinique modérée, dominée par des saignements cutanéo-muqueux spontanés ou post-traumatiques et post-chirurgicaux. Nous disposons aujourd'hui d'un large panel d'outils biologiques permettant d'explorer les

différentes fonctions plaquettaires, lesquels seront également détaillées dans la première partie de ce travail.

Toutefois, la prévalence des thrombopathies est certainement sous-estimée compte tenu de la complexité des processus moléculaires régulant la fonction plaquettaire et des difficultés de leur exploration biologique. La deuxième partie de ce travail traitera, à travers l'exemple d'un déficit en CalDAG-GEFI, des stratégies pouvant être mises en œuvre pour caractériser des thrombopathies de mécanisme physiopathologique inconnu, ainsi que des perspectives qui en découlent.

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

I. EXPLORATION BIOLOGIQUE DES THROMBOPATHIES CONSTITUTIONNELLES

1. Physiologie plaquettaire

Les plaquettes sanguines ou thrombocytes sont les plus petits éléments figurés du sang qui jouent un rôle majeur dans l'hémostase. Elles proviennent de la fragmentation du cytoplasme de leurs précurseurs médullaires : les mégacaryocytes.

1.1. Mégacaryopoïèse

La mégacaryopoïèse se déroule dans la moelle osseuse (MO), mais l'étape terminale est en partie sanguine et pulmonaire.
Comme toutes les cellules différenciées dans du sang circulant, les plaquettes proviennent d'une cellule souche hématopoïétique (CSH). Les CSH sont les seules cellules hématopoïétiques multipotentes (capables de donner tous les types cellulaires hématopoïétiques) et de s'auto-renouveler durant toute la vie d'un individu (3,4).

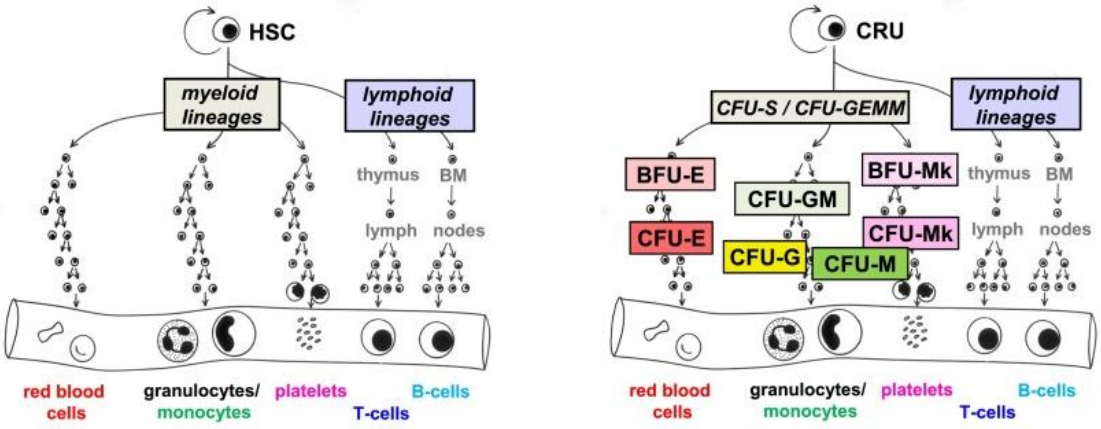

Figure 1 : Représentation schématique de l'hématopoïèse
D'après Eaves CJ. (5)

Cette CSH se différencie en progéniteur lymphoïde d'une part, et en progéniteur myéloïde d'autre part : la CFU – GEMM (Colony Forming Unit Granulocytaire, Erythroblastique, Mégacaryocytaire et Monocytaire), capable de donner toutes les lignées myéloïdes, y compris la lignée mégacaryocytaire (5) *(Figure 1)*.

La CFU-GEMM se différencie ensuite en CFU – GM, progéniteur granulocytaire et monocytaire, et en MEP : progéniteur commun erythroblastique-mégacaryocytaire.
Les MEPs se différencient à leur tour en progéniteurs érythrocytaires et progéniteurs mégacaryocytaires ; c'est à ce stade que commence la prolifération mégacaryocytaire proprement dite.

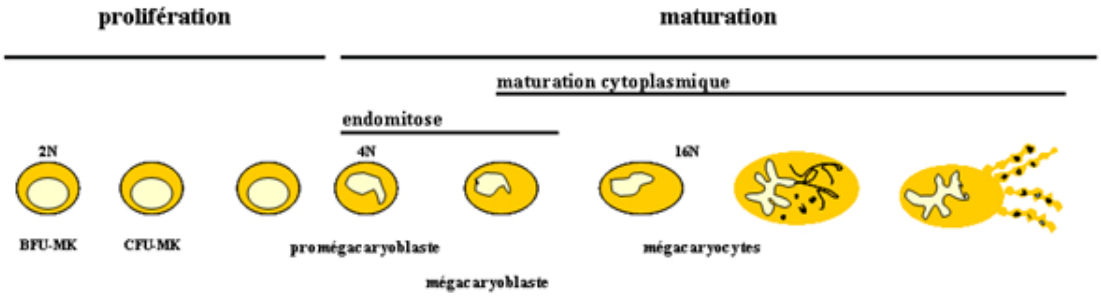

Figure 2 : Différenciation mégacaryocytaire

Les progéniteurs mégacaryocytaires sont des cellules non reconnaissables morphologiquement, caractérisées par leur capacité à former *in vitro* des colonies composées de mégacaryocytes ; ils assurent ainsi l'expansion mégacaryocytaire. Deux classes sont définies en fonction de leur capacité de prolifération : les progéniteurs mégacaryocytaires précoces à haut potentiel proliferatif, les BFU-MK (burst forming unit-megakaryocte), et les CFU-MK (colony forming unit-megakaryocyte), à potentiel proliferatif moindre. Les promégacaryoblastes (ou cellules transitionnelles) correspondent au stade cellulaire succédant à la CFU-MK. Il s'agit de cellules d'allure blastique de petite taille *(Figure 2)*.

La lignée mégacaryocytaire suit ensuite un processus unique de maturation comprenant polypoïdisation, maturation cytoplasmique, puis formation de proplaquettes.
Les promégacaryoblastes augmentent leur ploïdie par une succession d'endomitoses. Les endomitoses, ou endoreduplications, consistent en une réplication de l'ADN sans division cellulaire conduisant à des cellules géantes polyploïdes (ploïdie moyenne de l'adulte : 16N) (6), mononuclées. De récents travaux suggèrent que ce processus serait dû à un défaut tardif de cytocinèse, lié à un défaut de l'anneau contractile et de la voie d'activation Rho / Rock (7).
Le cytoplasme subit lui aussi une maturation, comprenant la synthèse de protéines plaquettaires spécifiques contenues dans les organelles plaquettaires ; ainsi que la synthèse des membranes de démarcation, délimitant des canaux à l'intérieur du MK ouverts sur l'extérieur.

A la fin de sa maturation, les MKs migrent vers la niche vasculaire et forment, par déroulement de leurs membranes de démarcation, de longues protubérances appelées proplaquettes qui viennent s'étendre au travers de la monocouche endothéliale sinusoïdale et se fragmentent sous l'effet du flux sanguin libérant ainsi des pré-plaquettes dans la circulation sanguine. Ces dernières se fragmentent à leur tour pour former les plaquettes sanguines (8). Chaque MK produit entre 2000 et 5000 plaquettes.

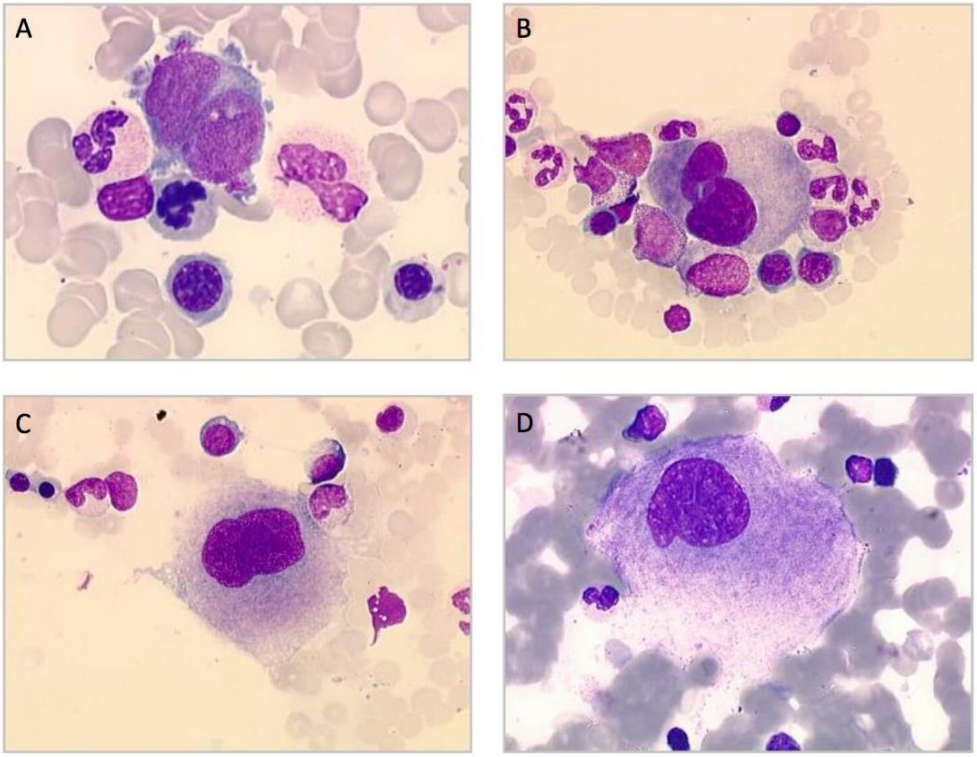

Figure 3 : Photographies de frottis de myélogramme en microscopie optique représentant les différents stades de maturation des mégacaryocytes

A- Mégacaryoblaste (20-30µm de diamètre) : la ploïdie augmente (4-8N) avec début de maturation cytoplasmique. Rapport nucléo-cytoplasmique élevé, noyau rond, chromatine fine, cytoplasme très basophile sans granulations. B- Mégacaryocyte basophile ou promégacaryocyte (40-80µm de diamètre) : la synthèse d'ADN cesse à ce stade. La majorité des MKs a une ploïdie de 16N. Grandes cellules dont le noyau commence à se lobuler, le cytoplasme est de plus en plus abondant, quelques granulations apparaissent. C- Mégacaryocyte granuleux (50-100µm de diamètre) : le noyau est multilobé, la chromatine plus dense, le cytoplasme perd une partie de sa basophilie, devenant acidophile et riche en granulations. D- Mégacaryocyte mature ou plaquettogène (50-120µm de diamètre) : le noyau est multilobé, dense, les granulations se regroupent en paquets dans le cytoplasme dont la teinte évoque celle des plaquettes.

D'après Zandecki M. (9)

La mégacaryopoïèse est régulée par l'expression séquentielle des facteurs de transcription (RUNX1, GATA1, …) et de nombreuses cytokines, dont la principale est la thrombopoïètine (TPO). La TPO possède les propriétés d'un facteur à activité CSF agissant sur toute la lignée mégacaryocytaire : prolifération des progéniteurs mégacaryocytaires, polyploïdisation et maturation cytoplasmique des MK puis formation des plaquettes (10).
Le taux circulant de TPO est inversement corrélé à la masse plaquettaire et mégacaryocytaire (11).

1.2. Structure des plaquettes

Les plaquettes sanguines sont les plus petits éléments du sang circulant ; leur durée de vie dans le sang circulant est de 8 à 10 jours. Au repos, elles ont une forme discoïde avec un diamètre de 2 à 5µm et un volume moyen (VPM) compris entre 8 et 11fL. Chez l'adulte, la concentration plaquettaire sanguine normale est comprise entre 150 et 400G/L ; le reste des plaquettes étant séquestré dans la rate.

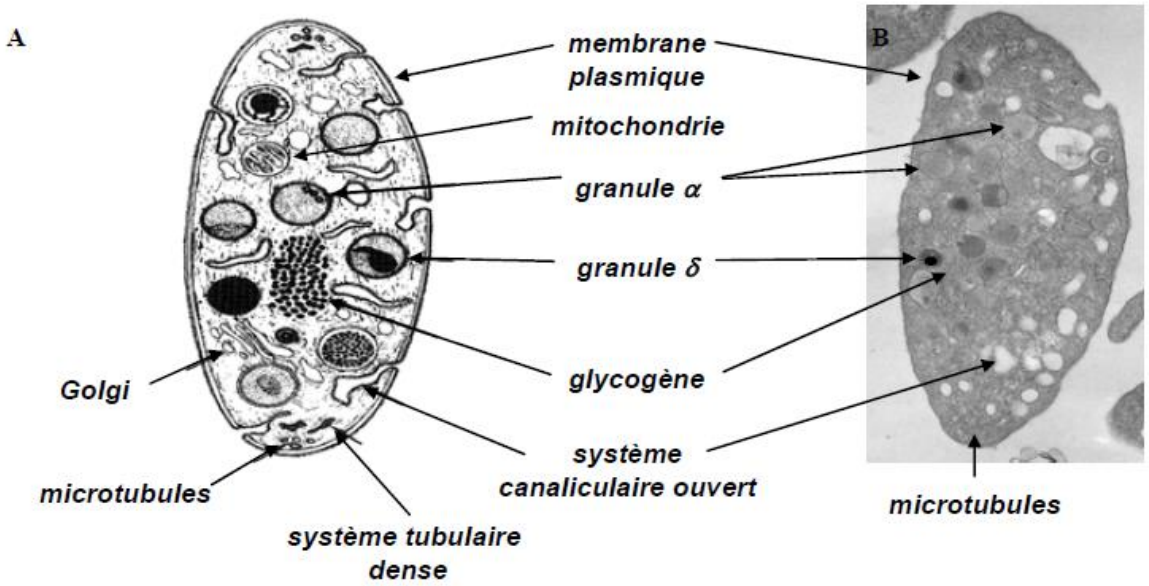

Figure 4 : Morphologie et ultrastructure plaquettaire
Schéma (A) et image de microscopie électronique à transmission (B) d'une plaquette au repos en coupe longitudinale.
D'après Eckly A. INSERM U949, Strasbourg

1.2.1. Membrane

La membrane plaquettaire est une bicouche phospholipidique asymétrique comprenant du cholestérol, des glycolipides, des protéoglycanes ainsi que des glycoprotéines. Au repos, les phospholipides anioniques sont majoritairement situés sur le feuillet interne de la membrane plasmique (12) et basculent, lors de l'activation plaquettaire, sur le feuillet externe. Ce « flip-flop » des phospholipides est essentiel à l'activité pro-coagulante des plaquettes activées.

La membrane plasmique s'invagine vers l'intérieur de la cellule donnant naissance à un système particulièrement complexe : le système canaliculaire ouvert (SCO) qui accroit les échanges avec le milieu environnant en facilitant l'endocytose et l'exocytose des organelles intracellulaires (13) et forme également une réserve de membrane indispensable lors du changement de forme des plaquettes (14).

1.2.2. Cytosquelette

Le cytosquelette des plaquettes est constitué d'un réseau de microtubules formant un anneau sous la membrane plasmique appelé bande marginale, assurant le maintien de la forme discoïde de la plaquette au repos (15), ainsi que de filaments contractiles composés d'actine et de myosine II. Les microfilaments d'actine sont présents sous forme de monomères (G actine) ou polymérisées (F actine). Le changement de forme des plaquettes lors de leur activation implique un remaniement du cytosquelette. Les plaquettes en suspension activées par un agoniste soluble passent d'une forme discoïde à une forme sphérique et émettent des filopodes. Lors d'une adhésion statique sur une surface recouverte de fibrinogène ou de collagène par exemple, les plaquettes activées deviennent également sphériques, puis s'étalent en émettant séquentiellement des filopodes puis des lamellipodes et des fibres de stress (16) (*Figure 5)*.

Outre son rôle architectural, le cytosquelette d'actine est également impliqué dans la sécrétion des granules intra plaquettaire (17)

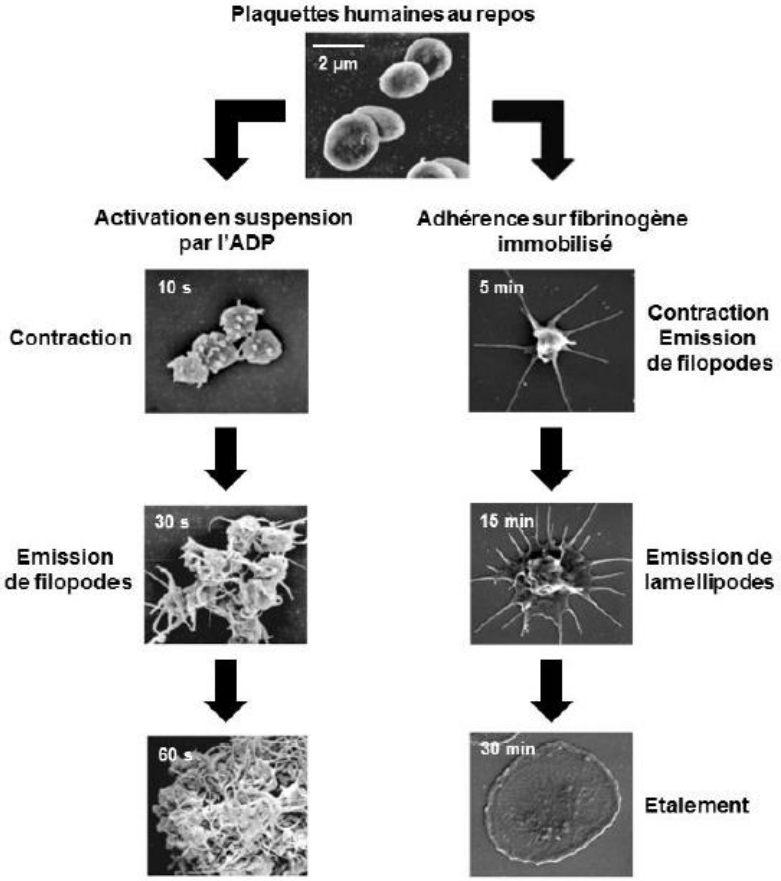

Figure 5 : Changement de forme des plaquettes au cours de leur activation

Images de microscopie électronique à balayage de l'activation de plaquettes en suspension par un agoniste soluble (gauche) et au cours de l'adhésion statique sur fibrinogène (droite).

D'après Eckly A. INSERM U949, Strasbourg

1.2.3. Organelles plaquettaires

Les organelles plaquettaires comprennent un système tubulaire dense (STD), correspondant au réticulum endoplasmique lisse ; des mitochondries contribuant au métabolisme énergétique ; des grains de glycogène ainsi que des granules de stockage (granules α, granules denses et lysosomes) dont le contenu est sécrété ou exposé à la membrane par exocytose lors d'une forte activation.

1.2.3.1. Granules α

Les granules α sont les organelles plaquettaires les plus abondants : on en retrouve environ 40 à 80 par plaquette. Ils ont une forme sphérique ou ovoïde, avec un diamètre allant de 200 à 500nm. Les constituants des granules α sont soit d'origine plasmatique, incorporés dans les granules par endocytose (c'est notamment le cas des immunoglobulines) ; soit synthétisés par

le mégacaryocyte : c'est le cas du PF4 (Facteur 4 plaquettaire) ou du VWF (Facteur von Willebrand) par exemple. Les granules α contiennent à la fois des protéines membranaires qui seront exprimés à la surface des plaquettes, et des protéines solubles qui seront libérées dans le milieu extra cellulaire après sécrétion. Ces protéines sont impliquées non seulement dans la coagulation, mais également dans l'inflammation, l'angiogenèse, et dans la défense de l'hôte.
Le *tableau 1* présente les principaux constituants des granules α (liste non exhaustive), classés par fonction (18).

Tableau 1 : Constituants des granules α

D'après Michelson A. (18)

Type	Examples
Integral membrane proteins	$\alpha_{IIb}\beta_3$, GPIb-IX-V, GPVI, TLT-1, P-selectin
Coagulants, anticoagulants, and fibrinolytic proteins	Factor V, factor IX, factor XIII, antithrombin, protein S, tissue factor pathway inhibitor, plasminogen, plasminogen activator inhibitor 1, α2-macroglobulin
Adhesion proteins	Fibrinogen, von Willebrand factor, thrombospondin
Chemokines	CXCL1(GRO-α), CXCL4 (PF4), CXCL5 (ENA-78), CXCL7 (PBP, β-TG, CTAP-III, NAP-2), CXCL8 (IL-8), CXCL12(SDF-1α), CCL2 (MCP-1), CCL3 (MIP-1α), and CCL5 (RANTES)
Growth factors	Epidermal growth factor (EGF), hepatocyte growth factor, insulin-like growth factor, transforming growth factor β (TGFβ)
Angiogenic factors and inhibitors	Vascular endothelium growth factor (VEGF), fibroblast growth factor, platelet-derived growth factor (PDFG), tissue inhibitors of metalloproteinases, angiostatin, endostatin
Microbicidal proteins	Thymosin-β4, thrombocidins 1 and 2 (from NAP-2)
Immune mediators	Complement C3 precursor, complement C4 precursor, β1H Globulin, factor D, factor H, C1 inhibitor, IgG

1.2.3.2. Granules denses (δ)

Les granules denses, ou granules δ, sont plus petits (environ 150nm de diamètre) et moins nombreux (entre 3 et 8 par plaquettes) que les granules α (19). Leur centre est opaque aux électrons en microscopie électronique à transmission, ce qui leur vaut leur appellation de granules denses. Ils contiennent des petites molécules essentielles à la physiologie plaquettaire, notamment de grandes quantités de nucléotides (ADP et ATP) et de la sérotonine ainsi qu'une forte concentration de calcium (2,2 M) (*Tableau 2*).

Tableau 2 : Constituants des granules denses
D'après Michelson A. (18)

Type	Examples
Cations	Ca^{2+}, Mg^{2+}, K^{+}
Nucleotides	ADP, ATP, UTP, GTP
Bioactive amines	Serotonin, histamine
Phosphates	Polyphosphate, pyrophosphate

Un certain nombre de protéines essentielles de la membrane plaquettaire ont été identifiées dans la membrane des granules denses : $\alpha_{IIb}\beta_3$, GPIb (20) ; ainsi que des récepteurs classiquement retrouvés sur les membranes d'autres organelles plaquettaires : CD63 (LAMP-3, granulophysine) (21), LAMP-2 (22).

1.2.3.3. Lysosomes

On retrouve moins de 3 lysosomes par plaquettes, d'un diamètre de 200 à 250nm chacun. Les constituants majeurs de ces organelles sont des enzymes impliquées dans la dégradation de protéines, de carbohydrates et de lipides (*Tableau 3*). Leur membrane contient LAMP-1, LAMP-2, et CD63.

Tableau 3 : Constituants des lysosomes

D'après Michelson A. (18)

Type	Examples
Protein degrading enzymes	Cathepsins, elastase, collagenase, carboxypeptidase, proline carboxypeptidase
Carbohydrate degrading enzymes	Glucosidase, fucosidase, galactosidase, glucuronidase, mannosidase, hexosaminidase, arabinofuranosidase
Phosphate ester cleaving enzyme	Acid Phosphatase

1.3. Rôle des plaquettes dans l'hémostase primaire

L'hémostase primaire comprend l'ensemble des phénomènes aboutissant à la formation, lors d'une brèche vasculaire, d'un caillot essentiellement plaquettaire, anciennement dénommé « clou plaquettaire » ou « thrombus blanc ». Ce caillot initial est ensuite consolidé par la formation de fibrine après activation de la coagulation, formant le caillot fibrinoplaquettaire, insoluble, capable de combler efficacement la brèche vasculaire et d'arrêter ainsi le saignement. Le processus de fibrinolyse permettra la dissolution du caillot et le reperméabilisation du vaisseau.

Les plaquettes font partie des acteurs majeurs de l'hémostase primaire, de même que le facteur von Willebrand (VWF), le fibrinogène et la paroi vasculaire.

En l'absence de brèche, l'endothélium vasculaire synthétise et libère des inhibiteurs plaquettaires (23) comme le monoxyde d'azote et la prostaglandine I2 (PGI2); constituant une surface non thrombogène. Lors d'une brèche vasculaire, le sous-endothélium, thrombogène, est mis à nu et va permettre l'adhésion et l'activation des plaquettes. Parallèlement, le contenu des granules plaquettaires est sécrété et amplifie l'activation plaquettaire, aboutissant à l'agrégation plaquettaire et à la formation du thrombus.

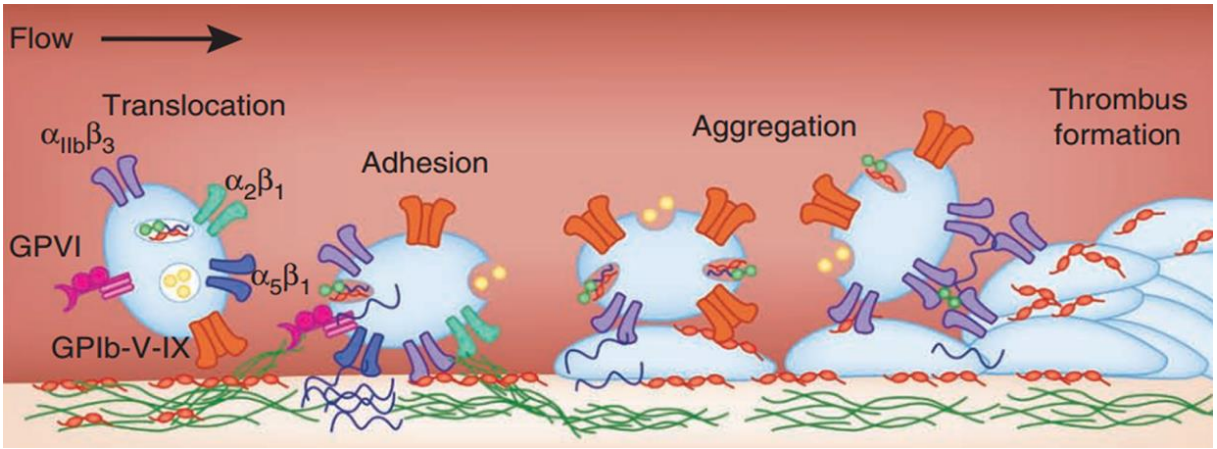

Figure 6 : Représentation schématique de la formation d'un thrombus
D'après Jackson SP (24)

1.3.1. Activation plaquettaire

L'activation plaquettaire fait intervenir de multiples voies de signalisation complémentaires. De façon schématique, elles peuvent être séparées en deux groupes : les voies impliquant les molécules adhésives, et celles impliquant les agonistes solubles. On peut considérer que les molécules adhésives mobilisent des intégrines et des glycoprotéines de surface couplées à l'activation de tyrosine kinases et à la phosphorylation de motifs spécifiques dont les motifs ITAM (immuno-tyrosine based activation motifs) (25) ; alors que les agonistes solubles ont pour récepteurs des membres de la superfamille des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G (RPCG) (26) .

La *figure 7* présente de manière simplifiée les mécanismes impliqués dans l'activation plaquettaire. La fixation des agonistes solubles ou des molécules adhésives sur leur récepteur active respectivement les phospholipases C β (PLCβ) et δ (PLCδ). L'hydrolyse du phosphatidylinositol 4,5 bisphosphate ($PI(4,5)P_2$) par les PLCβ ou γ génère deux seconds messagers : l'inositol 1,4,5-trisphosphate (IP3) et diacylglycérol (DAG), conduisant respectivement à la mobilisation du Ca^{2+} à partir des stocks intracellulaires et à l'activation des protéines kinase C (PKC). L'augmentation du Ca^{2+} intracytoplasmique est essentielle à l'activation plaquettaire, cet ion étant un cofacteur essentiel à l'action de nombreuses enzymes impliquées notamment dans l'activation de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$, la sécrétion plaquettaire et le réarrangement du cytosquelette d'actine. Les PKCs sont aussi essentielles à la majorité des réponses plaquettaires en régulant de nombreux acteurs de la dynamique plaquettaire. Cette signalisation aboutit à l'activation plaquettaire proprement dite.

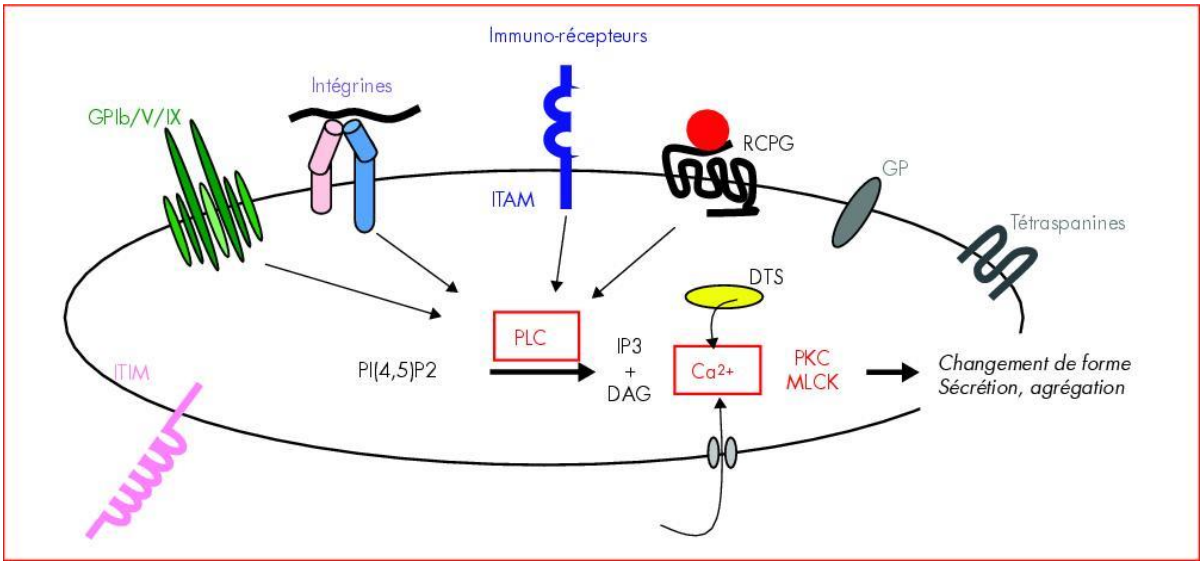

Figure 7 : Représentation schématique simplifiée des mécanismes impliqués dans l'activation plaquettaire

D'après Jandrot-Perrus M. (27)

1.3.1.1. Voies de signalisation impliquant les molécules adhésives

En cas de lésion de l'endothélium vasculaire, la matrice sous-endothéliale riche en collagène et en protéines fibrillaires (fibronectine, laminines, vitronectine) se retrouve exposée au flux sanguin. Les plaquettes sanguines vont alors ralentir et adhérer au sous-endothélium en se liant aux constituants de la matrice via leurs récepteurs membranaires. Cette première étape, rapide (3 à 5 min), débute par une vasoconstriction réflexe qui entraine une perturbation du flux sanguin.

Nous détaillerons les principales classes de récepteurs impliquées dans l'adhésion plaquettaire, soit :

- la famille des protéines riches en leucines, comme le complexe GPIb-IX-V, récepteur du VWF
- la famille des immuno-récepteurs à motif ITAM dont fait partie la GPVI, récepteur du collagène
- la famille des intégrines avec l'intégrine $\alpha_2\beta_1$, également récepteur du collagène ; et l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$, récepteur du fibrinogène.

D'autres glycoprotéines et des tétraspanines peuvent également être impliquées dans l'activation plaquettaire.

a) Le complexe GPIb-IX-V

Le complexe GPIb-IX-V est constitué par l'association de quatre sous-unités transmembranaires appartenant à la famille des protéines riches en leucine : la GPIbα (CD42b), la GPIbβ (CD42c), la GPIX (CD42a) et la GPV (CD42d) (28) présentant une stœchiométrie respectivement de 2 :2 :2 :1 (29); la GPIbα et la GPIbβ étant associées de façon covalente pour former la GPIb *(Figure 8).*

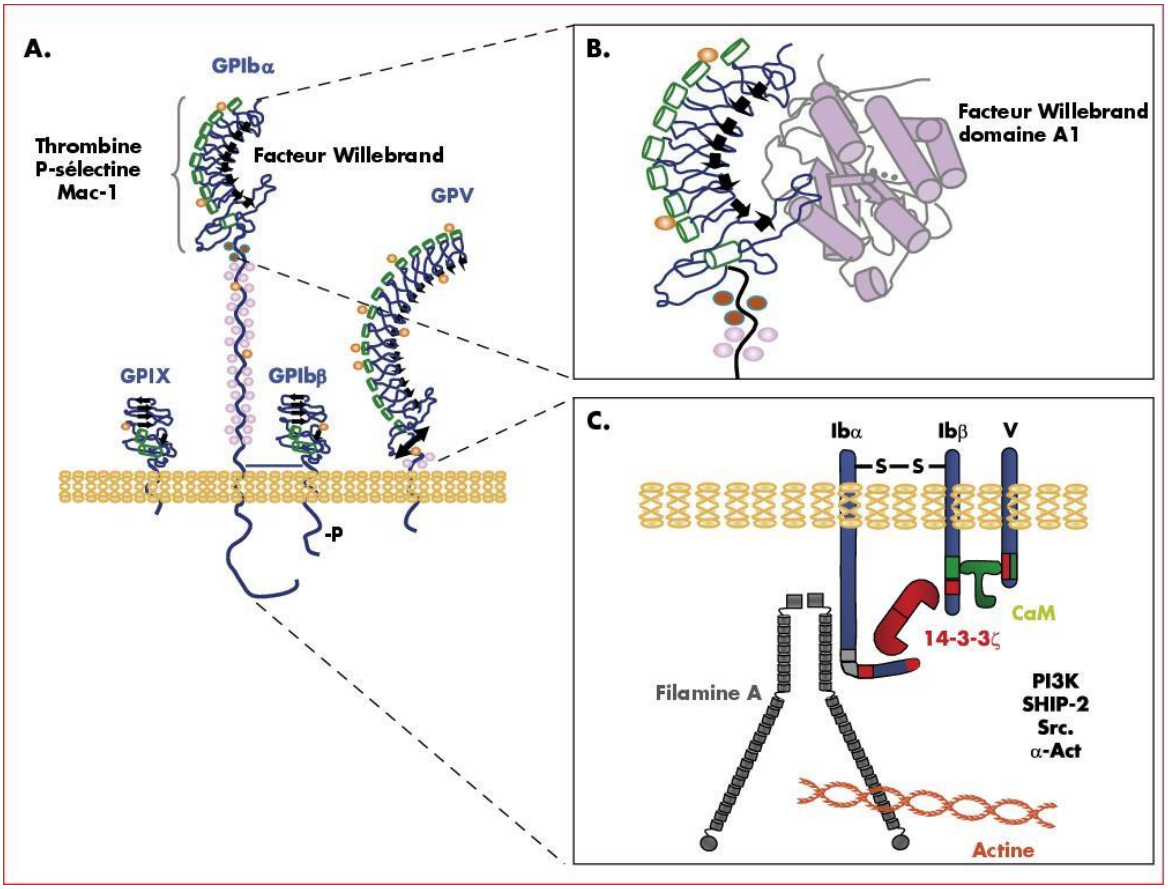

Figure 8 : Structure du complexe GPIb-IX-V et domaines fonctionnels

(a) Le complexe GPIb-IX-V est constitué de la sous-unité GPIbα reliée par un pont-disulfure à la GPIbβ et de manière non covalente à la GPIX et à la GPV. Les régions extracellulaires contiennent un ou plusieurs domaines riches en leucine. Le domaine N-terminal de la GPIbα contient les sites de liaison pour le facteur Willebrand, la thrombine, la P-sélectine et l'intégrine $\alpha_M\beta_2$ (Mac-1). (b) Le domaine A1 du VWF interagit avec les extrémités N et C-terminales de la région riche en leucine. (c) La partie intracellulaire du complexe interagit avec trois partenaires directs : la filamine A se lie à la GPIbα permettant un pontage avec l'actine sous-membranaire, la protéine 14-3-3ζ se lie à la fois à la GPIbα et à la GPIbβ, la calmoduline (CaM) se lie à la GPIbβ et à la GPV. La PI3 kinase, SHIP-2, Src et l'α-actinine (α-Act) interagissent indirectement.

D'après Lanza F. (30)

Les sites de liaison extracellulaires de la GPIb-IX-V sont tous situés dans le domaine N-terminal de la GPIbα, dont le principal ligand est le facteur von Willebrand.

Le VWF est une glycoprotéine multimérique de très haut poids moléculaire (500 à 20 000kDa) synthétisée dans les cellules endothéliales et les mégacaryocytes. Chaque monomère contient notamment un domaine de liaison à la GPIbα (domaine A1), un domaine d'association au collagène (A3), un motif peptidique RGD de liaison aux intégrines $\alpha_{IIb}\beta_3$ et $\alpha_v\beta_3$, ainsi qu'un site liant le facteur VIII (*Figure 9).*

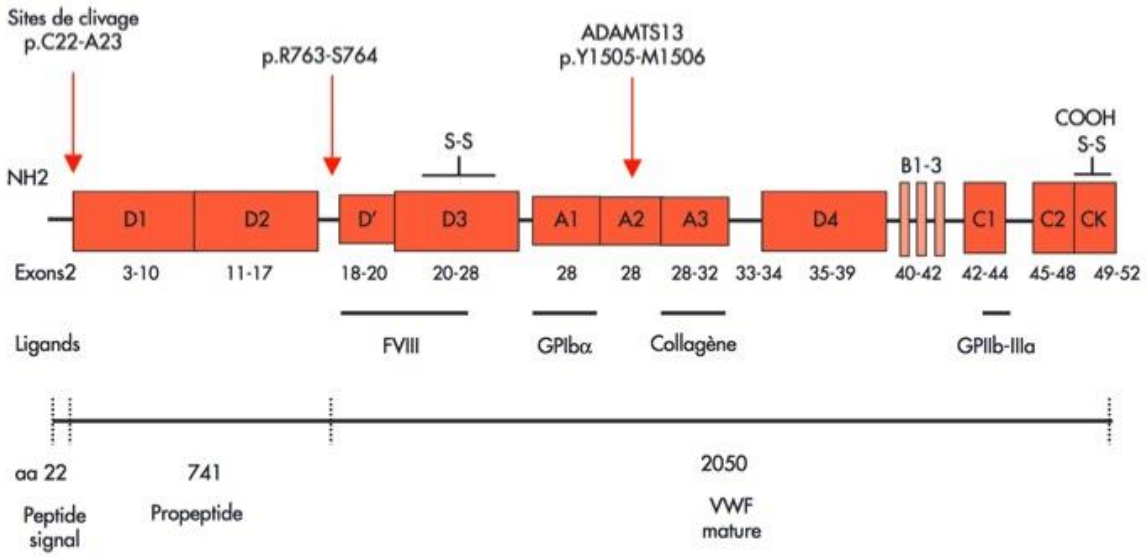

Figure 9 : Relation structure/fonction du facteur von Willebrand
Adapté de Veyradier A. (31)

Le VWF est stocké dans les corps de Weibel Palade des cellules endothéliales et dans les granules α plaquettaires. La métalloprotéase ADAMTS13 (A Disintegrin And Metalloprotease with ThromboSpondin Type 1 repeats, 13e membre), spécifique du VWF, clive les multimères de très haut poids moléculaire réduisant leur concentration et prévenant ainsi leur interaction spontanée avec les plaquettes. Le VWF circule dans le sang sous une forme globulaire, rendant le domaine A1 de la protéine inaccessible à son récepteur plaquettaire. En cas de lésion de d'endothélium, le VWF adhère au collagène du sous-endothélium via son domaine A3 ; le flux sanguin déplie alors le VWF, démasquant ainsi les sites de liaison à la GPIb plaquettaire (32,33).

La GPIb lie également une autre protéine adhésive, la thrombospondine-1 (TSP-1) (34); mais également la thrombine, les facteurs de coagulation XI et XII, le kininogène de haut poids moléculaire, la P-sélectine ainsi que l'intégrine leucocytaire $\alpha_M\beta_2$.

La partie intracellulaire du complexe permet l'ancrage du complexe au cytosquelette d'actine via son interaction avec la filamine A, ainsi que la transduction du signal en aval du récepteur. En réponse à son interaction avec le VWF, l'engagement du complexe GPIb-IX-V génère une signalisation impliquant les tyrosines kinases de la famille Src et la phospholipase C γ2 (35), aboutissant à l'activation de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ et au changement de forme des plaquettes.
En présence de taux de cisaillement élevés, retrouvés notamment dans les petites artères et artérioles, l'interaction rapide entre le complexe GPIb-IX-V et le VWF immobilisé sur le collagène est cruciale pour le recrutement et d'adhésion des plaquettes (36). Cependant, cette interaction est réversible et insuffisante pour permettre une adhésion stable qui nécessite des interactions supplémentaires entre les plaquettes et la matrice extra cellulaire.

b) La GPVI

La GPVI, principal récepteur plaquettaire du collagène (37), est une glycoprotéine membre de la superfamille des immunoglobulines exprimée spécifiquement dans la lignée mégacaryocytaire. Sa partie extracellulaire est composée de deux domaines de type immunoglobuline interagissant avec le collagène fibrillaire. Par l'intermédiaire de son domaine transmembranaire, elle s'associe à la chaine γ des récepteurs Fc des immunoglobulines (FcRγ). L'interaction de la GPVI avec le collagène entraine la dimérisation des complexes GPVI-FcRγ, un démasquage des domaines ITAM des FcRγ, puis l'autophosphorylation de ces domaines ITAM par des protéines kinases de la famille Src (Fyn et Lyn) associées au domaine intracellulaire de la GPVI. Ceci permet le recrutement et l'autophosphorylation de la protéine kinase Syk (Spleen tyrosine kinase), la formation d'un complexe de signalisation comprenant notamment les protéines adaptatrices LAT (Linker for activation of T cells) et SLP76 (Src homology 2 domain-containing leukocyte protein of 76 kDa) et l'activation de la PI3K puis de la phospholipase C γ2. La résultante de cette signalisation est la mobilisation du calcium intracellulaire, la dégranulation plaquettaire et l'activation des intégrines (38,39) *(Figure 10)*. Récemment, Mammadova *et al.* ont mis en évidence deux fonctions majeures de la GPVI résultant de sa liaison avec la fibrine polymérisée : l'amplification de la génération de thrombine et le recrutement des plaquettes circulantes au niveau du thrombus. (40)

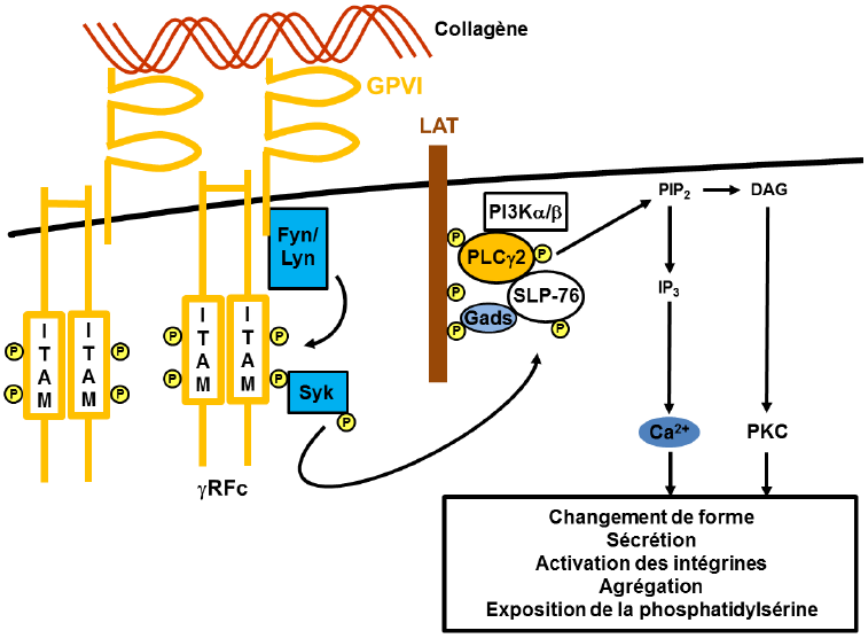

Figure 10 : Représentation schématique de la structure de la GPVI et des principales voies de signalisation associées

Adapté de Watson S.P. (38)

c) Les intégrines

Les intégrines représentent une large famille de glycoprotéines hétérodimériques constituées par l'association non covalente de deux chaines glycoprotéiques transmembranaires α et β. Leurs propriétés adhésives dépendent notamment de l'affinité pour leur ligand, fonction de la conformation de leurs domaines extracellulaires. Elles peuvent en effet adopter trois conformations distinctes : un état de faible affinité ou de repos, où l'intégrine est repliée sur elle-même ; un état d'affinité intermédiaire dans laquelle l'intégrine adopte une forme étendue mais la tête globulaire est en position fermée ; et enfin un état de forte affinité , où l'intégrine est sous forme étendue « tête ouverte » exposant la poche de fixation du ligand (41,42) *(Figure 11)*.

Ces réarrangements structuraux sont la résultante de la signalisation intracellulaire dite « inside-out », qui est la signalisation induite dans la cellule aboutissant au changement de conformation de l'intégrine qui peut alors fixer son ligand. L'engagement de l'intégrine conduit à l'oligomérisation ou « clusturing » de plusieurs intégrines, induisant la stabilisation de l'état de haute affinité et l'initiation d'une cascade de signalisation intracellulaire dite « outside-in », responsable des phénomènes cellulaires liés à la réorganisation du cytosquelette d'actine comme l'étalement plaquettaire et la rétraction.

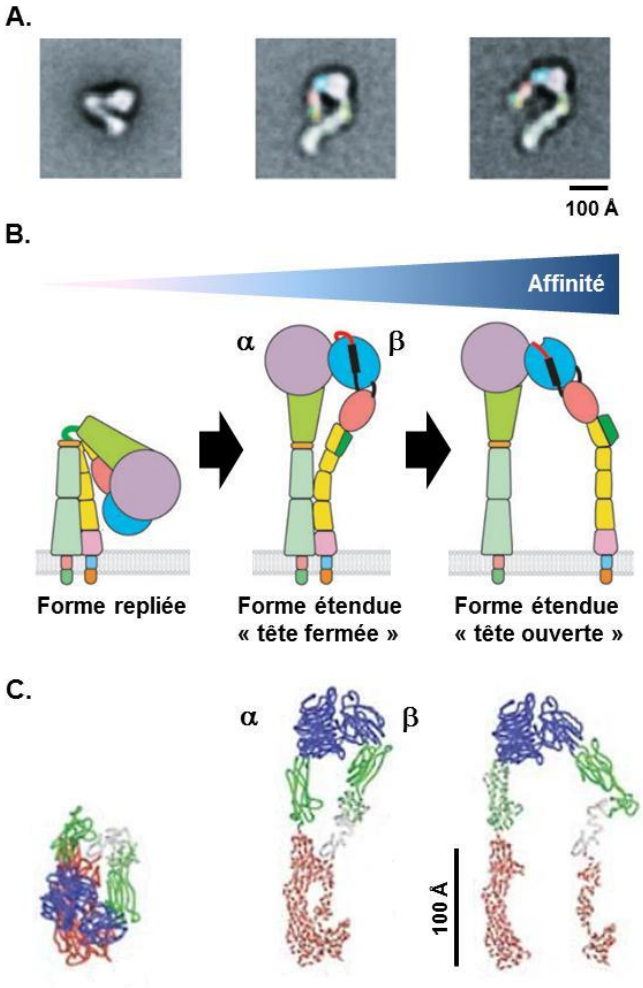

Figure 11 : Images de microscopie électronique à transmission (A), schématisation (B) et diagramme en ruban (C) des conformations adoptées par le domaine extracellulaire des intégrines
Adapté de Xiao T. (41) **et Luo B.H.** (42)

- $\alpha_2\beta_1$

L'intégrine $\alpha_2\beta_1$ est un récepteur important du collagène présent à la surface des plaquettes avec une expression allant de 2000 à 4000 copies par plaquette (43). L'$\alpha_2\beta_1$ est d'ailleurs considérée comme le principal récepteur responsable de l'adhérence stable des plaquettes au collagène (44). Les travaux de Moroi *et al.* (45) ont permis de démontrer que l'affinité pour le collagène de l'intégrine $\alpha_2\beta_1$ était régulée par une signalisation « inside-out » induite par des agonistes plaquettaires comme l'ADP, le thromboxane ou encore par des stimuli spécifiques de la GPVI. L'$\alpha_2\beta_1$ est également capable d'induire une signalisation « outside-in » aboutissant à un étalement plaquettaire (46).

- $\alpha_{IIb}\beta_3$

L'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ (GPIIbIIIa ; CD41/61) est exprimée exclusivement par la lignée mégacaryocytaire, et constitue le récepteur plaquettaire le plus abondant avec une expression de 80 000 copies à la surface de chaque plaquette auquel s'ajoute un pool intracellulaire qui sera exprimé à la surface cellulaire après activation plaquettaire (47).

Son ligand principal est le fibrinogène, glycoprotéine de 340kDa composée de trois paires de chaines polypeptidiques homologues Aα, Bβ et γ. La thrombine, produit des réactions de coagulation, clive le fibrinogène (soluble) générant des monomères de fibrine qui seront polymérisés en fibres de fibrine (insoluble). L'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ est également capable de lier d'autres protéines possédant une séquence RGD comme le VWF, la fibronectine et la vitronectine. En présence d'un flux sanguin faible, l'$\alpha_{IIb}\beta_3$ participe au recrutement des plaquettes au niveau du site de lésion par liaison avec le fibrinogène du sous-endothélium (48). L'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ est surtout le support de l'agrégation plaquettaire, que nous détaillerons dans le paragraphe « 1.3.2 : Agrégation plaquettaire ». Une signalisation « inside-out » entraine le changement de conformation de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ qui peut alors lier le fibrinogène plasmatique - dimérique - permettant le pontage et l'agrégation plaquettaires.

D'autres interactions ligands/intégrines renforcent encore l'adhésion plaquettaire : la fibronectine interagit par exemple avec l'intégrine $\alpha_5\beta_1$, les laminines avec l'intégrine $\alpha_6\beta_1$.

1.3.1.2. Voies de signalisation impliquant les agonistes solubles

L'activation plaquettaire initiée par l'adhésion plaquettaire est ensuite renforcée par la synthèse et la sécrétion d'agonistes solubles qui agissent principalement via les récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G (RCPG) présents à la membrane des plaquettes. Parmi les récepteurs plaquettaires aux agonistes solubles les plus importants, nous comptons :

- les récepteurs à la thrombine : PAR1 et PAR4
- les récepteurs à l'ADP : P2Y1 et P2Y12
- les récepteurs au thromboxane A2 (TXA2) : TPα
- les récepteurs à l'épinéphrine (adrénaline)
- les récepteurs à la sérotonine (5-HT)

Les RCPG constituent la plus large famille de protéines du génome humain (49,50). Ces récepteurs sont composés de sept domaines transmembranaires couplés à des protéines G qui représentent les principaux effecteurs des RCPG et répondent toutes à un même mécanisme d'activation. Ces protéines héterotrimériques sont composées de deux sous-unités : α et β/γ. La sous unité $G\alpha$ supporte une activité GTPasique et module ainsi l'action des effecteurs enzymatiques situés en aval. A l'état inactif, cette sous-unité $G\alpha$ est liée à une molécule de GDP (guanosine diphosphate). Lors de l'activation du récepteur par son ligand, la sous-unité $G\alpha$ échange son GDP en GTP (guanosine triphosphate) et se dissocie du complexe β/γ pour aller interagir avec ses protéines cibles en aval (26) comme la PLC, la PI3K ou certaines récepteurs canaux. L'hydrolyse du GTP en GDP vient terminer le cycle, mettant fin au signal d'activation. Le complexe $G\alpha\beta\gamma$ se recompose, stabilisant la liaison du GDP au niveau de la sous-unité $G\alpha$.

Les plaquettes expriment plusieurs sous familles de protéines G (G_q, $G_{12/13}$, G_i/G_z et G_s) qui diffèrent par la nature de la sous-unité $G\alpha$ et possèdent chacune des effecteurs spécifiques (26). Elles sont toutes couplées aux récepteurs activateurs des plaquettes à l'exception de la G_s qui génère un signal inhibiteur.

a) Les récepteurs à la thrombine : PAR1 et PAR4

La thrombine est un puissant agoniste plaquettaire via sa liaison aux RCPG de la famille PAR (Protease-activated receptor) : PAR1 et PAR4. La thrombine possède un mécanisme d'action particulier : en clivant l'extrémité extracellulaire N-terminale de son récepteur, elle démasque une nouvelle extrémité N-terminale servant de ligand captif qui se replie et joue le rôle d'auto-agoniste *(Figure 12)* (51). PAR1, récepteur de forte affinité, induit une activation plaquettaire en réponse à de faibles concentrations de thrombine ; contrairement à PAR4 qui nécessite de fortes concentrations de ligand (52). PAR1 et PAR4 sont couplés aux protéines G $G_{12/13}$ et G_q qui activent la PLCβ, la PI3K et les petites protéines G Rho et Ras (52,53) . PAR1 est également couplé à la protéine G_i inhibant l'adénylate cyclase (54). Cette signalisation complexe induit, en aval, l'activation des PKCs, la mobilisation du calcium intracellulaire entrainant l'activation des intégrines, la sécrétion granulaire, la synthèse du TXA2, le changement de forme des plaquettes et l'agrégation plaquettaire (52,54).

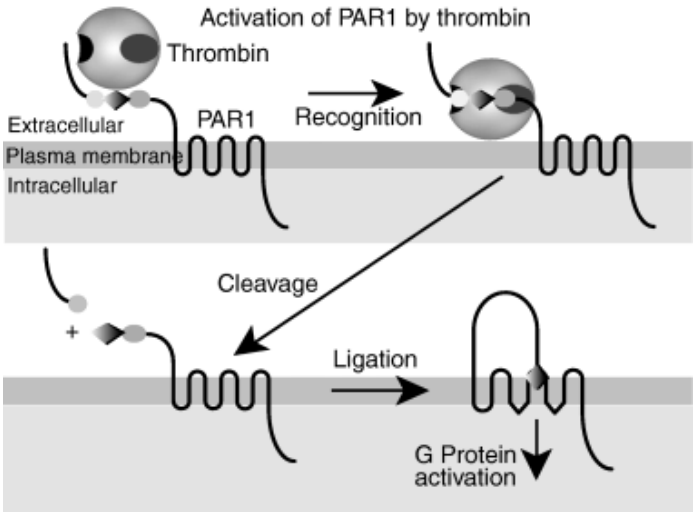

Figure 12 : Schématisation de l'activation des récepteurs PARs
D'après Coughlin S.R. (51)

b) Les récepteurs à l'ADP : P2Y1 et P2Y12

L'ADP, présent en forte concentration dans les granules denses plaquettaires, est sécrété lors de l'activation plaquettaire qu'il amplifie via sa liaison à ses récepteurs P2Y1 et P2Y12 couplés respectivement aux protéines G_q et G_i (55). Notons que la libération d'ADP par les globules rouges lors d'un lésion vasculaire n'est pas négligeable dans l'amplification de l'activation plaquettaire (56).

Le récepteur P2Y1 est présent à la surface plaquettaire mais aussi sur les membranes des granules α et du SCO. Il joue un rôle essentiel dans l'initiation de la réponse à l'ADP. P2Y1 est couplé à la protéine G_q responsable de l'activation de la PLCβ qui conduit, via la libération d'IP3, à l'élévation du calcium intracytosolique. Cette signalisation conduit au changement de forme des plaquettes et à une agrégation plaquettaire faible et transitoire *(Figure 13)* (57).

P2Y12 est présent sous forme d'homo-oligomère à la membrane plaquettaire. Il est couplé à une protéine G de la famille G_i qui active les PI3K β et γ (58,59) et inhibe l'adénylate cyclase (AC) diminuant ainsi la concentration d'AMPc (adénosine 3',5'-monophosphate cyclique) intra-cytoplasmique (57), puissant inhibiteur plaquettaire. L'ensemble de ces signaux intracellulaires aboutit à l'activation des intégrines et à l'agrégation plaquettaire. P2Y12 est responsable de l'amplification de l'agrégation plaquettaire induite par P2Y1 en réponse à l'ADP mais intervient aussi dans l'amplification de la réponse plaquettaire induite par d'autres agonistes comme le TXA2, la thrombine et le collagène (57). L'inhibition du P2Y12

est classiquement utilisée en thérapeutique en prévention des évènements athérothrombotiques.

La co-stimulation des récepteurs P2Y1 et P2Y12 est nécessaire pour induire une agrégation normale en réponse à l'ADP (60).

Un autre récepteur des nucléotides adényliques est également présent à la surface plaquettaire : le P2X1. Contrairement à P2Y1 et P2Y12, P2X1 n'est pas un RCPG mais un récepteur canal stimulé par l'ATP. Il est responsable d'un influx rapide de Ca^{2+} entrainant notamment une dépolarisation membranaire. La stimulation de ce récepteur par l'ATP entraine un changement de forme des plaquettes mais n'est pas capable d'induire une agrégation plaquettaire (61). Il joue cependant un rôle dans l'amplification de l'agrégation induite par d'autres agonistes comme le collagène et la thrombine.

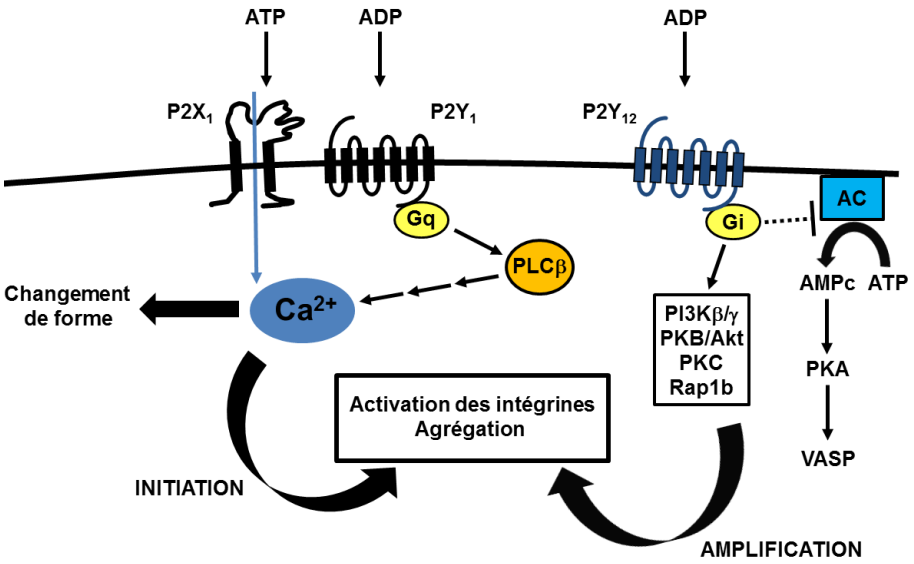

Figure 13 : Représentation schématique de l'activation plaquettaire induite par l'ADP et l'ATP D'après Schaff M. (62)

c) Les récepteurs au thromboxane A2 (TXA2) : TPα

Les plaquettes activées synthétisent du TXA2 à partir des phospholipides membranaires. En effet, l'activation des plaquettes stimule les phospholipases A2 (PLA2) qui libèrent par hydrolyse enzymatique de l'acide arachidonique à partir des glycérophospholipides membranaires. L'acide arachidonique peut ensuite subir des biotransformations, notamment son oxydation par la cyclooxygénase 1 (COX-1) qui génère de la prostaglandine G2 (PGG2) puis de la prostaglandine H2 (PGH2), ensuite convertie en TXA2 par la thromboxane synthétase *(Figure 14)*.

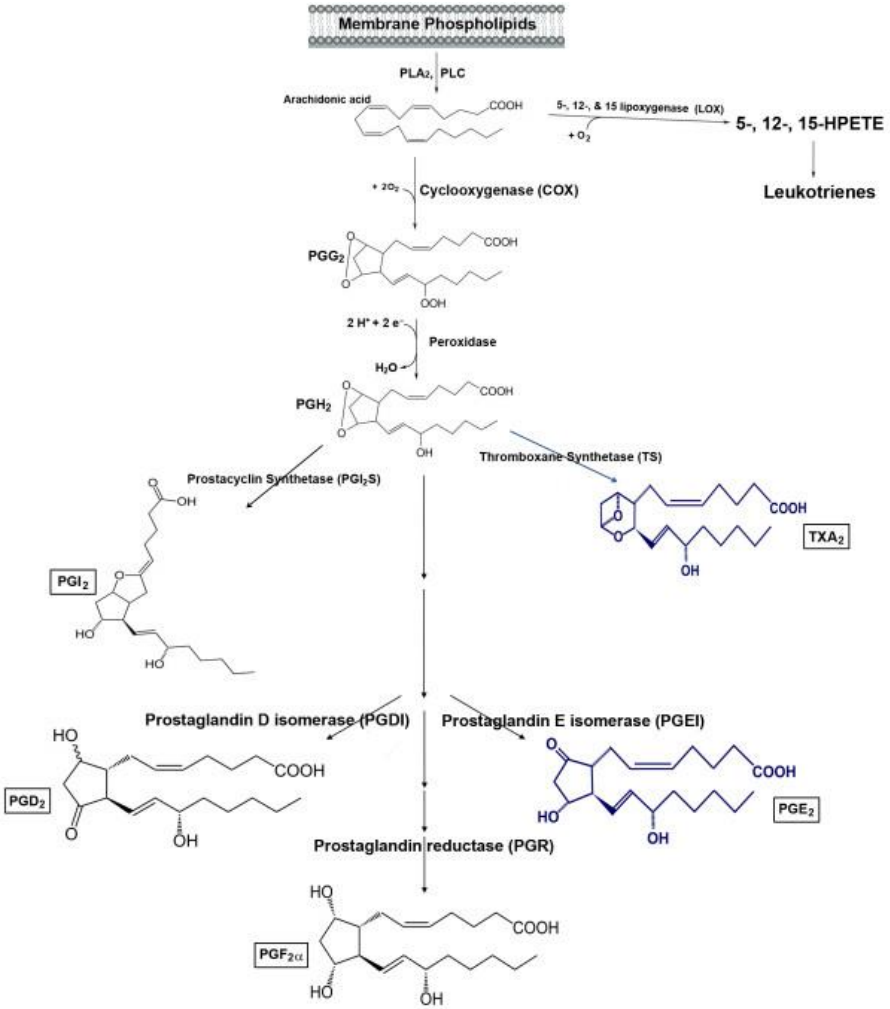

Figure 14 : Représentation schématique du métabolisme de l'acide arachidonique
D'après Ting H. (63)

Le TXA2 - très lipophile - diffuse rapidement à l'extérieur des plaquettes, entraine une vasoconstriction locale et se lie à son récepteur plaquettaire TPα (Thromboxane/prostaglandin α), un RCPG couplé aux protéines $G\alpha_q$ et $G\alpha_{12/13}$ (64). La stimulation du récepteur TPα conduit à la mobilisation du Ca^{2+} intracellulaire, à l'activation des PKC, des PI3K β/γ et de petites protéines G des familles Rho et Ras (64,65). Cette signalisation entraine la sécrétion des granules plaquettaires, le changement de forme des plaquettes et l'activation des intégrines ; amplifiant ainsi fortement l'activation plaquettaire. La COX-1 est la cible de l'Aspirine®, antiagrégant plaquettaire qui constitue un traitement anti-thrombotique de référence.

d) Les récepteurs à l'épinéphrine (adrénaline)

La liaison de l'épinéphrine à son récepteur α2A-adrénergique entraine l'activation de la voie Gz, aboutissant à l'inhibition de l'adénylate cyclase (66). L'épinéphrine est considérée comme un agoniste plaquettaire faible incapable d'induire un changement de forme des plaquettes. En revanche, elle potentialise les effets des autres agonistes plaquettaires via sa capacité à inhiber la formation d'AMPc.

e) Les récepteurs à la sérotonine (5-HT)

La sérotonine ou 5-hydroxytryptamine (5-HT) est stockée dans les granules denses plaquettaires (67). Elle est sécrétée par les plaquettes lors de l'activation plaquettaire. Sa liaison à son récepteur est capable d'induire une agrégation plaquettaire.

1.3.1.3. Voies d'inhibition de l'activation plaquettaire

Parallèlement à ces voies d'activation, les plaquettes possèdent des mécanismes de régulation négative. Ces voies d'inhibition passent essentiellement par la mise en jeu de la guanylate cyclase soluble (GCs), stimulée par le monoxyde d'azote (NO) ; de l'adénylate cyclase : adénosine via le récepteur A2a (68), PGE1 et PGI2 (69) via le récepteur IP ; et d'immunorécepteurs contenant des motifs ITIM (Immunoreceptor tyrosine based inhibition motif) comme PECAM-1 (Platelet/endothelial cell adhesion molecule-1) (70). L'élévation de la concentration intracellulaire des nucléotides cycliques s'oppose à l'effet de l'ADP via son récepteur P2Y12.

La *figure* suivante schématise les différentes voies de signalisation impliquées dans l'activation plaquettaire :

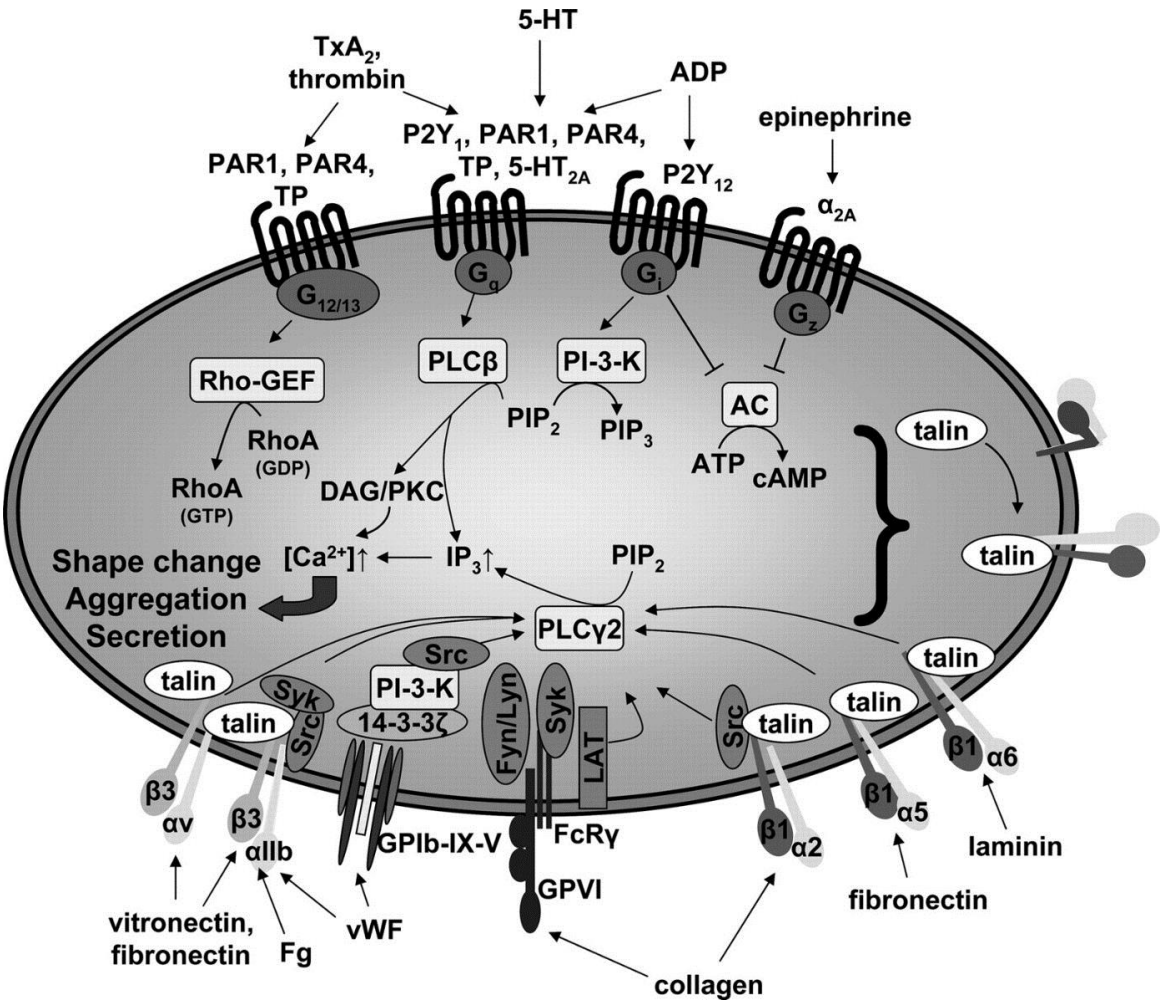

Figure 15 : Représentation schématique des voies de signalisation impliquées dans l'activation plaquettaire

D'après Varga-Szabo D. (43)

1.3.2. Agrégation plaquettaire

1.3.2.1. Signalisation « inside-out » de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$

a) Voies de signalisation « inside-out » impliquées dans l'agrégation plaquettaire

Les plaquettes activées vont ensuite agréger entre elles pour former le clou hémostatique. L'agrégation plaquettaire requière l'activation de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$, déclenchée par la signalisation en aval des récepteurs plaquettaires stimulés par les agonistes solubles ou les récepteurs adhésifs : on parle de signalisation « inside-out ». Elle représente l'ensemble des évènements intra-cytoplasmiques en réponse à l'activation des récepteurs de surface qui aboutissent au changement de conformation de l'intégrine. En effet, lors de l'activation plaquettaire, l'hydrolyse par les PLC du PIP2 génère de l'IP3 et du DAG. L'IP3 permet alors la mobilisation du calcium intracellulaire qui participe notamment au recrutement de la protéine CalDAG-GEFI, principal facteur d'échange de nucléotide à guanine de la petite GTPase monomérique Rap1b (71,72). L'activation de Rap1b permet sa liaison à la protéine adaptatrice RIAM (Rap1-GTP-interacting adaptor molecule) et favorise l'association de la taline et de la kindline-3 avec la partie intracellulaire de la chaine β_3 de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$, entrainant ainsi son activation (73,74). L'intégrine activée change de conformation, peut alors fixer de manière affine le fibrinogène créant des ponts entre les plaquettes activées et entrainant le recrutement de plaquettes supplémentaires.

b) CalDAG-GEFI : nœud de signalisation intra-plaquettaire

- **Protéine CalDAG-GEFI : gène, expression, structure, fonction**

La protéine CalDAG-GEFI est codée par le gène *RASGRP2 (Ras Guanyl Releasing Protein 2)*, situé sur le chromosome 11 en position q13. Elle est exprimée principalement dans le cerveau au niveau du striatum et dans les lignées hématopoïétiques : dans les mégacaryocytes et les plaquettes ainsi que dans les polynucléaires neutrophiles. En tant que facteur d'échange de nucléotide à guanine (GEF), elle régule l'activation de petites GTPases de la famille Ras, leur permettant de passer d'une forme inactive, GDP-liée, à une forme active, liant le GTP. Cette action est contrebalancée par les GTPase activating proteins (GAP), qui catalysent l'hydrolyse des GTP en GDP *(Figure 16)*.

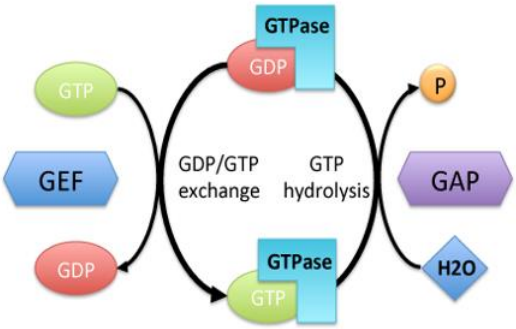

Figure 16 : Représentation schématique du cycle des GTPases

Cette protéine de 609 acides aminés comprend : *(Figure 17)*

- un domaine REM (Ras exchange motif) en position N-terminale, supportant la fonction d'échange GTP/GDP
- un domaine catalytique CDC25
- deux domaines répétés « EF hand » de forte affinité pour le calcium
- un domaine C1 en position C-terminale, atypique car de faible affinité pour le DAG

Figure 17 : Représentation schématique de la structure de CalDAG-GEFI

- **CalDAG-GEFI et signalisation plaquettaire**

L'implication de CalDAG-GEFI dans la signalisation plaquettaire a été démontrée pour la première fois en 2002, lorsqu'une étude a montré que le niveau d'expression de CalDAG-GEFI était corrélé à l'activation de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ dans les mégacaryocytes. L'invalidation du gène sur un modèle murin a permis par la suite de confirmer l'importance de CalDAG-GEFI dans l'activation de Rap1 et de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ dans les plaquettes (72,75).

Au cours de la signalisation « inside-out », CalDAG-GEFI est recrutée à la membrane lors d'une stimulation plaquettaire et impliquée dans les phénomènes d'activation rapide en réponse à des doses d'agonistes faibles ou intermédiaires. Elle est le principal facteur d'échange de la petite GTPase monomérique Rap1b (71,72). Elle permet ainsi la liaison du GTP à Rap1b, laquelle induit un changement structural de Rap1b (76) et sa liaison à des

effecteurs dont la protéine RIAM (Rap1-GTP-interacting adaptor molecule) (*Figure 18)*. Très récemment, l'équipe de Bergmeier *et al* (77) a identifié RASA3 comme étant la GAP capable de contrebalancer l'activation plaquettaire induite par CalDAG-GEFI chez la souris.

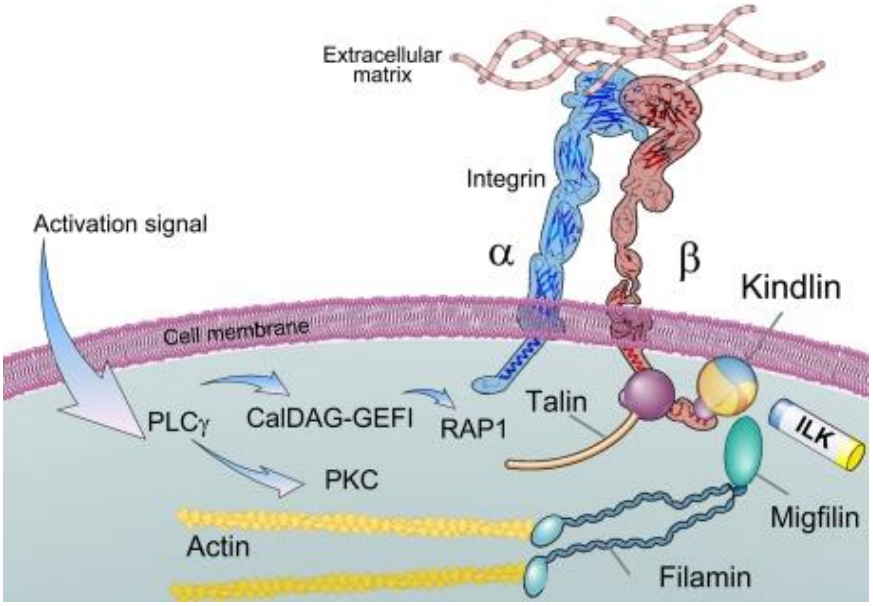

Figure 18 : Représentation schématique de la signalisation « inside-out » de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ D'après Malinin NL (78)

Cette signalisation « inside-out » favorise l'interaction entre la taline, la kindline et l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ responsable du changement conformationnel de l'intégrine qui peut alors lier le fibrinogène créant des ponts inter-plaquettaires conduisant à l'agrégation et à la formation du thrombus plaquettaire.

La protéine CalDAG-GEFI est responsable de l'activation rapide, transitoire et calcium-dépendante de Rap1b et donc de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ (77,79). A fortes doses d'agonistes, CalDAG-GEFI peut être contournée par l'activation d'une protéine kinase C (PKC), qui représente donc une voie de substitution (80) *(Figure 19)*. Le mécanisme d'activation de Rap1b dépendant de cette voie PKC reste encore peu connu.

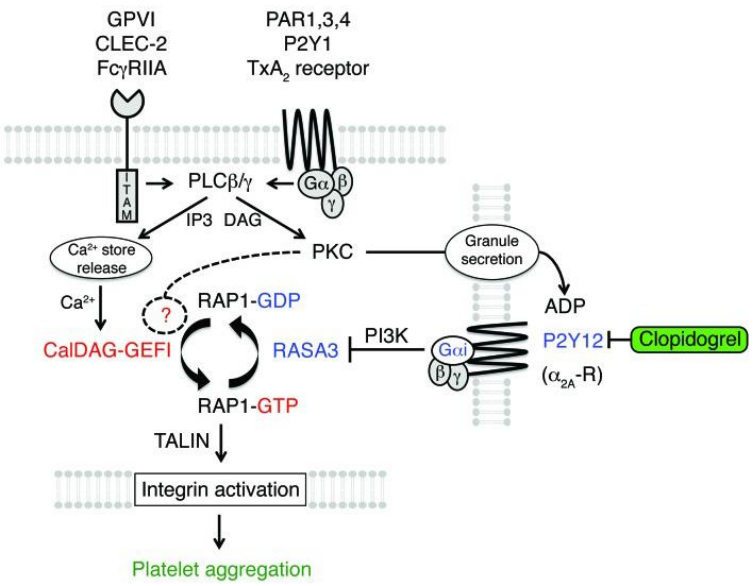

Figure 19 : Régulation de l'activation de Rap1b dans les plaquettes
D'après Stefanini L. (77)

1.3.2.2. Signalisation « outside-in » de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$

L'intégrine activée est capable, après interaction avec son ligand, de déclencher une signalisation intracellulaire qualifiée d'« outside-in » qui conduit à l'adhésion stable, à l'étalement, puis à la rétraction plaquettaire. La liaison du fibrinogène par les intégrines va promouvoir leur regroupement à la surface plaquettaire ou « clustering », pour former des adhérences focales regroupant protéines de signalisation et composants du cytosquelette (81). Ainsi, l'interaction du fibrinogène avec l'$\alpha_{IIb}\beta_3$ entraine la phosphorylation de nombreuses protéines tyrosines kinases telles que c-Scr, Syk et Fyn (80,82) ; l'activation du métabolisme des phosphatidyls inositols et la mobilisation du calcium intracellulaire (83).

La signalisation « outside-in » conduit à l'étalement plaquettaire avec émission de filopodes puis formation de lamellipodes qui sont les conséquences de la réorganisation du cytosquelette d'actine (84) *(Figure 20)*.

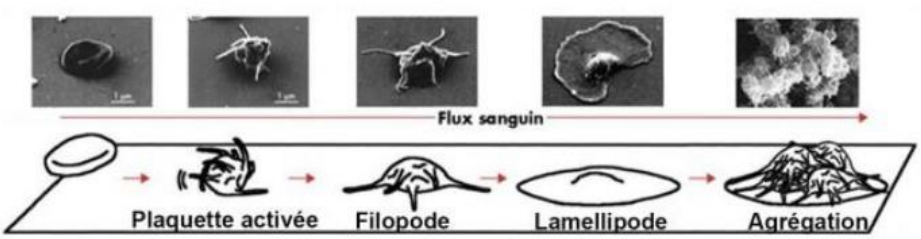

Figure 20 : Représentation schématique des stades de l'étalement plaquettaire
D'après Bouaouina M. (84)

La *figure* suivante schématise les voies de signalisations « inside-out » et « outside-in » de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$.

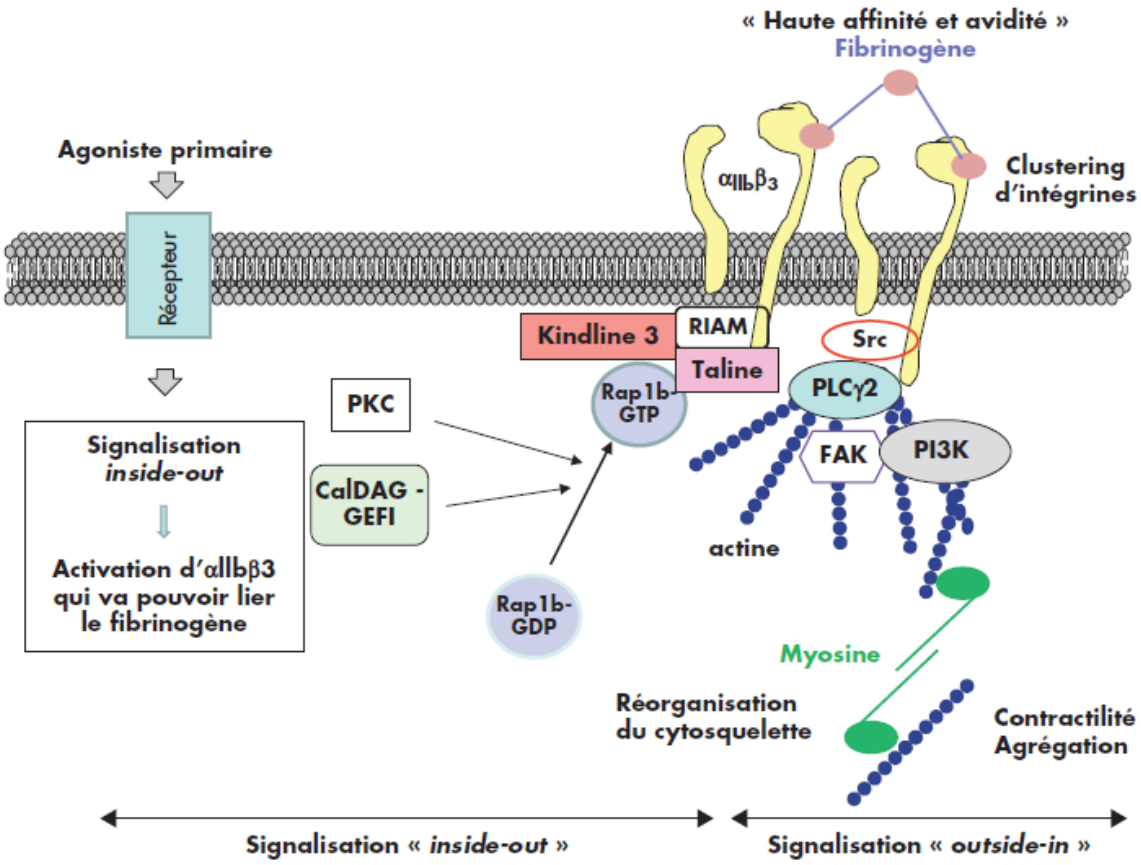

Figure 21 : Représentation schématique des signalisations « inside-out » et « outside-in » de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$

L'activation des récepteurs de surface déclenche un certain nombre de voies de signalisation aboutissant au changement conformationnel de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ (signalisation « inside-out ») qui peut alors fixer le fibrinogène, créant des ponts entre les plaquettes et permettant ainsi l'agrégation plaquettaire. L'intégrine va alors déclencher une signalisation « outside-in » responsable de l'activité contractile des plaquettes, la croissance et la stabilité du thrombus plaquettaire. (FAK: Focal Adhesion kinase; SHIP1: Src homology 2 (SH2) domain-containing inositol 5-phosphatase 1)

D'après Payrastre B. (85)

2. Outils diagnostiques

Nous aborderons dans ce chapitre les différentes techniques d'exploration biologique des fonctions plaquettaires. La place relative de chacun de ces tests dans l'exploration des thrombopathies sera détaillée dans le chapitre « 3.1 Stratégies diagnostiques ».

2.1. Préanalytique

La qualité de la phase préanalytique est cruciale dans l'exploration biologique plaquettaire. Idéalement, le patient doit s'abstenir de fumer et de consommer de la caféine le jour du prélèvement. De nombreux médicaments peuvent perturber les fonctions plaquettaires, les anti-inflammatoires non stéroïdiens doivent notamment être arrêtés 10-15 jours avant le bilan biologique et le recueil complet des médicaments pris par le patient au cours des dix derniers jours est essentiel à la bonne interprétation des résultats. En pratique clinique, il demeure difficile de contrôler ces variables patient-dépendant. Une approche pragmatique consiste à réaliser néanmoins ces tests biologiques et, en cas d'anomalie, à recontrôler les résultats sur de nouveaux prélèvements répétés dans de meilleures conditions.
La phase prénanalytique de l'exploration plaquettaire fait l'objet de recommandations du BCSH (British Society for Haematology) (86):

- Recueil complet des médicaments pris par le patient et/ou ou les témoins
- Recueil du sang par une technique standardisée, atraumatique limitant la stase sanguine (ponction veineuse franche)
- Utilisation d'une aiguille d'un diamètre de 19-21g pour le prélèvement sanguin
- Ecart des 3 à 5 premiers mL de sang prélevés pour les explorations fonctionnelles
- Collecte du sang dans des tubes citratés contenant 105-109mM de citrate de sodium pour les examens d'hémostase
- Maintien des prélèvements à température ambiante
- Maintien des tubes en position verticale, bouchés, sans agitation excessive
- Réalisation des examens dans les 30min à 4h suivant le prélèvement

2.2. Numération plaquettaire et microscopie optique

La numération plaquettaire, aujourd'hui largement automatisée, est réalisée sur sang anticoagulé par EDTA (éthylène diamine tétra-acétique). Le taux normal de plaquettes dans le sang est compris entre 150 et 400G/L, avec un volume plaquettaire moyen (VPM) de 8 à 11fL. Les automates utilisent différentes technologies pour effectuer cette numération, parfois de façon combinée: l'impédance (par exemple K-1000, XE 2100 et XN, Sysmex; LH750, Beckman Coulter), l'analyse optique (Advia 120 et ADVIA 2120, Bayer; Cell-Dyn 4000, Abbott ; XE 2100 et XN, Sysmex) ou encore la détection immunologique (Cell-Dyn 4000, Abbott) (87,88).

Les automates présentent des performances inégales ; le comptage par impédance a des limites car l'analyse de la taille des cellules ne permet pas de discriminer les plaquettes d'autres particules de taille similaire (89), et rencontre ainsi des difficultés pour compter les plaquettes de taille augmentée ou encore pour distinguer les microcytes. La méthode optique est plus performante en cas de macrothrombocytopénie. Le comptage par méthode immunologique, à l'aide d'anticorps spécifiques dirigés contre les plaquettes (anticorps anti CD41/CD61), est limité en raison de son coût élevé, bien qu'il constitue la méthode de référence (90).

La numération plaquettaire et le volume plaquettaire moyen permettent déjà d'orienter le diagnostic ; en effet, certains thrombopathies s'accompagnent d'une tendance thrombopénique et/ou d'une micro ou macrocytose plaquettaire.

Certains automates de numération proposent désormais une évaluation quantitative des plaquettes immatures (IPF : immature platelet fraction), communément appelées plaquettes réticulées par analogie aux réticulocytes, les hématies immatures. Elles correspondent aux plaquettes les plus jeunes contenant encore de l'ARN et des ribosomes ; leur taux est un indicateur des capacités de régénération médullaire des plaquettes. Pour l'heure, aucune étude ne propose de corrélation entre la numération des plaquettes réticulées et les différents sous-types de thrombopathies congénitales. Néanmoins, plusieurs études ont montré l'intérêt de l'utilisation de l'IPF dans le diagnostic et le suivi des thrombopénies par destruction périphérique comme le purpura thrombopénique idiopathique (PTI) (91–93). Il a également été montré que les plaquettes réticulées, au potentiel prothrombotique supérieur à celui des plaquettes matures, conditionnent la réponse plaquettaire aux thienopyridines comme le prasugrel ou le clopidrogel chez les patients atteints de syndrome coronarien aigu (94–97).

Un contrôle microscopique sur étalement coloré au May-Grunwald-Giemsa est réalisé systématiquement en cas d'anomalie du compte plaquettaire ou du volume moyen calculé. Il permettra de confirmer ou non la numération plaquettaire obtenue par l'automate, et notamment de s'assurer de la réalité d'une thrombopénie en vérifiant sur le frottis sanguin l'absence d'amas plaquettaire : pseudothrombocytopénie liée à l'EDTA avec agglutination plaquettaire *in vitro* responsable d'une sous-estimation de la numération plaquettaire *(Figure 22)*.

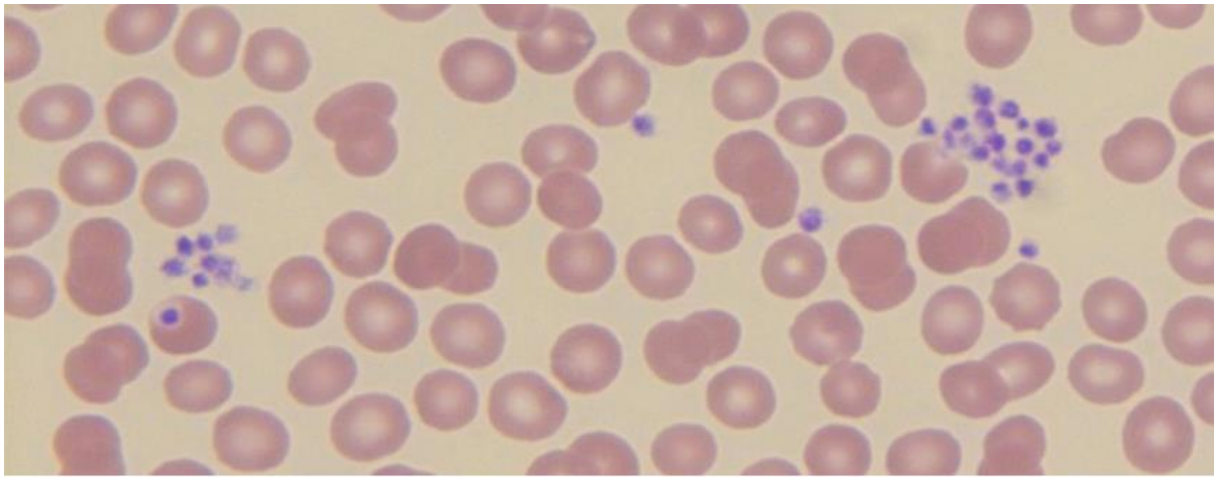

Figure 22 : Photographie d'un frottis sanguin en microscopie optique présentant des amas plaquettaires

Les pseudothrombocytopénies dues au satellitisme plaquettaire autour des polynucléaires neutrophiles, aux agglutinines froides antiplaquettaires, ou encore à la présence de plaquettes géantes sont plus rares et doivent être également écartées par contrôle du frottis sanguin. Enfin, l'observation microscopique permet également d'apprécier la morphologie plaquettaire et celles des autres lignées cellulaires, pouvant dans certains cas orienter le diagnostic. Ainsi, la présence d'inclusions basophiles dans les polynucléaires neutrophiles (pseudo corps de Döhle) oriente vers un syndrome MYH9, la présence de plaquettes très pâles vers un syndrome des plaquettes grises, … Ces arguments cytologiques orientant le diagnostic seront discutés dans le chapitre «3.2 Classification des principales thrombopathies constitutionnelles ».

2.3. Microscopie électronique

L'observation plaquettaire en microscopie électronique permet d'évaluer l'ensemble de l'ultrastructure plaquettaire.

La microscopie électronique à transmission (MET) permet d'examiner des coupes cellulaires et de mettre en évidence des déficits quantitatifs en granules α ou denses ainsi que les principales anomalies des structures internes plaquettaires. Cette technique est le test de référence pour le diagnostic du Syndrome des plaquettes grises, thrombopathie dans laquelle les plaquettes sont dépourvues de granules α, remplacées le plus souvent par des structures membranaires vides de matériel ou vacuoles *(Figure 23)*. En MET, les granules α sont relativement opaques aux électrons, surtout en leur centre où est souvent objectivé un matériel plus dense (ou noyau) correspondant à une très forte concentration de protéines. Les granules denses sont quant à eux caractérisées par la présence d'un noyau dense intensément opaque entouré par un espace clair et une seule membrane.

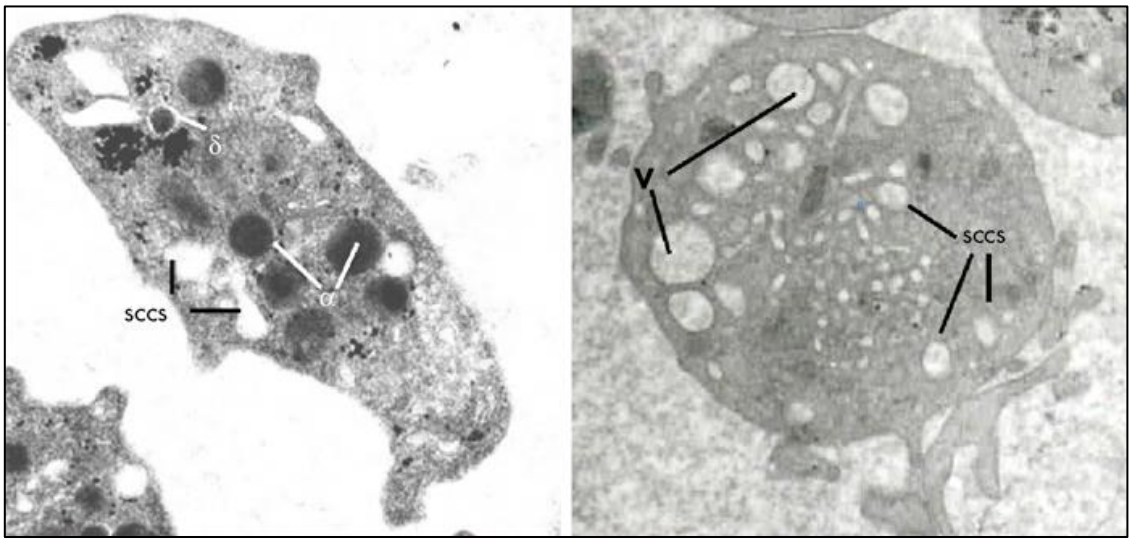

Figure 23 : Images de microscopie électronique présentant l'ultrastructure plaquettaire

(Gauche) : Ultrastructure d'une plaquette normale. Les granules α sont distribués de façon régulière dans le cytoplasme ; on retrouve également un granule dense avec une image de noyau dense aux électrons séparé de la membrane granulaire par un croissant blanc typique et le SCCS (système canaliculaire connecté à la surface) représenté par des vacuoles plus claires.

(Droite) : Ultrastructure d'une plaquette d'un sujet porteur du Syndrome des plaquettes grises. Les granules α sont absents, en revanche de nombreuses vacuoles notées V au contenu plus ou moins clair sont visibles. On retrouve le SCCS et un granule dense.

D'après Rosa J.P. (98)

La microscopie électronique à balayage (SEM) permet quant à elle de visualiser la surface plaquettaire et en particulier d'étudier leur changement de forme, l'émission de filopodes et leur étalement.

Enfin, la technologie Dual Beam combine la microscopie électronique à balayage et la microscopie ionique, permettant d'effectuer la reconstitution de plaquettes et de mégacaryocytes en trois dimensions. Cette technique associe un faisceau focalisé d'ions réalisant des coupes ultrafines et la technologie d'un microscope électronique à balayage permettant une acquisition numérique de chacune des coupes obtenues. Le traitement des images obtenues permettra la reconstitution des cellules en trois dimensions.

2.4. Immunofluorescence

Directement sur le frottis sanguin fixé, l'utilisation d'anticorps spécifiques couplés à des fluorochromes permet la mise en évidence de nombreux récepteurs ou molécules plaquettaires. Le frottis sera ensuite observé à l'aide d'un microscope à fluorescence. Cette technique est applicable au dépistage des déficits en certains récepteurs (intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ par exemple) ou encore de certaines anomalies de l'ultrastructure plaquettaire (défauts de granules α ou denses, tubuline, myosine). Les granules α sont visualisés après marquage du VWF ou de la P-selectine ; les granules denses par marquage du CD63 ou de LAMP2. Pour le dépistage des syndromes MYH9, l'utilisation d'un anticorps anti-myosine 2A permettra de mettre en évidence des amas de myosine dans les polynucléaires neutrophiles chez les sujets atteints. Un immunomarquage anormal permettra d'orienter la réalisation de tests spécialisés plus sensibles et plus spécifiques.

2.5. Tests globaux d'exploration de l'hémostase primaire

Aucun de ces tests n'étant spécifique des fonctions plaquettaires, une exploration préalable du VWF, acteur majeur de l'hémostase primaire, est indispensable à leur interprétation.

2.5.1. Temps de saignement

Le temps de saignement (TS), historiquement décrit par Milian en 1901, est le plus ancien test fonctionnel plaquettaire. Il s'agit d'un test global explorant l'hémostase primaire *in vivo*. Il consiste à mesurer le temps nécessaire à l'arrêt du saignement après incision superficielle de

la peau du patient. Plusieurs techniques peuvent être utilisées : l'épreuve de Duke par incision au niveau du lobe auriculaire ; la technique « Ivy trois points » ou encore la technique « Ivy-incision » au niveau de l'avant-bras. Les valeurs normales varient respectivement de 2 à 4 minutes, de 2 à 5 minutes et de 4 à 8 minutes selon la méthode utilisée. L'« Ivy incision », technique la plus couramment utilisée, consiste en une incision sur la face antérieure de l'avant-bras avec maintien d'une pression constante de 40mmHg au niveau du bras. L'écoulement sanguin est ensuite absorbé à l'aide d'un papier buvard toutes les 30 secondes (99).

Du fait de sa faible reproductibilité, sensibilité et spécificité mais également de son caractère invasif, il n'est aujourd'hui plus recommandé de le réaliser en pratique courante (86). En effet, l'analyse des recommandations en vigueur a montré que le TS n'est préconisé ni pour l'évaluation préopératoire du risque hémorragique, ni pour le diagnostic des anomalies de la fonction plaquettaire ou de la maladie de Willebrand. Il n'a donc plus sa place dans la stratégie diagnostique (99).

2.5.2. Temps d'occlusion plaquettaire

Le temps d'occlusion plaquettaire, mesuré par Platelet Fonction Analyzer (PFA-100® puis le PFA-200®) est également un test global d'exploration de l'hémostase primaire. A la différence du temps de saignement, le temps d'occlusion plaquettaire explore les fonctions plaquettaires *in vitro* (100), en simulant les conditions hémorrhéologiques rencontrées lors d'une brèche vasculaire dans la microcirculation. L'échantillon de sang total citraté est aspiré par un système de vide à travers un capillaire à des taux de cisaillement élevés (5000-6000s^{-1}). Le sang arrive par un orifice microscopique de 150µm de diamètre au travers d'une membrane de nitrocellulose biologiquement active recouverte de collagène et d'un autre agoniste plaquettaire, soit l'épinéphrine soit l'ADP. Au contact de la membrane, les plaquettes adhèrent, s'activent, sécrètent leur contenu plaquettaire et s'agrègent. Le PFA mesure le temps nécessaire pour que le clou plaquettaire occlue l'orifice de la membrane, appelé temps d'occlusion plaquettaire. Il représente la capacité hémostatique plaquettaire, c'est-à-dire la capacité d'un échantillon de sang à former un clou plaquettaire. Le système est composé d'un analyseur et de deux types de cartouches jetables qui diffèrent par les agonistes recouvrant la membrane : collagène/épinéphrine ou collagène/ADP.

Un allongement significatif du TO oriente vers une anomalie de l'hémostase primaire ; de ce fait, ce test est largement utilisé en pratique courante pour le dépistage des dysfonctions plaquettaires.

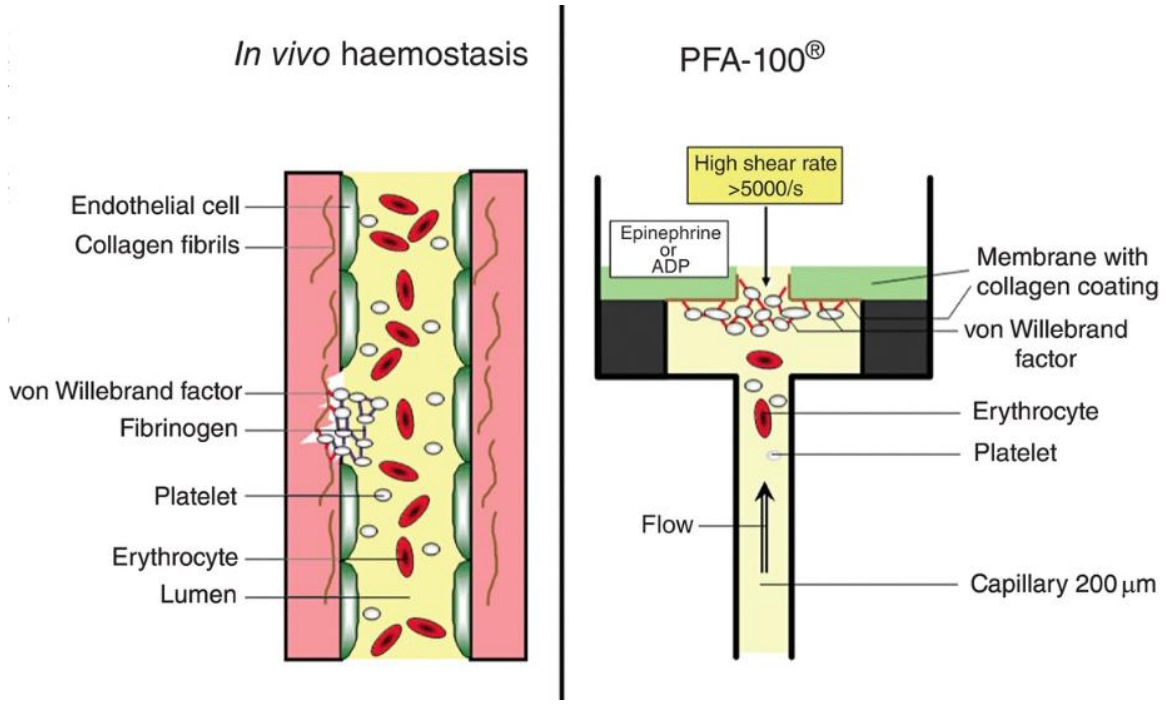

Figure 24 : Représentation schématique du système de mesure du temps d'occlusion plaquettaire PFA-100®

Le PFA étant un système hémodynamique, il est sensible à la réduction de la masse sanguine et à la diminution de la concentration plaquettaire. Un allongement du temps d'occlusion n'est spécifique d'une anomalie de l'hémostase primaire que si l'hématocrite est supérieur à 30% et le taux de plaquettes sanguines supérieur à 100G/L. L'Aspirine® et les AINS qui inhibent les fonctions plaquettaire en bloquant la COX-1 allongent le TO collagène/épinéphrine chez 95% des individus sains, alors qu'ils n'ont que peu d'effets sur le TO collagène/ADP (101,102).

Dans les thrombopathies congénitales, le TO varie avec la nature et la sévérité du défaut plaquettaire. Les thrombopathies sévères causées par exemple par un défaut quantitatif ou qualitatif en $\alpha_{IIb}\beta_3$ ou en GPIb-IX-V entraine un allongement notable du TO retrouvé avec les deux types de cartouches (103). Sa sensibilité ne dépasse pas les 80% pour le dépistage d'anomalies modérées de l'hémostase primaire (104). Notons d'ailleurs qu'il est insensible pour le dépistage de la maladie du pool vide (105). Un TO normal ne permet donc pas d'exclure une pathologie plaquettaire.

2.6. Agrégation plaquettaire

L'agrégométrie en transmission optique, développée indépendamment en 1962 par Born (106) et O'Brien (107), est considérée comme le « gold-standard » pour tester les fonctions plaquettaires. Elle est utilisée en routine dans le cadre de l'exploration des patients présentant des syndromes hémorragiques. Cette technique consiste à mesurer la transmission lumineuse à travers un échantillon de plasma contenant les plaquettes en suspension : PRP (plasma riche en plaquettes) ou plaquettes lavées, mises sous agitation à 37°C puis stimulées par un agoniste plaquettaire spécifique d'une voie d'activation entrainant leur agrégation ou agglutination. Cette transmission lumineuse augmente lorsque que les plaquettes agrègent entre elles sous l'effet de l'agoniste plaquettaire.

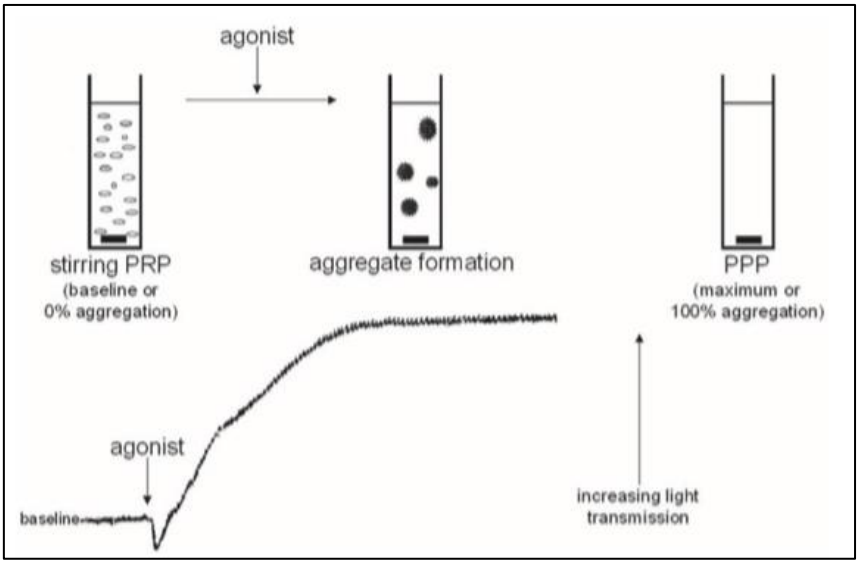

Figure 25 : Représentation de la réponse plaquettaire mesurée en agrégométrie

Les plaquettes en suspension dans le PRP empêchent la transmission lumineuse à travers l'échantillon. Après ajout d'un agoniste, les plaquettes agrègent entre elles entrainant une augmentation de la transmission lumineuse. La transmission maximale d'un échantillon est obtenue avec le PPP autologue.

D'après Michelson A. (108)

La réalisation de ce test fait l'objet de recommandations précises du SSC/ISTH (Scientific and Standardization Committee/International Society on Thrombosis and Haemostasis). Le PRP est obtenu par centrifugation des échantillons de sang citraté à 200-250g pendant 10 minutes sans freins, à température ambiante ; ou par sédimentation en cas de plaquettes géantes. La concentration plaquettaire du PRP ne doit pas être ajustée avec du plasma autologue pauvre

en plaquettes (PPP). L'interprétation des tests doit être prudente en cas de numération plaquettaire inférieure à 150G/L.

Un témoin doit systématiquement être testé en parallèle des patients. Le PRP et le PPP du patient sont utilisés pour définir respectivement le 0% et le 100% de transmission lumineuse sur l'agrégomètre. Après avoir contrôlé la ligne de base et l'absence d'agrégation spontanée, les agonistes plaquettaires sont ajoutés. Des courbes représentatives de la cinétique d'agrégation pour chaque agoniste sont alors obtenues. L'interprétation des tracés prend en compte tous les paramètres de la courbe : temps de latence, changement de forme des plaquettes, vitesse ou pente d'agrégation, amplitude maximale et stabilité de l'agrégation (réversibilité).

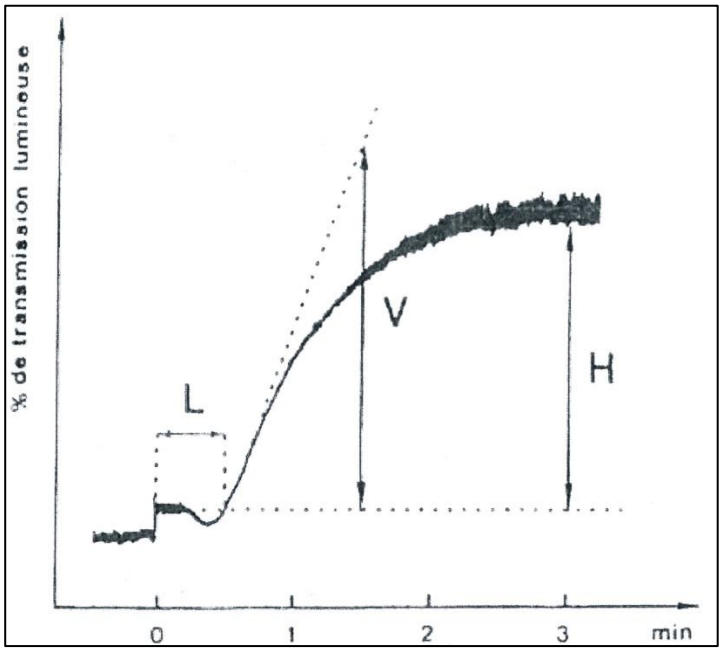

Figure 26 : Tracé typique d'agrégation des plaquettes en PRP en réponse au collagène

L représente le temps de latence ; V la vélocité et H l'amplitude d'agrégation. La diminution de la transmission lumineuse pendant le temps de latence correspond au changement de forme des plaquettes qui deviennent sphériques avant de s'agréger.

D'après Cazenave J.P. (109)

En cas d'agrégation anormale, des concentrations supérieures de l'agoniste sont testées. Les tracés d'agrégation doivent-être observés pendant au moins 5 minutes, de préférence 10 minutes.

Les agonistes plaquettaires (concentrations finales) testés en première intention sont :

- ADP : 2µM
- Epinephrine : 5µM
- Collagène (habituellement Horm) : 2µg/mL
- Acide arachidonique : 1mM
- Ristocétine, agent agglutinant : 1.2 et 0,5mg/mL

En fonction des défauts observés, d'autres agonistes ou antagonistes pourront se révéler d'intérêt pour affiner la caractérisation du défaut de signalisation (86) :

- TRAP, agoniste du récepteur PAR1/PAR4 à la thrombine : 10/100µM respectivement
- U46619, agoniste du récepteur du TXA2 : 1µM
- CRP (collagene-related peptide) : 10ng/mL
- Convulxine : 1ng/mL
- A23187, ionophore calcique : 1,25µM
- PMA : 30nM

Contrairement aux agonistes physiologiques, la convulxine et le CRP (collagen related peptide) liant la GPVI, ainsi que le phorbol myristate acétate (PMA) ne stimulent pas la phospholipase C. L'utilisation de la forskoline qui active l'adénylate cyclase indépendamment des protéines G pourra s'avérer utile pour caractériser les défauts de signalisation touchant l'AMPc.

Le *tableau* ci-après présente les récepteurs ciblés par les différents agonistes plaquettaires utilisés en agrégométrie (86).

Tableau 4 : Agonistes plaquettaires utilisés en agrégométrie et leur récepteur ou fonction plaquettaires cibles
D'après Harrison P. (86)

Agoniste	Récepteur ou fonction cibles
ADP	P2Y1 et P2Y12
Epinephrine	Récepteurs adrénergiques
Acide Arachidonique	Récepteur TX et test de la génération de thromboxane
Collagène	GPVI et intégrine $\alpha_2\beta_1$
U46619	Récepteur TPα du TXA2
TRAP	PAR-1 et PAR-4
Convulxine	GPVI
CRP	GPVI
Ionophore calcique A23187	Mobilisation calcique et fonction procoagulante
PMA	PKC
Ristocétine	GPIb/ VWF

La *figure* suivante illustre les tracés d'agrégation attendus chez un patient indemne de toute pathologie plaquettaire en réponse à différents agonistes recommandés.

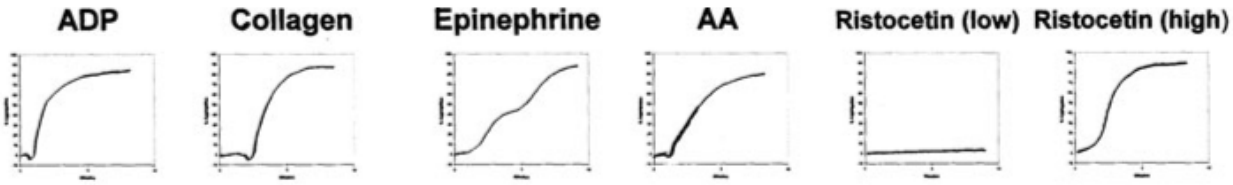

Figure 27 : Tracés d'agrégation d'un patient sain en réponse aux différents agonistes plaquettaires
Le 0% a été établi avec le PRP non dilué et le 100% avec du PPP autologue Les agonistes plaquettaires suivant (concentrations finales) ont été utilisés : 10µM d'ADP, 2µg/mL de collagène, 5µM d'épinéphrine, 1mM d'acide arachidonique, et de faibles (0,5-0,7mg/mL) et fortes (1,2-1,5mg/mL) doses de ristocétine. L'agrégation plaquettaire a été enregistrée pendant 10 minutes.
D'après Harrison P. (86)

Notons qu'outre l'exploration des fonctions plaquettaires, l'agrégométrie est également utile à l'étude du facteur von Willebrand et au diagnostic biologique des thrombopénies induites par l'héparine (TIH).

La mesure de l'agrégation plaquettaire peut également être réalisée par impédance (110). L'analyseur Multiplate® ou multiple platelet function analyser (Roche Diagnostics France) évalue en sang total l'augmentation de la résistance électrique due à l'accumulation des plaquettes sur des électrodes métalliques. Cette technologie permet de détecter les troubles fonctionnels plaquettaires mais elle est principalement utilisée pour surveiller l'effet inhibiteur des antiagrégants plaquettaire.

2.7. Cytométrie en flux

En complément des études réalisées en agrégométrie, le développement de la cytométrie en flux (CMF) permet désormais d'explorer les plaquettes de façon relativement simple et rapide. L'analyse est réalisée sur sang total citraté ou PRP et ne nécessite qu'un tout petit volume d'échantillon (environ 5µL de sang total anticoagulé) (111). Contrairement à la plupart des examens d'exploration plaquettaire, elle est réalisable en cas de thrombopénie. Il est recommandé à chaque laboratoire, comme pour les techniques d'agrégométrie, de tester en parallèle les plaquettes d'un sujet sain et d'établir ses propres valeurs normales à partir d'une population locale de sujet indemnes de toute pathologie plaquettaire.

Cette technique permet notamment d'évaluer (112):

- la présence des glycoprotéines de surface : GPIIbIIIa (intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$), GPIb-IX-V, GPIaIIa (intégrine $\alpha_2\beta_1$).

Des kits commerciaux (Platelet Gp/Receptors Platelet, Gp Screen ; BioCytex du groupe Stago par exemple) sont disponibles et permettent la détection des glycoprotéines plaquettaires par immunomarquage à l'aide d'anticorps monoclonaux spécifiques des glycoprotéines à quantifier. Le nombre de déterminants antigéniques est déterminé en convertissant l'intensité de fluorescence en nombre de sites par plaquette grâce à une droite standard d'étalonnage.

- l'activation et la sécrétion plaquettaires en réponse à divers agonistes :

- augmentation du niveau d'expression de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ et conformation active

Lors de l'activation plaquettaire, l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ change de conformation pour fixer le fibrinogène exposant alors un néo-épitope reconnu par l'anticorps monoclonal PAC-1 (113).

- diminution du niveau d'expression de la GPIb

- expression de la P-selectine (CD62P) et de CD63 (LAMP3), marqueurs respectifs des granules α et des granules denses.

L'expression de la P-selectine à la surface plaquettaire, secondaire à la sécrétion des granules α, pourra ainsi être un marqueur d'activation plaquettaire (*Figure 28*) (si tant est que la fonction sécrétoire des plaquettes soit normale).

- exposition des phospholipides procoagulants à la surface plaquettaire

Elle est évaluée grâce à l'utilisation de l'annexine V qui se fixe aux phospholipides anioniques.

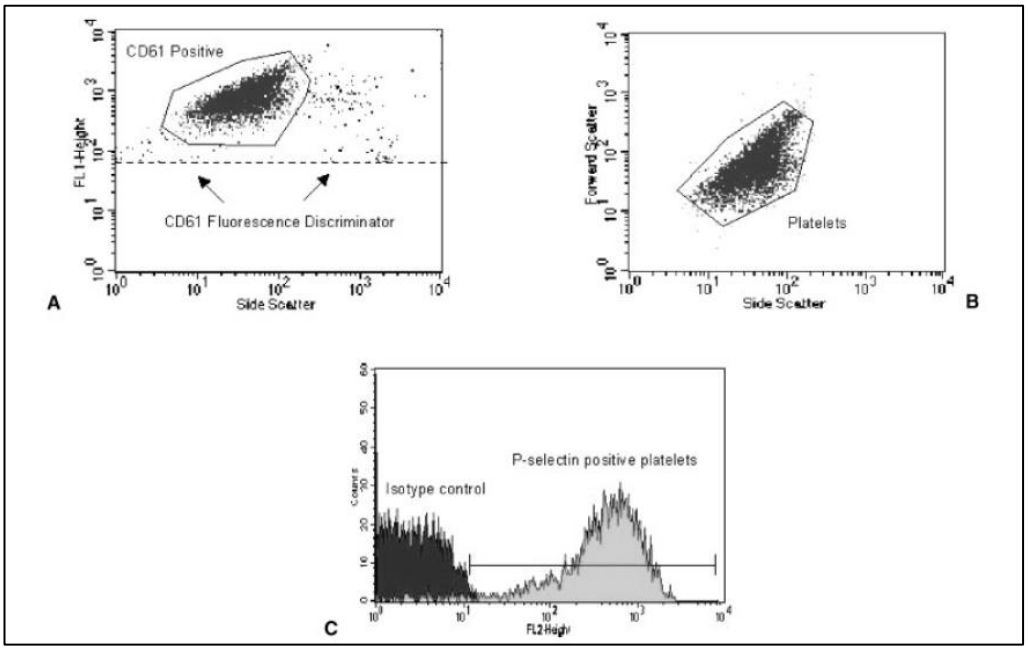

Figure 28 : Evaluation de l'activation plaquettaire par cytométrie en flux

(A) Les plaquettes sont identifiées par la fluorescence de l'anticorps conjugué spécifique des plaquettes (CD61). (B) Les plaquettes sont identifiées selon leur caractéristiques individuelles de taille (FSC ou Forward Scatter) et de forme, structure interne et granularité (SSC ou Side Scatter). Ceci permet d'éliminer les agrégats ou fragments plaquettaires de l'analyse. (C) L'état d'activation de la population plaquettaire est évalué par le nombre d'évènements fluorescents après marquage par un anticorps anti CD62P (P-selectine).

D'après Linden M. (112)

La CMF a de multiples applications dans l'étude des thrombopathies, nous avons uniquement abordé dans ce paragraphe les plus couramment utilisées par les laboratoires d'hémostase.

2.8. Etude de la sécrétion plaquettaire

L'exploration de la sécrétion plaquettaire s'avère indispensable pour caractériser un certain de nombre de thrombopathies ; elle permet d'identifier le sous-type de granule touché et de déterminer s'il s'agit d'un défaut de synthèse ou de sécrétion. Elle comprend le dosage direct du contenu des granules plaquettaires ainsi que l'étude fonctionnelle du processus de sécrétion.

2.8.1. Dosage du contenu des granules plaquettaires

2.8.1.1. Granules α

a) Dosage des protéines solubles des granules α

L'exploration du contenu des granules α passe par le dosage par technique ELISA des protéines solubles contenues dans ces granules : la β-TG (β-thromboglobuline) et le PF-4 (Platelet Factor-4). Ces protéines, sécrétées lors de l'activation plaquettaire, sont dosées dans les surnageants obtenus après stimulation plaquettaire lors des tests d'agrégation (114). Le dosage de la P-selectine soluble est moins spécifique car, à la différence de la β-TG et du PF-4, elle peut provenir d'autres sources comme du clivage de membranes plaquettaires ou de cellules endothéliales (115).

b) Etude des protéines membranaires des granules α

Plusieurs protéines membranaires des granules α se retrouvent exposées à surface plaquettaire après sécrétion et peuvent être utilisées comme marqueur de la sécrétion des granules α. C'est le cas de la P-selectine membranaire, mesurée en CMF comme nous l'avons vu dans le paragraphe précédent. Contrairement à la P-selectine soluble, la P-selectine membranaire est aujourd'hui considérée comme spécifique des granules α plaquettaires. Toutefois, il existe certaines preuves de la présence de cette glycoprotéine adhésive dans les membranes des granules δ (116).

2.8.1.2. Granules denses

a) Etude des protéines membranaires des granules denses

Le CD63, ou la granulophysine, est une protéine transmembranaire présente sur la membrane des granules denses et des lysosomes. Lors de l'activation plaquettaire, cette protéine se retrouve exposée à la membrane plaquettaire. Elle représente donc un marqueur du contenu en granules denses et de l'activation plaquettaire, facilement quantifiable par CMF (21).

b) Détermination du contenu en nucléotides plaquettaires

Les plaquettes contiennent approximativement 5-6µmol d'ATP pour 10^{11} plaquettes et 3-3,5µmol d'ADP pour 10^{11} plaquettes, soit un ratio ATP/ADP de 1,5-2 (117). Environ un tiers des nucléotides totaux est contenu dans un pool métabolique cytoplasmique, comprenant majoritairement de l'ATP. Les deux tiers restants sont stockés dans les granules δ, avec un ratio ATP/ADP de 0,65-0,78 (118). Par conséquent, plus d'ADP que d'ATP est normalement libéré par les plaquettes lors de la sécrétion des granules δ. Un ratio ATP/ADP plaquettaire > 2 (classiquement >4) dénotera donc une diminution du contenu des granules denses.

Les nucléotides plaquettaires (ATP et ADP) contenus dans les granules denses peuvent être dosés en chromatographie liquide haute performance (HPLC) mais cette technique, bien que très sensible et spécifique pour la caractérisation des défauts des granules denses, est peu répandue dans les laboratoires qui préfèrent utiliser des tests d'exploration des capacités sécrétoires (cf « 2.8.2. Tests fonctionnels de la sécrétion »).

c) Dosage de la sérotonine

La sérotonine est activement incorporée puis stockée dans les granules denses à la concentration de 400-600ng/10^9 plaquettes (119,120).

La sérotonine plaquettaire totale ou sécrétée après stimulation par un agoniste peut-être dosée par HPLC (121), par méthode ELISA ou encore par LC-MS (chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse) (122). La cytométrie en flux permet également le dosage de la sérotonine plaquettaire à l'aide d'anticorps spécifiques (123,124)

2.8.2. Tests fonctionnels de la sécrétion granulaire

2.8.2.1. Granules α

Les facteurs de coagulation, comme le FV, contenus dans les granules α sont également des marqueurs potentiels de la sécrétion plaquettaire. La sécrétion granulaire de FV peut être mesuré par des tests de génération de thrombine effectués en PRP ou en plaquettes lavées.

2.8.2.2. Granules denses

a) Lumi-agrégométrie : Test à la luciférine luciférase

La technique la plus répandue pour évaluer la sécrétion des granules δ est le dosage de l'ATP secrété par luminescence (lumi-agrégométrie) (125,126). Le dosage d'ATP est basé sur une réaction de bioluminescence catalysée par la luciférase.

luciférine + Mg^{2+} + ATP	→	luciféryl-adénylate + pyropohosphate
luciféryl-adénylate + 0_2	→	oxyluciférine + AMP + photons

L'ATP sécrété en présence de luciférine est converti, sous l'action catalytique de la lucéfirase, en luciféryl-adénylate. La transformation du luciféryl-adénylate en oxyluciférine s'accompagne d'une émission de photons facilement quantifiable.

Le principe de la lumi-agrégométrie repose sur l'étude simultanée de l'agrégation plaquettaire et du dosage de l'ATP relargué dans le milieu extracellulaire tout au long du processus d'agrégation. Cette technique offre l'avantage de pouvoir suivre la cinétique de sécrétion en réponse à divers agonistes. Toutefois, elle ne permet pas de distinguer une anomalie de sécrétion d'un défaut du contenu des granules denses.

b) Test de sécrétion de la sérotonine (SRA : serotonin release assay)

Considéré comme le « gold standard » pour l'évaluation de la sécrétion des granules δ, le test de sécrétion de la sérotonine (SRA : serotonine release assay) est basé sur l'incorporation de sérotonine radiomarquée au carbone 14 dans les granules δ. La sérotonine (5-HT) radiomarquée ajoutée au PRP est rapidement et presque totalement incorporée dans les granules denses. Les plaquettes sont ensuite stimulées à l'aide d'agonistes plaquettaires comme le collagène ou le TRAP à des concentrations similaires ou supérieures à celles utilisées pour les tests d'agrégométrie. La sérotonine marquée alors libérée peut être

quantifiée à l'aide d'un compteur adapté, et la sécrétion évaluée en pourcentage de la ^{14}C 5-HT totale incorporée par plaquette. Ce test est relativement peu utilisé par les laboratoires spécialisés, qui préfèrent doser la sérotonine par HPLC ou par méthode ELISA.

c) Autres tests fonctionnels de sécrétion de la sérotonine

Une alternative intéressante de la sérotonine radiomarquée est l'OPT (o-Phthalaldehyde) qui forme un fluorophore avec la serotonine (117) pouvant être détecté avec une haute sensibilité par fluorimétrie

d) Test à la mépacrine

La mépacrine peut également représenter un marqueur indirect de la sécrétion des granules denses. La mépacrine, marqueur fluorescent dérivé de l'acridine orange, est incorporée dans les granules denses plaquettaire grâce au même transporteur SERT que la sérotonine (phase de capture) puis sécrétée en réponse à la stimulation par des agonistes plaquettaires. La quantification de la fluorescence est réalisée par CMF avant et après stimulation (127). Un défaut des granules denses se traduira par un défaut de capture et de sécrétion ; alors qu'un défaut de sécrétion sera révélé par une sécrétion de mépacrine réduite associée à une capture normale. Ce test présente néanmoins deux inconvénients majeurs : la disparition rapide de la fluorescence et le manque de spécificité de la fluorescence rendant souvent délicate l'interprétation des résultats.

La *figure* suivante représente l'ensemble des voies impliquées dans la sécrétion des granules plaquettaires ainsi que les tests réalisables pour le diagnostic biologique des troubles héréditaires de la sécrétion plaquettaire.

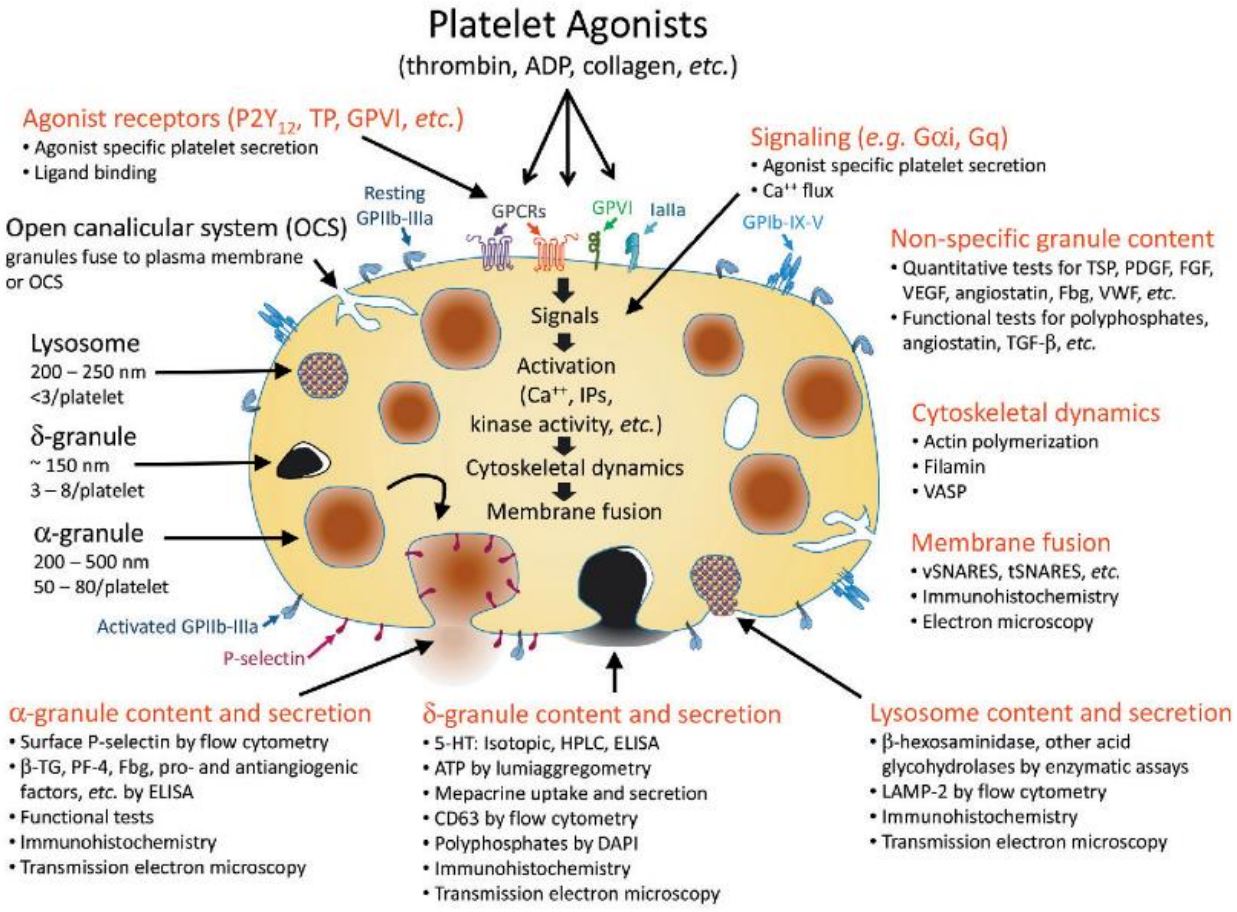

Figure 29 : Représentation schématique des voies impliquées dans la sécrétion des granules plaquettaires et des tests disponibles pour diagnostic biologique des pathologies héréditaires de la sécrétion plaquettaire
D'après Mumford A. (19)

2.9. Biologie moléculaire

Les techniques de biologie moléculaire permettent dorénavant de rechercher la mutation de gènes codant pour les protéines d'intérêt. Deux stratégies sont possibles pour génotyper les thrombopathies : un séquençage ciblé par méthode Sanger à la recherche d'une thrombopathie donnée, ou une stratégie plus large utilisant les nouvelles techniques de séquençage à haut débit.

La mise en évidence d'anomalies caractéristiques d'une pathologie orientera le génotypage d'un ou plusieurs gènes connus pour être responsables du phénotype plaquettaire observé. Par exemple, un défaut d'agrégation en réponse à tous les agonistes excepté à la ristocétine oriente vers une thrombasténie de Glanzmann (nous y reviendrons dans le chapitre « 3.2 Classification des principales thrombopathies constitutionnelles ») et doit faire rechercher une mutation des gènes *ITGA2B* et *ITGB3*.

Les nouvelles techniques de séquençage haut débit aussi appelées NGS (next-generation sequencing) rendent désormais possible le séquençage simultané de plusieurs gènes et constitue un outil remarquable pour le diagnostic des pathologies plaquettaires constitutionnelles. Le séquençage simultané d'un panel de gènes candidats devant un phénotype évocateur est déjà possible. Dans des cas plus complexes, des méthodes « sans à priori » comme le séquençage d'exome (régions codantes) pourront être envisagées. Cette approche est soumise à de nombreuses contraintes, en particulier la nécessité de travailler sur un nombre suffisant de patients et l'expertise bioinformatique nécessaire au traitement des données.

3. Stratégie diagnostique et classification des principales thrombopathies constitutionnelles

3.1. Stratégie diagnostique

Les thrombopathies constitutionnelles constituent un groupe de pathologies hétérogène en termes de sévérité, de mécanismes et de fréquence. Alors que les maladies hémorragiques sévères comme la thrombasthénie de Glanzmann ou encore le syndrome Bernard-Soulier sont relativement simples à identifier, le diagnostic de la plupart des thrombopathies est plus délicat et nécessite des examens biologiques spécifiques complexes. Le SSC de de l'ISTH a publié en 2015 des recommandations pour l'orientation diagnostique des thrombopathies constitutionnelles (128).

La première étape du diagnostic - cruciale - est l'évaluation clinique du patient incluant l'histoire hémorragique personnelle et familiale, en particulier la recherche d'une symptomatologie cutanéo-muqueuse comme des épistaxis, ecchymoses inexpliquées ou étendues, ménorragies et saignements au cours de l'accouchement, après une extraction dentaire et en post-opératoire. Un outil d'évaluation des saignements comme le score BAT (Bleeding Assessment Tool) est fortement recommandé (129). Un recueil précis des médicaments et de l'alimentation pouvant interférer avec la fonction plaquettaire est également indispensable. L'examen physique comprend l'évaluation des manifestations hémorragiques typiques des thrombopathies ainsi que l'association d'autres signes cliniques syndromiques potentiels tels que la surdité, l'atteinte oculaire, la dysmorphie faciale, cardiaque ou osseuse, l'immunodéficience, le retard mental ou la dépigmentation de la peau par exemple. Si le score d'évaluation des saignements et/ou l'examen clinique révèlent des anomalies caractéristiques de thrombopathies congénitales, une exploration biologique initiale sera entreprise, comprenant notamment une numération formule sanguine, un bilan de coagulation (temps de Quick, temps de céphaline plus activateur, dosage du fibrinogène) une étude du facteur von Willebrand (VWF antigène, activité cofacteur de la ristocétine, dosage du facteur VIII de la coagulation). Si ces tests sont normaux, l'exploration biologique doit être poursuivie à la recherche d'une thrombopathie congénitale.

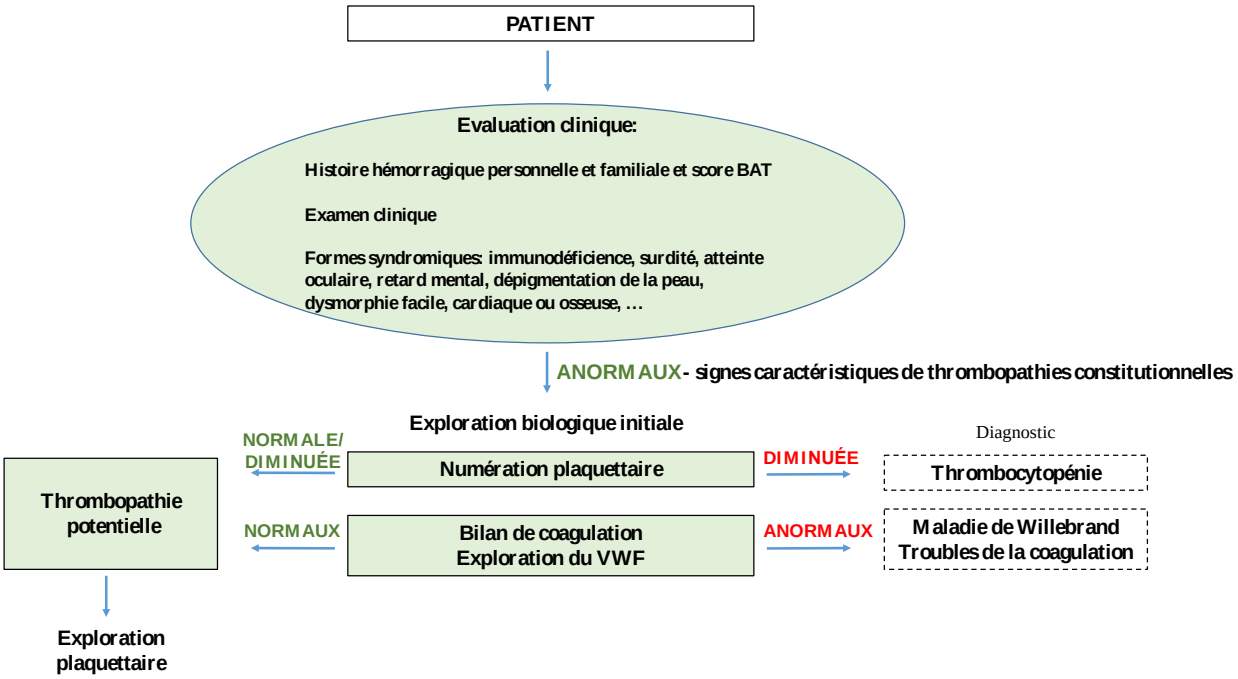

Figure 30 : Algorithme diagnostique des thrombopathies constitutionnelles

Adapté de Gresele P. (128)

L'exploration biologique comprend ensuite des tests spécialisés, pouvant être hiérarchisés par niveaux. Le *tableau* suivant présente la place relative de chaque test biologique dans le diagnostic des thrombopathies constitutionnelles, et les paramètres analysés par chacun de ces tests.

Tableau 5 : Hiérarchisation des tests biologiques utiles au diagnostic des thrombopathies constitutionnelles

Adapté de Gresele P. (128)

Premier niveau de l'exploration biologique	
Test	**Paramètres analysés**
Frottis sanguin	Taille et morphologie plaquettaire, morphologie des autres cellules sanguines
Agrégation plaquettaire	Epinéphrine, ADP, collagène, acide arachidonique, ristocétine
CMF (dépistage)	Expression de la GPIIb/IIIa, GPIIIa, GPIb/IX, GPIb, activation de la GPIIb/IIIa
Etude de la sécrétion granulaire	Sécrétion des granules α et des granules δ
Deuxième niveau de l'exploration biologique	
Test	**Paramètres analysés**
Agrégation plaquettaire (étendu) :	TRAP, U46619, CRP, convulxine, A23187, PMA
CMF (étendu)	Expression de la GPIa/IIa, GPIV, GPVI, activité procoagulante plaquettaire
Etude du contenu des granules plaquettaires	Contenu des granules α et des granules δ
Microscopie électronique	Contenu et morphologie des granules
Rétraction du caillot	Rétraction du caillot
Agrégation plaquettaire – Epreuves croisées (plasma du patient + plaquettes témoins ou plasma témoin + plaquettes patient	Etude de l'agrégation et de la fixation du VWF
Troisième niveau de l'exploration biologique	
Test	**Paramètres analysés**
Etude moléculaire	Mutations des gènes cibles
Etudes biochimiques	Expression des glycoprotéines de surface (Western Blot), étalement plaquettaire, adhésion plaquettaire et formation d'un thrombus en condition en flux Phosphorylation des protéines (Western Blot, CMF) Etude des seconds messagers (Calcium, IP3, AMPc, ...) Etude de la liaison des récepteurs

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

3.2. Classification des principales thrombopathies constitutionnelles

Les thrombopathies constitutionnelles constituent un groupe très hétérogène de pathologies résultant d'anomalies génétiques, dont la prévalence varie en fonction de l'étiologie. Nous nous intéressons dans le cadre de ce travail plus particulièrement aux thrombopathies non associées à une thrombopénie. Plusieurs classifications sont possibles. En fonction du défaut plaquettaire fonctionnel, nous pouvons distinguer :

- les pathologies des récepteurs glycoprotéiques des protéines adhésives ou d'agrégation
- les pathologies des récepteurs des agonistes solubles
- les pathologies des voies de signalisation
- les pathologies sécrétoires
- les anomalies de l'activité procoagulante des plaquettes.

3.2.1. Pathologies des récepteurs glycoprotéiques des protéines adhésives ou d'agrégation

3.2.1.1. Thrombasthénie de Glanzmann

Cette thrombopathie de transmission autosomique récessive est due à un déficit quantitatif ou qualitatif de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$. C'est une maladie rare (environ 500 cas en France), dont l'incidence est plus élevée chez les communautés à fort taux de consanguinité. En fonction du taux de complexe transmembranaire, on distingue les déficits complets (<5%), partiels (5-20%), et qualitatifs (>20% mais déficit fonctionnel, dit « variant »). La numération plaquettaire et le volume plaquettaire moyen sont classiquement normaux. Les patients présentent une symptomatologie hémorragique sévère à modérée, le plus souvent depuis l'enfance. Les gènes impliqués, *ITGA2B* et *ITGB3*, codent respectivement pour les sous unités α_{IIb} et β_3 de l'intégrine (130). Le diagnostic est évoqué devant un défaut d'agrégation en réponse à tous les agonistes plaquettaires et une agglutination à la ristocétine conservée. La cytométrie en flux permettra une étude quantitative des sous-unités α_{IIb}(CD41) et β_3 (CD61) à la surface plaquettaire. Une mesure de la rétraction du caillot peut s'avérer d'intérêt car, selon la mutation causale, le phénotype associe un défaut de rétraction de caillot, de même qu'un défaut de stockage granulaire du fibrinogène et d'étalement des plaquettes en condition de flux.

3.2.1.2. Syndrome de Bernard-Soulier

Le syndrome de Bernard Soulier, décrit pour la première fois en 1948 par Jean Bernard et Jean-Pierre Soulier, est une pathologie rare se transmettant le plus souvent selon un mode autosomique récessif. Il associe thrombopénie avec plaquettes géantes à un défaut quantitatif ou qualitatif de la chaine Ibα du complexe GPIb-IX-X, entrainant un défaut d'adhésion des plaquettes au VWF. Le tableau clinique est variable, allant de saignements modérés à sévères, principalement cutanéo-muqueux et post-opératoires (131). Plusieurs mutations sur les gènes *GPIBA, GPIBB* et *GP9* ont été identifiées comme étant responsable de ce syndrome. Dans la plupart des cas, la GPIb n'est plus exprimée à la surface plaquettaire. Biologiquement, les patients présentent un défaut isolé d'agglutination des plaquettes en réponse à la ristocétine. L'étude quantitative par cytométrie en flux de la GPIb à la surface plaquettaire confirmera souvent le diagnostic.

3.2.1.3. Déficit en GPVI

Plusieurs mutations du récepteur GPVI du collagène, codé par le gène *GP6*, ont été décrites chez des patients atteints d'un syndrome hémorragique modéré. Cette thrombopathie à transmission autosomique récessive est caractérisée par une diminution d'expression et une perte de fonction du récepteur, révélés par un défaut d'agrégation plaquettaire aux agonistes spécifiques de la GPVI (convulxine, CRP) et au collagène (132,133).

3.2.1.4. Pseudo-maladie de Willebrand plaquettaire

La pseudo-maladie de Willebrand plaquettaire est une thrombopathie à transmission autosomique dominante causée par une mutation gain de fonction sur le gène *GPIBA* codant pour la GPIbα(134). Cette mutation entraine une augmentation de l'affinité de la GPIbα pour le VWF, qui devient capable de lier les formes les plus polymérisées de VWF soluble en absence de forces de cisaillement, entrainant une clairance accélérée des formes de haut poids moléculaire du VWF. Elle est le miroir de la maladie de Willebrand de type 2B, dans laquelle le gain de fonction n'est pas d'origine plaquettaire mais résulte d'une mutation du gène du VWF. Cliniquement, les patients présentent des saignements cutanéo-muqueux d'intensité modérée. Une macrothrombopénie est fréquemment retrouvée chez les patients atteints. L'exploration biologique inclue une étude du VWF, révélant classiquement un ratio VWF:RCo/VWF:Ag (activité cofacteur de la ristocétine/antigène) <0,6 et une diminution ou une absence des multimères de haut poids moléculaire. Le diagnostic repose sur un excès d'agglutination aux faibles doses de ristocétine, corrigé dans un PRP reconstitué avec le

plasma du patient et des plaquettes témoins. Cette épreuve croisée entre le plasma du patient et les plaquettes témoins ou du plasma témoin et les plaquettes du patient permet le diagnostic différentiel avec la maladie de Willebrand de type 2B.

3.2.2. Pathologies des récepteurs des agonistes solubles

3.2.2.1. Déficit en P2Y12

Une mutation du gène *P2Y12* est à l'origine d'un défaut d'expression du récepteur à l'ADP P2Y12 ou de son incapacité à lier l'ADP (135,136). Cette thrombopathie rare, transmise sur une mode autosomique récessif, entraine un syndrome hémorragique modéré. Elle est révélée par un défaut d'agrégation en réponse à toutes les doses d'ADP ainsi qu'aux faibles doses d'autres agonistes, soulignant le rôle potentialisateur de l'ADP sécrété via son récepteur P2Y12.

3.2.2.2. Déficit en récepteur du TXA2

De rares cas de mutations du gène *TA2R* codant pour le récepteur du TXA2 ont été décrites chez des patients présentant un syndrome hémorragique modéré. Une mutation homozygote a été mise en évidence avec une mode de transmission automosique dominant potentiel (137). Elle empêche le couplage du récepteur à la protéine G, se traduisant par une absence d'agrégation plaquettaire à l'acide arachidonique et à un analogue du TXA2 (U46619). Les plaquettes présentent en outre une diminution des intensités d'agrégation en réponse à l'ADP et à l'épinéphrine, le TXA2 jouant un rôle amplificateur. Une autre mutation, hétérozygote, a été décrite chez un patient présentant une absence d'agrégation aux faibles doses d'acide arachidonique et de U46619, et une réduction de l'agrégation à des doses plus fortes de ces deux agonistes (138).

Des mutations du gène *TBXAS1* codant pour une thromboxane synthase ont été décrites chez des patients atteints du syndrome de Ghosal ou dysplasie hématodiaphysaire de Ghosal, maladie rare caractérisée par une anémie corticodépendante et une augmentation de la densité osseuse prédominante au niveau des diaphyses. Dans ce cas, les patients présentent un défaut d'agrégation plaquettaire spécifique à l'acide arachidonique, alors que l'U46619 induit une agrégation normale (139).

3.2.3. Pathologies des voies de signalisation

3.2.3.1. Déficit en CalDAG-GEFI

Un déficit en CalDAG-GEFI a été décrit pour la première fois en 2014 dans une famille française porteuse d'une mutation de *RASGRP2* présentant un syndrome hémorragique modéré à sévère (140). Il s'agit d'une mutation autosomique récessive. L'anomalie s'apparente aux défauts de la voie P2Y12/Gi en raison de l'importance de l'ADP dans l'activation de la protéine CalDAG-GEFI. L'agrégation plaquettaire en réponse aux faibles doses d'agonistes (ADP surtout, mais aussi TRAP et adrénaline) est fortement réduite. Ce défaut disparaît en réponse aux fortes d'agonistes ou au PMA. Depuis cette première description, quatre autres variants de *RASGRP2* ont été rapportés (141,142). Les conséquences sur les fonctions plaquettaires d'un déficit en CalDAG-GEFI seront détaillées dans la seconde partie de ce travail.

3.2.3.2. Déficit en Kindline : leukocyte adhesion deficiency III (LAD-III)

Le déficit d'adhésion leucocytaire de type III (LAD-III) est une pathologie rare associant déficit immunitaire et dysfonction plaquettaire (143). Une vingtaine de mutations du gène *FERMT3* codant pour la kindline 3 ont été identifiées comme étant à l'origine de cette pathologie. Le déficit en kindline 3 se traduit par une dysfonction plaquettaire, mais aussi leucocytaire car elle est également impliquée dans l'activation des β-intégrines leucocytaires. Typiquement, les patients présentent dès la naissance des épisodes hémorragiques cutanéo-muqueux spontanés sévères et des infections bactériennes associées à une hyperleucocytose avec augmentation des polynucléaires neutrophiles et des lymphocytes. La numération plaquettaire est normale, mais les plaquettes des patients présentent une absence d'agrégation en réponse à tous les agonistes excepté à la ristocétine ; profil d'agrégation similaire à celui rencontré dans la thrombasthénie de Glanzmann. En cytométrie en flux, l'étude de la fixation de l'anticorps PAC-1 objective un défaut d'activation de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ en réponse aux fortes doses d'agonistes. En revanche, l'intégrine est capable de s'activer sous l'action du $MnCl_2$ -qui force l'intégrine à passer en conformation active- témoin d'un défaut de signalisation plaquettaire sans anomalie intrinsèque de l'intégrine.

3.2.3.3. Syndrome de Noonan

Le syndrome de Noonan est une maladie congénitale à transmission automosique dominante associant une dysmorphie faciale caractéristique, une petite taille et des anomalies cardiaques, avec une prévalence de 1 cas pour 1000 à 2500 naissances. Les études moléculaires montrent des anomalies de différentes protéines de la voie des RAS-MAPK (Ras-Mitogen-activated protein kinase) (144), causées dans la majorité des cas par une mutation du gène *PTPN11*. Des mutations de *SOS1*, *KRAS*, *RAS1* ou d'autres gènes ont également été rapportées (145,146). Un syndrome hémorragique est présent chez presque la moitié des patients, principalement d'intensité modérée et de type cutanéo-muqueux. Des dysfonctions plaquettaires sont retrouvées chez la majorité des patients, y compris ceux ne présentant aucune symptomatologie hémorragique (147). On retrouve des défauts d'agrégation plus au moins marqués en réponse à l'ADP, au collagène, au TRAP ainsi qu'à l'U46619. La sécrétion plaquettaire est aussi diminuée chez les patients atteints. La physiopathologie des dysfonctions plaquettaires dans le syndrome de Noonan reste à ce jour imprécise.

Des troubles de la coagulation ont également été rapportés chez ces patients, principalement des déficits modérés en facteurs de la coagulation notamment en facteur VII. Ce déficit est corrigé par une prise orale de vitamine K, suggérant qu'un apport alimentaire insuffisant ou une diminution de l'absorption intestinale de vitamine K pourraient être responsable de cette anomalie.

3.2.4. Pathologies sécrétoires

3.2.4.1. Défauts des granules α

a) Syndrome des plaquettes grises

Le syndrome des plaquettes grises est un syndrome hémorragique congénital plaquettaire rare (fréquence $1/10^6$), de transmission le plus souvent récessive (148). Le gène responsable, *NBEAL2*, code pour une protéine de la famille des protéines à domaine BEACH impliquées dans le trafic vésiculaire. Cliniquement, ce syndrome se traduit par des saignements cutanéo-muqueux modérés à sévères. Une splénomégalie est fréquemment retrouvée, et ce syndrome évolue souvent vers une myélofibrose progressive. Classiquement, les patients présentent une macrothrombocytopénie, et les plaquettes apparaissent pâles ou « grises » au frottis sanguin. Le diagnostic repose sur l'absence de granules α en microscopie électronique et la présence de nombreuses vacuoles. L'étude de la sécrétion plaquettaire montre un déficit prononcé en

protéines α granulaires (PF4, vWF, ...), l'agrégation à la thrombine et au collagène sont réduites. Un déficit en GPVI peut également être retrouvé, le récepteur étant vraisemblablement clivé par une activité protéase inappropriée.

b) Thrombopathie Québec, ARC syndrome, syndrome de Paris-Trousseau

Le syndrome des plaquettes Québec est une maladie génétique rare de transmission autosomique dominante causée par une duplication en tandem du gène *PLAU* codant pour l'urokinase (u-PA). Il associe thrombopénie et gain de fonction dans la fibrinolyse dû à une augmentation de l'expression et du stockage de l'u-PA, activateur du plasminogène (149). Il en résulte une accumulation d'u-PA dans les granules α plaquettaires qui active le plasminogène en plasmine, et conduit à la protéolyse des protéines intragranulaires. L'expression clinique est dominée par des saignements post-opératoires retardés ou post-traumatiques. Dans la moitié des cas, les patients présentent des hématuries. Le dosage de l'u-PA dans le plasma et le lysat plaquettaire constitue un bon outil diagnostique, de même que le dosage des D-dimères dans le sérum des patients.

Le syndrome ARC (arthrogrypose, atteinte rénale, cholestase) est une atteinte multiorganes se manifestant également au niveau plaquettaire par une thrombopénie à plaquettes géantes et une diminution du nombre de granules α (150). Il y a absence complète des membranes des granules α, objectivée par l'absence du marqueur des membranes granulaires : la P-sélectine. Les patients présentent de saignements modérés à sévères. Ce syndrome est dû à une mutation du gène *VPS33B* (151), codant pour une protéine membre de la famille Sec1/Munc18 impliquée dans le trafic intracellulaire.

Le syndrome de Paris-Trousseau, proche du syndrome de Jacobsen, de transmission autosomique dominante, associe une dysmorphie faciale, un retard mental, des anomalies cardiaques, des saignements cutanéo-muqueux et une thrombopénie, reflet d'une anomalie de maturation de la lignée mégacaryocytaire (152). Une fraction des plaquettes sanguines contient des granules α géants, détectable par microscopie électronique. L'étude de la sécrétion montre un défaut de sécrétion des granules α. Génétiquement, les patients ont une délétion du bras long du chromosome 11 qui inclue le gène *FLI1* codant pour un facteur de transcription impliqué dans la mégacaryopoïèse.

3.2.4.2. Défauts des granules denses

a) Syndrome du pool vide

Le syndrome du pool vide est une thrombopathie très rare caractérisée par un défaut des granules δ. L'anomalie peut être quantitative (déficit en granules δ), ou qualitative avec présence de granules denses non fonctionnels. Les bases moléculaires de la forme constitutionnelle isolée sont encore inconnues à ce jour. Les patients présentent des saignements d'intensité variable mais le plus souvent modérés. Notons qu'un déficit en transporteur plaquettaire MRP4 (multidrug-resistant protein 4) a été rapporté chez deux patients présentant un défaut de nucléotides plaquettaires (153). Les plaquettes présentant un défaut de granules δ ont généralement un défaut d'agrégation en réponse à la majorité des agonistes plaquettaires (collagène, thrombine, acide arachidonique) et une absence de seconde vague d'agrégation en réponse à l'ADP et l'épinéphrine. La microscopie électronique et l'étude de la sécrétion des granules δ sont particulièrement utiles pour orienter le diagnostic.

b) Syndrome de Chediak-Higashi, Syndrome d'Hermansky-Pudlak, Syndrome de Griscelli

Le syndrome de Chediak-Higashi est un désordre récessif autosomal rare qui se caractérise par l'association d'un déficit immunitaire, d'un albinisme partiel, et de saignements cutanéo-muqueux modérés, responsable d'une mortalité précoce des patients atteints (154). Ce syndrome touche de nombreux types cellulaires, notamment les cellules hématopoïétiques et les mélanocytes. Les anomalies immunologiques résultent de la présence de granules géants caractéristiques correspondant à des lysosomes anormaux dans l'ensemble des leucocytes, avec diminution du chimiotactisme, de la bactéricidie et fonctions anormales des cellules NK. L'atteinte fonctionnelle plaquettaire est due à un déficit en granules denses. Cette affection autosomique récessive est due à une mutation du gène *CHS1* codant pour la protéine LYST (contenant le domaine BEACH) impliquée dans le trafic vésiculaire (155).

Comme le syndrome de Chediak-Higashi, le syndrome d'Hermansky-Pudlak associe des saignements modérés à un albinisme et, dans certains cas, se complique d'une immunodéficience, de colite granulomateuse et de fibrose pulmonaire. Cette maladie génétique très rare se transmet sur un mode autosomique récessif, avec une fréquence

augmentée sur l'île de Porto Rico. On note une hétérogénéité génétique et des manifestations spécifiques à certaines formes, selon le gène muté (156); les mutations des gènes *HPS1* et *HPS4* sont les plus fréquemment retrouvées. Les gènes *HPS* codent pour les protéines des complexes BLOCs (biogenesis of lysosome-related organelles complex 3), formant la machinerie de biogenèse des LRO (lysosome related organelles), famille à laquelle appartiennent les lysosomes, les granules denses et les mélanosomes.

La distinction avec le syndrome de Griscelli n'est pas toujours évidente. Cette maladie autosomique récessive rare caractérise par une hypopigmentation cutanée associée à des désordres immunologiques, une lymphohistiocytose ou à des atteintes neurologiques. La tendance hémorragique n'est pas systématique. Il est causé par des mutations sur différents gènes : *MYO5A* codant pour la myosine Va, *MLPH* codant pour la melanophiline ou encore *RAB27A* qui code pour la GTPase Rab27a – trois protéines impliquées dans le trafic intracellulaire (156).

3.2.5. Anomalies de l'activité procoagulante des plaquettes

3.2.5.1. Syndrome de Scott

Causé par un défaut d'exposition des phosphatidylsérines (PS) à la surface des cellules sanguines, cette maladie génétique entraine un défaut de l'activité procoagulante des plaquettes. Ce syndrome, décrit pour la première fois en 1979, se transmet sur un mode autosomique récessif (157). Cliniquement, il est caractérisé par des saignements du post-partum et post-traumatiques sévères. Les plaquettes des patients n'exposent plus de PS à la surface plaquettaire même en réponse aux agonistes plaquettaires « forts » comme la thrombine et le collagène. Physiologiquement, la translocation de ce lipide du feuillet interne vers le feuillet externe de la membrane plasmique lors de l'activation plaquettaire permet la fixation des facteurs de coagulation Va et Xa et la conversion de la prothrombine en thrombine. Des mutations du gène *TMEM16F* ont été identifiées comme étant à l'origine de cette pathologie (158). Le produit de ce gène est une protéine agissant comme un canal ionique activé par le calcium indispensable à l'activité de la scramblase plaquettaire, enzyme permettant le transport bidirectionnel des phospholipides d'un feuillet à l'autre de la membrane plasmique. Des études très récentes suggèrent que la protéine TMEM16F possèderait la double fonction de canal ionique et de scramblase (159).

Le diagnostic repose sur l'étude en cytométrie en flux de la capacité des plaquettes à exposer les PS sur le feuillet externe de leur membrane plasmique en réponse à un mélange de thrombine et de collagène ou au ionophore calcique. Elle est évaluée grâce à l'utilisation de l'annexine V qui reconnaît sélectivement ce lipide en présence de calcium. Des tests de génération de thrombine peuvent compléter l'analyse.

Lorsque les anomalies retrouvées au cours de l'exploration plaquettaire ne correspondent à aucun profil de thrombopathie connue, des tests plus complexes relevant du domaine de la recherche peuvent se révéler d'intérêt afin de caractériser les défauts plaquettaires.
A travers l'exemple d'un déficit en CalDAG-GEFI, nous illustrerons, dans la deuxième partie de ce travail, comment la collaboration entre le laboratoire d'hémostase et une unité de recherche spécialisée dans le domaine des plaquettes peut permettre de caractériser une thrombopathie de mécanisme physiopathologique inconnu.

II. CARACTERISATION FONCTIONNELLE DE THROMBOPATHIES NOUVELLEMENT RAPPORTEES : EXEMPLE DU DEFICIT EN CALDAG-GEFI

1. Description et caractérisation de la première mutation sur le gène *RASGRP2* décrite chez l'homme

1.1. Caractérisation initiale des patients

1.1.1. Anamnèse et présentation clinique

Les patients, deux frères et une sœur nés entre 1957 et 1962, ayant un lien de consanguinité (parents consanguins au premier degré), ont été adressés au Centre d'Exploration des Pathologies Hémorragiques et Thrombotiques (CEHT) du CHU (Centre hospitalo-universitaire) de la Timone à Marseille pour syndrome hémorragique sévère depuis l'âge de 18 mois. La symptomatologie était à prédominance cutanéo-muqueuse : épistaxis prolongés, saignement après extraction dentaire, et également des hématomes. La présentation clinique de la patiente était plus sévère que celle de ses frères, avec notamment des ménorragies massives et responsable d'une anémie chronique. Les saignements avaient nécessité, pour les deux patients, des transfusions de culots de globules rouges à l'adolescence. L'un des patients avait également reçu des concentrés plaquettaires en prévention du risque hémorragique avant une intervention chirurgicale. L'interrogatoire et l'examen clinique des parents et des deux enfants de l'un des patients n'ont retrouvé aucune tendance hémorragique.

1.1.2. Exploration biologique initiale des fonctions plaquettaires

L'exploration biologique des patients a révélé un allongement notable du temps de saignement (>20min), un défaut d'agrégation plaquettaire en réponse à toutes les doses d'ADP testées et à l'épinéphrine, ainsi qu'aux faibles doses de TRAP-14 et de collagène *(Figure 31a)*. La ristocétine et le PMA entrainaient une agrégation plaquettaire maximale normale. L'agrégation plaquettaire aux fortes doses d'acide arachidonique, de TRAP-14 et de collagène était comparable à celle du témoin. Les vélocités d'agrégation des plaquettes des patients étaient significativement inférieures à celles des témoins en réponse à toutes les doses d'ADP testées mais également en réponse aux fortes doses de TRAP-14 et de collagène

(*Figure 31b*). Les parents présentaient, quant à eux, un profil d'agrégation plaquettaire en réponse à tous les stimuli testés comparable à celui du témoin.
L'expression de tous les récepteurs plaquettaires membranaires testés, y compris l'$\alpha_{IIb}\beta_3$ et la GPIbα, était normale. La liaison de l'anticorps spécifique de la forme activée de l'$\alpha_{IIb}\beta_3$, PAC-1, est identique chez les patients et chez les témoins après activation par le TRAP-14. (*Figure 31c*)

Le contenu et la sécrétion des granules plaquettaires ont par la suite été étudiés. Le contenu plaquettaire en PAI-1 (libéré par les granules α) et en sérotonine, la capture et la sécrétion de mépacrine ainsi que l'expression de surface de la granulophysine après stimulation par de fortes doses d'agonistes (ADP 10μM et TRAP-14 50μM) se sont avérés normaux. Ces résultats nous indiquent que le contenu des granules α, des granules denses et des lysosomes est normal. En revanche, l'expression de surface de la P-selectine était réduite chez les patients en réponse aux agonistes plaquettaires (*Figure 31c*), révélant un léger défaut de sécrétion des granules α.

La rétraction du caillot, induite par 1U/mL de thrombine, n'était pas affectée. La génération de thrombine en PRP dépend de l'activation plaquettaire et de l'activation de l'intégrine de $\alpha_{IIb}\beta_3$ autant que des facteurs plasmatiques de la coagulation. Chez les patients, la génération de thrombine en PRP était modérément perturbée avec un allongement du temps de pic ou TTP (time to peak), temps nécessaire pour atteindre la concentration maximale de thrombine générée mais une quantité totale de thrombine générée ou ETP (endogenous thrombin potential) comparable à celle des témoins (*Figure 31d*).

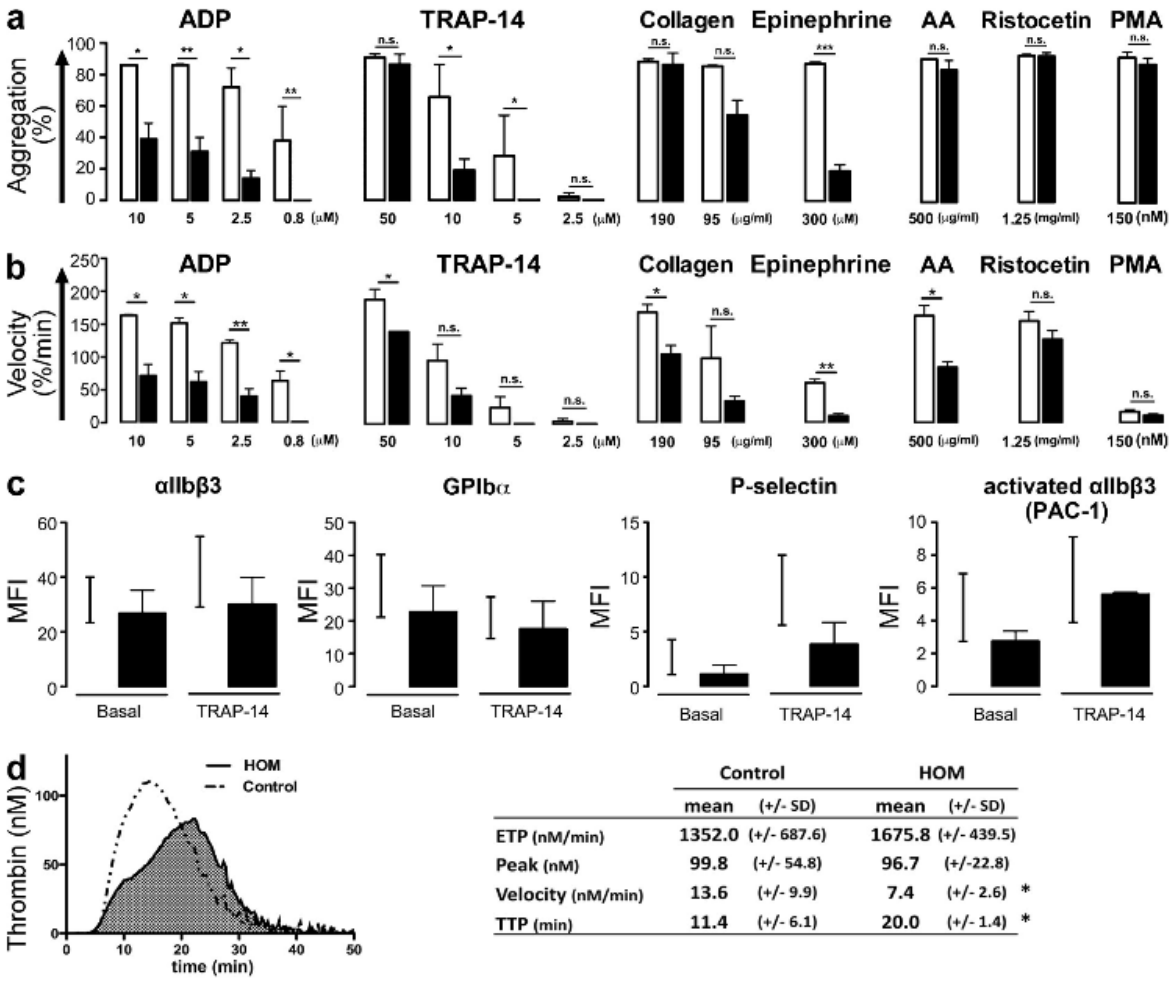

Figure 31 : Caractérisation des fonctions plaquettaires des patients

*(a) Agrégation plaquettaire maximale (%) et (b) vélocité (%/min) de deux patients (barres pleines) et de trois témoins (barres vides) induite par l'ADP, le TRAP-14, le collagène, l'épinéphrine, l'acide arachidonique, la ristocétine et le PMA. (Student's t test ; *, P < 0.05; **, P < 0.01; ***, P < 0.001). (c) Niveau d'expression de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$, la GPIbα, la P-sélectine et la forme activée de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ (reconnue par l'anticorps PAC-1) dans les plaquettes au repos et après activation par 50µM de TRAP-14 de deux patients mesuré par cytométrie en flux et exprimé en intensité moyenne de fluorescence (Mean Fluorescence Intensity, MFI). Les lignes noires représentent l'intervalle entre les MFI minimales et maximales obtenues chez les témoins (n=8). (d) Génération de thrombine endogène en PRP. Paramètres du thrombogramme : aire sous la courbe ou ETP (endogenous thrombin potential) : quantité totale de thrombine générée ; peak : concentration maximale de thrombine générée ; vélocité de la réaction et temps de pic ou TTP (time to peak) : temps auquel la concentration maximale de thrombine est atteinte. (n=5 pour les témoins, n=2 pour les patients ; Student's t test ; *, P < 0.05)*

D'après Canault M. (140)

1.2. Caractérisation d'un déficit en CalDAG-GEFI

Globalement, le bilan biologique initial orientait vers des troubles sélectifs des voies de signalisation plaquettaire, observés principalement à faibles doses d'agonistes. Devant ce profil complexe ne correspondant à aucune thrombopathie décrite jusqu'alors, un séquençage d'exome, méthode de biologie moléculaire « sans à priori », a alors été réalisé à la recherche de mutation(s) potentiellement pathohène(s). Cette technique a permis d'identifier une mutation sur le gène *RASGRP2* codant pour la protéine de signalisation plaquettaire CalDAG-GEFI, conduisant à la substitution d'une glycine en tryptophane en position 248 située dans le domaine catalytique CDC25 de la protéine *(Figure 32)*. Cette mutation entraine une thrombopathie à transmission autosomique récessive.
Il s'agit du premier cas de mutation du gène *RASGRP2* identifié chez l'homme.

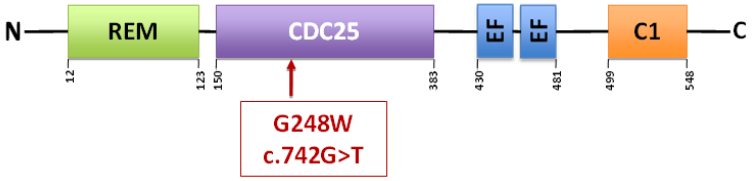

Figure 32 : Première mutation de *RASGRP2* identifiée chez l'Homme (mut1)

En collaboration avec l'unité de recherche NORT dirigé par le Professeur Alessi (Nutrition, Obésité et Risque Thrombotique, UMR INSERM 1062 / INRA 1260 / Université Aix-Marseille), les conséquences sur les fonctions plaquettaires de cette mutation nouvellement identifiée ont été caractérisées.

1.2.1. Expression de la protéine CalDAG-GEFI

La protéine est normalement exprimée dans les plaquettes des patients porteurs de la mutation (Taux d'ARNm et expression protéique dosés dans les échantillons des patients respectivement par RT-PCR et Western Blot similaires à ceux des témoins).

1.2.2. Evaluation de l'activation de Rap1b

L'activité de CalDAG-GEFI peut être évaluée par le ratio Rap1b-GTP/Rap1b total, après avoir quantifié la quantité de Rap1b liée au GTP par technique de précipitation en Western Blot.

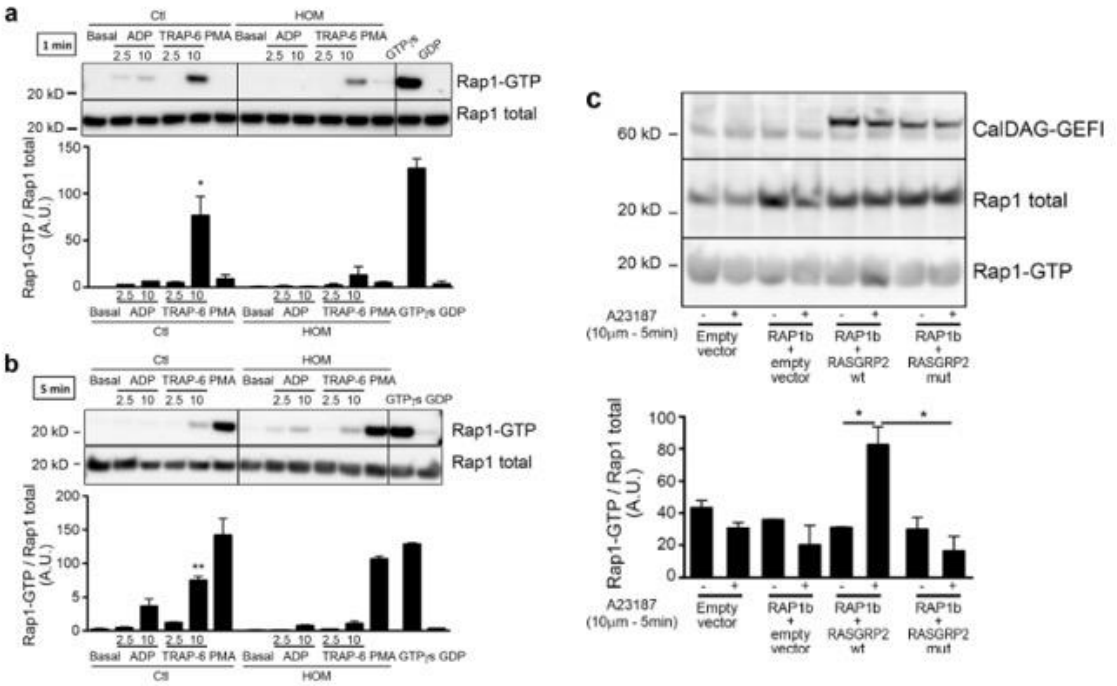

Figure 33 : Evaluation de l'activation de Rap1b dans les plaquettes des patients porteurs de la mut1 de *RASGRP2* et dans des cellules transfectées avec la forme mutée de la protéine

*La forme activée de Rap1b (Rap1b-GTP) est détectée dans les lysats plaquettaires de patients homozygotes (HOM) et de témoins après 1 (a) et 5 (b) minutes de stimulation par l'ADP, le TRAP-6 et le PMA (150nM). Les plaquettes d'un patient homozygote ont également été incubées avec du GTPγS et du GDP, constituant les contrôles positif et négatif de l'expérience. (c) Activation de Rap1b dans les cellules GripTite® 293 MSR. Les cellules sont co-transfectées avec Rap1b et avec la forme native ou mutée (mut1) de CalDAG-GEFI. Après stimulation par 10µM d'ionophore calcique (A23187) durant 5 minutes, les cellules sont lysées et une précipitation de Rap1b-GTP est réalisée. (Student's t test ; *, P < 0.05; **, P < 0.01).*

D'après Canault M. (140)

Chez les témoins, une activation dose-dépendante de Rap1b est observée après stimulation par l'ADP et de fortes doses de TRAP-6. La mutation p.G248W de CalDAG-GEFI (mut1) entraine une nette diminution de l'activation de la protéine Rap1b dans les plaquettes de patients homozygotes en réponse à l'ADP et au TRAP-6. Le PMA, en revanche, entraine une activation normale de Rap1b chez les patients homozygotes comme chez les témoins. Afin de prouver que la mutation p.G248W diminue la capacité de CalDAG-GEFI à activer Rap1b, ce test est ensuite réalisé sur des cellules GripTite® 293 MSR (ThermoFisher Scientific) co-transfectées avec des plasmides codant pour *RAP1B* et pour la forme native ou mutée (mut1)

de CalDAG-GEFI. La stimulation par un ionophore calcique entraine une augmentation significative du taux de Rap1b activé dans les cellules exprimant la forme native de CalDAG-GEFI, alors qu'aucune augmentation de l'activation de Rap1b n'est observée dans les cellules exprimant la forme mutée (140). Ces résultats prouvent que la mutation p.G248W est responsable de la diminution de l'activité de la protéine CalDAG-GEFI.

1.2.3. Etude de l'adhésion et de l'étalement plaquettaires en condition statique

L'adhésion et l'étalement plaquettaires en condition statique des patients homozygotes et hétérozygotes ont été étudiés. Les techniques d'exploration de ces fonctions plaquettaires seront détaillées dans le paragraphe « 2.3 Matériels et méthodes ». A l'état basal et après stimulation par l'ADP ou le TRAP-6, l'adhésion et l'étalement sur du fibrinogène en condition statique des plaquettes des patients non seulement homozygotes mais aussi hétérozygotes sont fortement diminués. En effet, les plaquettes des patients ont une moindre capacité à fixer le fibrinogène. De plus, les plaquettes des patients homozygotes forment moins de filopodes que celles des témoins et ne parviennent pas à former des lamellipodes. Les plaquettes des patients hétérozygotes présentent également des défauts prononcés d'étalement plaquettaire, ils ne parviennent pas non plus à former des lamellipodes mais leur capacité à former des filopodes en réponse aux agonistes plaquettaires est supérieure à celle des patients homozygotes. Contrairement à l'agrégation plaquettaire, de fortes doses d'agonistes ne restaurent que partiellement les défauts observés, suggérant que la totalité de l'activité de CalDAG-GEFI est requise pour obtenir un étalement plaquettaire normal. Le PMA permet néanmoins de rétablir une adhésion et un étalement plaquettaires comparables à ceux du témoin (140).

1.2.4. Etude de l'adhésion en condition de flux

Les fonctions plaquettaires des plaquettes des patients ont également été évaluées dans des conditions mimant le flux sanguin artériel. L'adhésion des plaquettes au collagène et la formation d'un thrombus ont été étudiées dans des chambres de flux grâce au système Vena8 Fluoro+ biochips (Cellix), après marquage des plaquettes à la calcéine AM permettant leur visualisation en fluorescence.

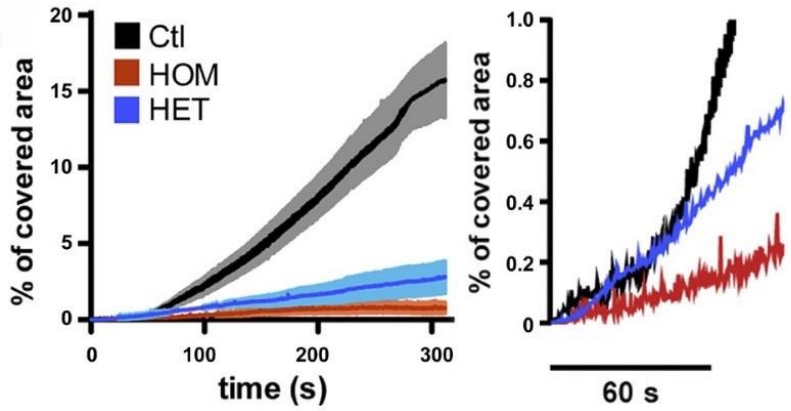

Figure 34 : Adhésion en flux des plaquettes des patients porteurs de la mut1 de CalDAG-GEFI

Adhésion en flux (750s^{-1}) sur du collagène après marquage à la calcéine AM des plaquettes des patients homozygotes (HOM), hétérozygotes (HET) et de témoins. La surface recouverte par les plaquettes est évaluée après 300 secondes.

D'après Canault M. (140)

La surface recouverte par les plaquettes des patients HOM est significativement réduite par rapport aux témoins. La cinétique d'adhésion des plaquettes des patients HET est altérée et s'apparente à celle des patients HOM excepté aux temps les plus précoces (*Figure 34*).

2. Caractérisation fonctionnelle de mutations nouvellement identifiées sur le gène *RASGRP2*

2.1. Mutations nouvellement identifiées sur le gène *RASGRP2*

Depuis cette première description, quatre variants dans le gène *RASGRP2* ont été identifiés par notre équipe dans deux familles françaises et une famille américaine, dont les propositi présentent tous une symptomatologie hémorragique.

Les mutations 2 (mut2) p.N67Lfs*24 de la région REM et 5 (mut5) p.F497Sfs*20 située juste en amont du domaine C1 sont des mutations non-sens *(Figure 35)*. Dans le cadre de ce travail, nous nous intéresserons uniquement à ces deux mutations.

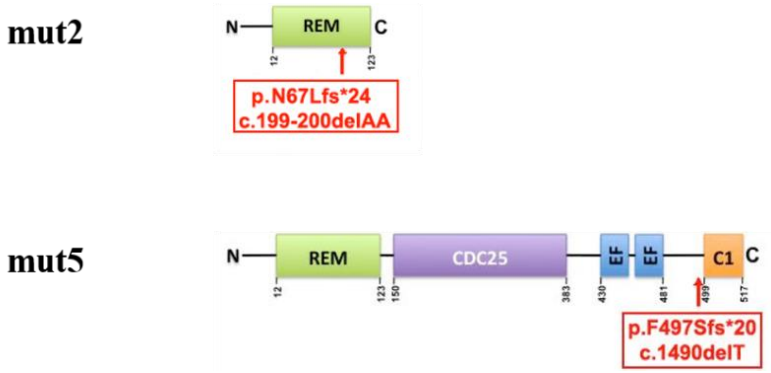

Figure 35 : Effets des mutations 2 (mut2) et 5 (mut5) sur la séquence peptidique de CalDAG-GEFI

2.1.1. Mutation 2

Une caractérisation initiale des fonctions plaquettaires des patients porteurs de la mut2 a été effectuée par notre équipe. La protéine CalDAG-GEFI n'est pas exprimée dans les plaquettes du patient homozygote pour cette mutation.

Aucune activation de Rap1b n'est observée dans les plaquettes du patient HOM mut2 après une minute de stimulation au TRAP-6 (10 et 50µM) et à l'ADP (10µM). Chez le sujet HET mut2, elle est réduite lors de la stimulation à l'ADP, mais normale avec le TRAP-6 *(Figure 36)*.

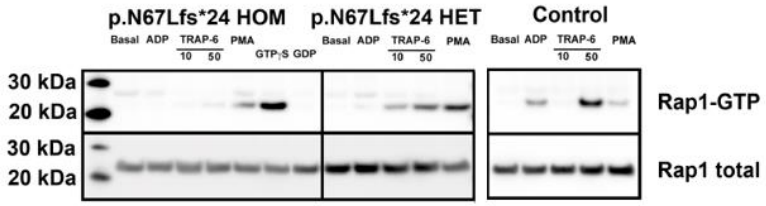

Figure 36 : Activation de Rap1b dans les plaquettes de patients porteurs de la mut2 de *RASGRP2*

Détection de l'activité de Rap1b à l'état basal et après stimulation par l'ADP, le TRAP-6 (10 et 50µM) et le PMA par technique de précipitation en Western Blot dans les lysats plaquettaires de témoins et de patients porteurs de la mut2 de RASGRP2. (Données non publiées)

Chez le patient HOM mut2, l'agrégation plaquettaire est fortement diminuée après stimulation par l'ADP (2,5, 5 et 10µM) et l'épinéphrine *(Figure 37)*. On remarque néanmoins la persistance d'une agrégation résiduelle lorsque les plaquettes sont stimulées par de très fortes doses d'ADP (100µM). En revanche, elle est normale et comparable au témoin avec toutes les doses de TRAP-14, le PMA, ainsi que le collagène, l'acide arachidonique et la ristocétine. L'agrégation plaquettaire des HET est normale et comparable à celle du témoin à tous les stimuli testés.

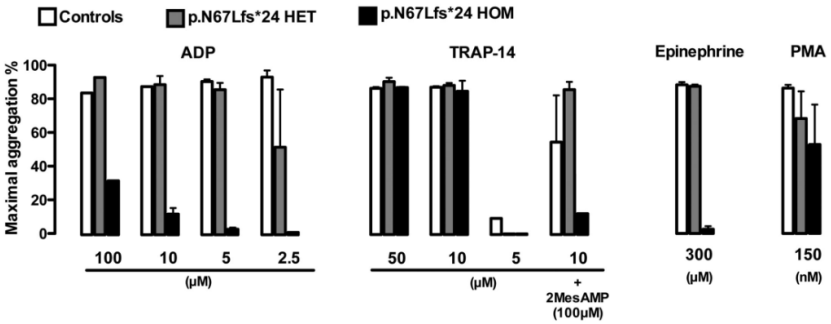

Figure 37 : Agrégation plaquettaire des patients porteurs de la mut2 de *RASGRP2*

Agrégation plaquettaire de témoins et des patients induite par l'ADP, l'épinéphrine, le PMA et le TRAP-14 en absence ou en présence de 2MesAMP. (Données non publiées)

Afin de déterminer l'implication de la voie de l'ADP, via la stimulation du récepteur P2Y12, chez les patients déficitaires en CalDAG-GEFI, l'agrégation plaquettaire des patients HOM et HET mut2 en réponse au TRAP-14 a été étudiée en présence de 2MesAMP, inhibiteur du P2Y12. En l'absence de CalDAG-GEFI, l'agrégation à 10µM de TRAP-14 diminue fortement, démontrant que l'agrégation obtenue après stimulation par le TRAP-14 est totalement dépendante de la sécrétion d'ADP et de la signalisation via le P2Y12.

2.1.2. Mutation 5

La mutation 5 a été identifiée chez un patient américain pour lequel nous ne disposons pas encore d'échantillons sanguins.

Cette mutation non-sens engendre la substitution d'une phénylalanine en sérine en position 497 située deux résidus en amont du domaine C1 ; générant une protéine tronquée de 517 acides aminés.

Le domaine C1 des autres protéines de famille RasGRP (RasGRP1, RasGRP3, RasGRP4) est caractérisé par une forte affinité pour le DAG et les esters de phorbol, qui induisent *in vitro* la translocation de la protéine à la membrane (160). Le domaine C1 de RasGRP2 est atypique car il est de faible affinité pour le DAG (161–163); sa fonction était peu décrite jusqu'en 2011 où l'équipe de Bergmeier *et al* (164) a mis en évidence dans un modèle murin l'importance du domaine C1 dans l'activation plaquettaire dépendante de CalDAG-GEFI. Dans cette étude, la délétion du domaine C1 de la protéine entraine un défaut d'activation CalDAG-GEFI-dépendante de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$, se traduisant par une importante réduction de la formation des thrombi. A ce jour, on ne sait pas de quelle manière le domaine C1 contribue à la fonction de la protéine CAlDAG-GEFI.

2.2. Objectifs

La caractérisation des conséquences des mutations nouvellement identifiées du gène *RASGRP2* sur les fonctions plaquettaires tend à répondre à deux objectifs principaux :

- Etudier l'implication de CalDAG-GEFI dans la signalisation « outside-in » de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$.

  Nous analyserons les conséquences fonctionnelles d'un déficit complet ou partiel en CalDAG-GEFI sur l'adhésion et l'étalement plaquettaires, grâce à l'exploration des patients porteurs de la mut2 de *RASGRP2.*

- Explorer le rôle du domaine C1 dans la localisation intracellulaire de la protéine CalDAG-GEFI en comparant, *in vitro,* la localisation de la forme native de CalDAG-GEFI et de :
  - la forme mutée (mut5 de *RASGRP2*)
  - la forme tronquée (délétion du domaine C1)

2.3. Matériels et méthodes

2.3.1. Isolement plaquettaire

Le sang est prélevé par ponction veineuse franche dans des tubes contenant du citrate de sodium (0.105M, BD Vacutainer®). Le PRP est obtenu par une première centrifugation du sang total (170g, 10min), puis une seconde centrifugation (570g, 5min) du sang restant. Le PRP recueilli est mis en présence de 1U/mL d'apyrase (Sigma-Aldrich) pendant 5min à 37°C pour maintenir les plaquettes au repos. Après 5min de centrifugation à 1000g, les culots plaquettaires sont remis en suspension dans du TAB (Tyrode Albumine Buffer) contenant 5U/mL d'héparine Choay (Sanofi Aventis), 0.2µg/mL de PGE1 (Sigma-Aldrich) et 0.02U/mL d'apyrase. Après une incubation de 30min à 37°C et ajout de 0.2µg/mL de PGE1, les plaquettes sont centrifugées 5min à 1000g puis suspendues dans 500µl de milieu RPMI (Gibco) contenant 0,02U/mL d'apyrase.

La numération et l'état d'activation plaquettaire sont vérifiés par cytométrie en flux (BD-Accuri® C6). L'état d'activation plaquettaire est déterminé par mesure de l'expression de la P-sélectine (CD62P) en surface plaquettaire avec un anticorps anti-CD62P couplé à un fluorochrome, la phycoérythrine (Anticorps anti-CD62P/PE 12,5µg/mL ; eBioscience).

2.3.2. Adhésion et étalement plaquettaires en condition statique

Les plaquettes lavées sont incubées en présence de PBS ou de chlorure de manganèse $MnCl_2$ 1mM pendant 15min à 37°C, puis déposées sur des lamelles en verre (ThermoScientific) préalablement recouvertes de fibrinogène humain 100µg/ml (LFB). Le $MnCl_2$ force l'intégrine à passer en conformation de « haute affinité » pour ses ligands, indépendamment de la signalisation « inside-out ». Les plaquettes sont ensuite activées à 37°C pendant 1h par l'ADP (2.5, 10 et 100µM), le TRAP-6 (5, 10 et 50µM) ou le PMA (150nM), puis fixées au paraformaldéhyde 2% durant 15min.

Après perméabilisation des membranes plaquettaires par de l'acétone, les plaquettes étalées sont alors incubées avec du PBS contenant la sonde Alexa Fluor®488 phalloidin (1U/mL Life Technologies) pendant 30min afin de marquer l'actine polymérisée ou F-actine (Filamentous-Actine). Les plaquettes sont visualisées à l'aide d'un microscope à fluorescence (Axio-Imager M1 microscope, Zeiss), les photographies sont réalisées avec le logiciel Axiocam MRm (Carl Zeiss) puis analysées à l'aide du logiciel ImageJ (National Institutes of Health). Les images des plaquettes étalées sont analysées manuellement, à raison de six champs microscopiques par condition. (Objectif x40 pour l'étude de l'adhésion et x100 pour celle de l'étalement). L'adhésion est évaluée en dénombrant les plaquettes par champ microscopique. L'étalement

est apprécié en quantifiant le pourcentage de plaquettes formant des filopodes, le nombre de filopodes formés par plaquettes (0, 1-3, 4-6, >6) et le pourcentage de plaquettes formant des lamellipodes.

2.3.3. Construction des plasmides

Mutagenèse dirigée *in vitro*

Avant mon arrivée au laboratoire, les vecteurs d'expression des formes mutées mut2 et mut5 ont été obtenus à partir du vecteur pcDNA3.1 (ThermoScientific) contenant la séquence codante pour le gène *RASGRP2* par mutagenèse dirigée sur plasmide entier à l'aide du kit GENEART Site-Directed Mutagenesis System (Invitrogen).

Construction des vecteurs d'expression de HA-*RASGRP2* forme sauvage (WT) et tronquée (ΔC1)

Les inserts codant pour les formes sauvage et tronquée de *RASGRP2* étiquetés HA (hémagglutinine) et flanqués des sites de reconnaissance des enzymes de restriction HindIII et XhoI sont générés par PCR à partir du plasmide contenant la forme sauvage de *RASGRP2*. Ces PCR sont réalisées en utilisant des amorces complémentaires des extrémités des inserts *(Tableau 6)* et comportant les sites de restriction des deux enzymes. Les inserts purifiés et le plasmide pcDNA3.1 sont digérés par les enzymes de restriction HindIII et XhoI, puis la ligation est réalisée à l'aide de la trousse Quick Ligation™ (New England Biolab) selon les recommandations du fournisseur.

Tableau 6 : Séquences nucléotidiques des amorces utilisées pour la construction des vecteurs d'expression de HA-*RASGRP2* formes sauvage (WT) et tronquée (CalDAG-GEFI ΔC1)

	Séquences des amorces
Sens	5' GGGAAGCTTACGCGTGCCACCATGTACCCATACGATGTT CCAGATTACGCTATGGCAGGCACCCTGGACCTGGAC 3'
Antisens *RASGRP2* forme sauvage	5' CCCTCGAGGCTAGCTTACAAGTGGA 3'
Antisens *RASGRP2* forme tronquée	5' CCCTCGAGGCTAGCTTATACGAAGCCCATGCGCCCCCCC 3'

Nous utilisons les bactéries compétentes NEB 5-alpha Competent *E.Coli* pour la transformation des plasmides. La purification des vecteurs est réalisée à l'aide la trousse

QIAprep Spin Miniprep (QIAGEN). Les constructions sont vérifiées par coupure enzymatique et migration sur gel d'agarose puis séquencage ; la quantification est réalisée par spectrophotométrie (Biodrop). L'expression des formes sauvage et tronquée (HA-CalDAG-GEFI WT et HA-CalDAG-GEFI ΔC1) dans les cellules GripTite® 293 MSR transfectées avec la forme sauvage et la forme tronquée de HA-CalDAG-GEFI est vérifiée par technique de Western Blot à l'aide d'anticorps anti-CalDAG-GEFI et anti-HA (*Figure 38*).

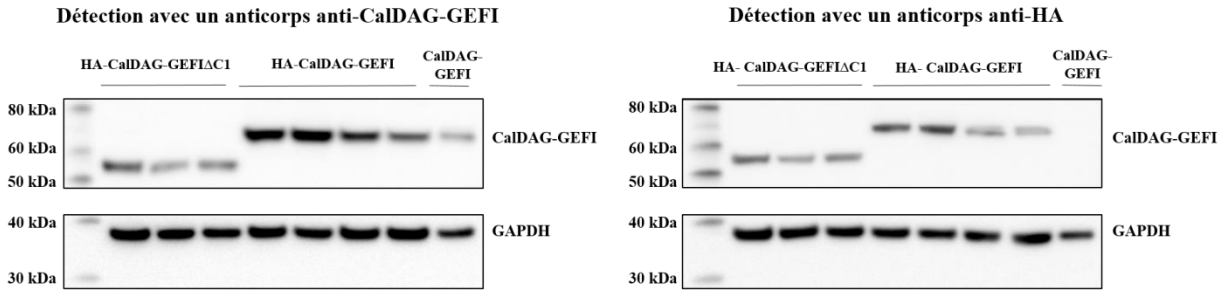

Figure 38 : Expression cellulaire de HA-CalDAG-GEFI WT et ΔC1

Détection de HA-CalDAG-GEFI et de CalDAG-GEFI dans des cellules GripTite® 293 MSR transfectées avec la forme sauvage (4 clones) et tronquée (ΔC1, 3 clones) de HA-CalDAG-GEFI ainsi que la forme sauvage de CalDAG-GEFI à l'aide d'anticorps anti-CalDAG-GEFI et anti-HA.

2.3.4. Transfection des cellules GripTite® 293 MSR et HeLa

Le fractionnement des organites subcellulaires se fait à partir de cellules GripTite® 293 MSR (ThermoFisher Scientific) ; les analyses par immunofluorescence sur des cellules GripTite® 293 MSR (ThermoFisher Scientific) ou des cellules Hela (ATCC®).

Les cellules sont transfectées à l'aide du réactif de transfection PolyJet® (SignaGen Laboratories). Les cellules ont été mises en culture 18 à 24h avant la transfection dans une plaque 24 puits ; chaque puit contenant 500µL de milieu de culture. (Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM) pour les cellules GripTite®-293 MSR contenant 10% de sérum de veau fœtal, 1% d'acides aminés non essentiels, 1% de L-glutamine, 0,5% de pénicilline-streptomycine ; et Eagle's minimal essential medium (EMEM) pour les cellules HeLa contenant 10% de sérum de veau fœtal, 1% de L-glutamine et 1% de pénicilline-streptomycine). Pour l'analyse en immunofluorescence, des lamelles en verre sont préalablement placées dans les puits. Les cellules sont alors transfectées avec 500ng d'ADN plasmidique ; le ratio utilisé du réactif de transfection PolyJet® (µL)/ADN (µg) est de 3/1. Le PolyJet® est incubé avec l'ADN plasmidique dans un milieu complet DMEM pendant 15 minutes à température ambiante pour formation des complexes ADN plasmidique-PolyJet®,

puis déposé dans les puits contenant les cellules à transfecter. Les complexes vont alors pénétrer à l'intérieur des cellules par endocytose, l'ADN plasmidique est libéré dans le cytoplasme, puis rejoint le noyau pour intégrer le génome cellulaire. Le PolyJet® est rapidement dégradé dans le cytoplasme, ce qui limite sa toxicité cellulaire. Douze à dix-huit heures après la transfection, le milieu de culture est remplacé par du milieu DMEM. Les cellules seront utilisées pour le fractionnement des organites subcellulaires ou l'analyse en immunofluorescence 48h après la transfection.

2.3.5. Fractionnement des organites subcellulaires

Une partie des cellules est stimulée 15min avec 10nM du phorbol 12-mystirate 13-acetate (PMA, Sigma-Aldrich) ; une autre avec 10µM d'ionophore calcique, A23187 (Sigma-Aldrich). Les cellules GripTite® 293 MSR (ThermoFisher Scientific) sont ensuite mises en suspension dans un milieu hypotonique contenant 0.25M de sucrose, 1mM d'EDTA, 10mM de Tris-HCl, 0.2mM de $MgCl_2$, 5mM KCl, 1mM NaF et 1mM Na_3VO_4 ; pH 7,4. La suspension cellulaire est passée plusieurs fois à travers une aiguille de 0.33mm de diamètre afin d'obtenir un homogénat cellulaire. Le fractionnement des organites subcellulaires s'effectue grâce à une centrifugation par sédimentation différentielle basée sur la différence de densité des organites, comme décrit dans la *figure 39 (165)*. Une première centrifugation est effectuée à 1000g pendant 10min. Le surnageant est centrifugé à son tour 10min à 15000g. Enfin, une ultra centrifugation à 100000g durant 60min est effectuée sur le surnageant de la deuxième centrifugation. Tous les culots sont remis en suspension dans un tampon de lyse RIPA (Sigma Aldrich). Toutes ces étapes sont réalisées à 4°C.

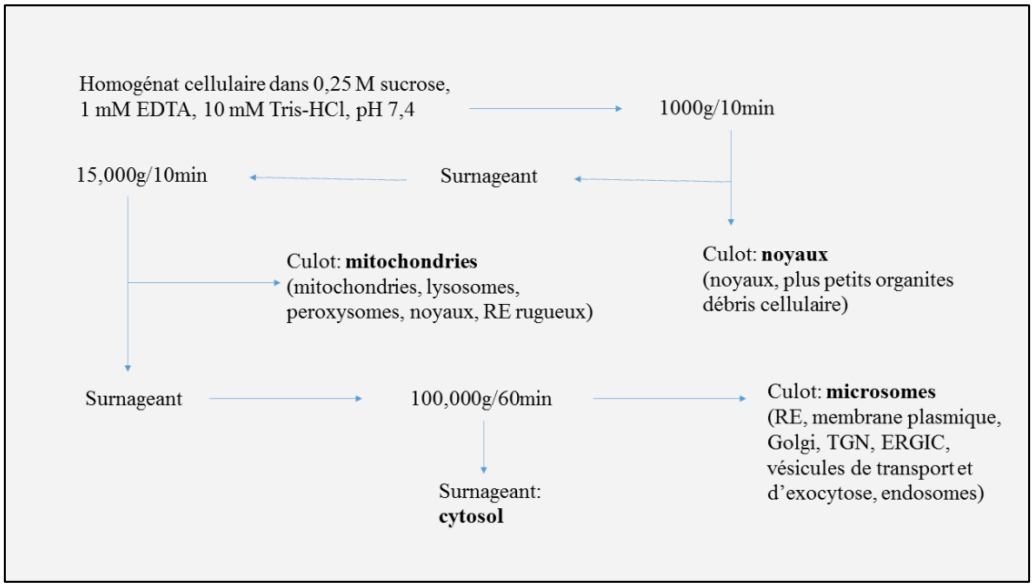

Figure 39 : Organigramme de centrifugation différentielle d'un homogénat cellulaire montrant la composition attendue des culots obtenus

Le texte en gras indique les composants dominants dans le culot décrit.

(RE : Réticulum endoplasmique ; TGN : Trans Golgien Network ; ERGIC: Endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment)

Adapté de Graham J. (165)

2.3.6. Détection des protéines par Western Blot

La quantité de protéines contenue dans les lysats cellulaires est déterminée à l'aide du kit de dosage Acide BiCinchoninique (BCA Assay®, Sigma Aldrich).

Le Western blot est ensuite réalisé à l'aide du système MES NuPAGE® (Life technologies). Les échantillons sont mis en présence d'un tampon de charge (LDS Sample Buffer, Life technologies) et d'un tampon dénaturant (Sample Reducing Agent, Life technologies). Après dénaturation 10min à 70°C, les échantillons sont chargés sur un gel de polyacrylamide 4-12% (NuPAGE® Novex® Bis-Tris-Gel, Life technologies). Les marqueurs de taille utilisés sont le marqueur visible SeeBlue® et le marqueur chimioluminescent MagicMark™ (Invitrogen).

Après migration des protéines en tampon de migration (MES SDS Running Buffer NuPAGE, Life technologies) pendant 30min à 80V puis 45min à 120V, le gel est mis au contact d'une membrane Polyvinylidene Difluoride (PVDF, Millipore) pour transfert des protéines par capillarité. Le transfert s'effectue pendant 60min à 30V dans un tampon de transfert (NuPAGE Transfert Buffer, Life Technologies). La membrane est saturée 60min avec du Blotto 5% (lait écrémé à 5% dans du tampon Tris-Saline Tween (TST) 1X). La membrane est incubée avec les anticorps primaires dilués à leur concentration d'utilisation dans du Blotto 0,5% (*Tableau 7*) une nuit à 4°C sous agitation modérée. La membrane est ensuite incubée avec l'anticorps secondaire adapté à l'espèce et conjugué à l'enzyme HRP (horseradish peroxidase) 60min sous agitation. La révélation des protéines sur la membrane est réalisée à l'aide des réactifs du kit Novex® ECL HRP Chemiluminescent Substrate Reagent (Invitrogen) contenant le réactif de peroxyde d'hydrogène et une solution de luminol. L'enzyme HRP couplée à l'anticorps secondaire catalyse l'oxydation du luminol permettant ainsi l'émission de lumière à 425nm. Cette chimioluminescence est détectée par imagerie numérique de type CCD (Charge-Coupled Device) avec l'appareil ImageQuant™ LAS 4000 (GE Healthcare) et le logiciel ImageQuant™ TL (GE Healthcare).

Tableau 7 : Tableau récapitulatif des différents anticorps primaires et secondaires utilisés en Western blot en fonction de la protéine/étiquette cible

(HA : étiquette hémagglutinine)

Protéine /étiquette cibles	Taille	Anticorps	Référence	Conjugué	Concentration initiale	Dilution utilisée
CalDAG-GEFI	69 kDa	Anti-RasGRP2 lapin polyclonal	Abcam Ab126039	-	0.63mg/mL	1/500
HA	-	Anti-HA lapin polyclonal	Santa Cruz sc-805 (Y-11)	-	0.1mg/mL	1/1000
GAPDH	37 kDa	Anti-GAPDH souris monoclonal	Millipore MAB374	-	1mg/mL	1/40000
II^{aire}		chèvre anti-lapin	Bio-Rad 170-6515	HRP	1mg/mL	1/10000
II^{aire}		chèvre anti-souris	Bio-Rad 170-6516	HRP	1mg/mL	1/10000

2.3.7. Analyse par immunofluorescence

Les cellules HeLa préalablement transfectées et fixées dans une solution saline contenant du paraformaldéhyde 1% pendant 15min sont perméabilisées à l'aide d'une solution de Triton X-100 (Sigma Aldrich) à 0.3%. Les cellules GripTite® 293 MSR préalablement transfectées sont quant à elle fixées dans une solution saline contenant du paraformaldéhyde 4% pendant 15min puis perméabilisées à l'aide d'une solution contenant 0.1% de Triton X-100 (Sigma Aldrich) et 1% de BSA (bovine serum albumin).

Les sites non spécifiques sont saturés par une solution de BSA à 1% diluée dans du PBS pendant 60min.

Les cellules sont incubées avec l'anticorps primaire dilué à sa concentration d'utilisation *(Tableau 8)* dans une solution de PBS-BSA 1% une nuit à 4°C. Les cellules sont ensuite incubées avec l'anticorps secondaire adapté à l'espèce pendant 60min. La F-actine est marquée par incubation des cellules durant 30min avec la TRITC-phalloidine (*Tableau 8*). Les lamelles sont montées sur lames avec un milieu de montage (DAPI Fluoromount-G, SouthernBiotech) contenant du diamidino-2-phénylindole (DAPI) (*Tableau 8*) ; les cellules observées au microscope à fluorescence (Axio-Imager M1 microscope, Zeiss) aux objectifs

x40 et x100 en immersion. La TRITC-phalloïdine et le DAPI sont des sondes fluorescentes spécifiques respectivement de la F-actine et de l'ADN.

Tableau 8 : Tableau récapitulatif des différents anticorps primaires et secondaires et des sondes utilisés en immunomarquage en fonction de la cible
(TRITC : tetramethyl rhodamine Isothiocyanate ; DAPI : diamidino-2-phénylindole)

Cible	Anticorps/sonde	Référence	Conjugué	λ (nm) excitation /émission	Concentration initiale	Dilution utilisée
HA	Anti-HA lapin polyclonal	Santa Cruz sc-805 (Y-11)	-	-	0.1mg/mL	1/50
F-actine	Phalloidine	Cytoskeleton PHDR1	TRITC	535/585	14µM	1/142
ADN	DAPI	SouthernBiotech 0100-20	-	355/455	-	-
II^{aire}	chèvre anti-lapin	Invitrogen A-11008	Alexa Fluor® 488	495/519	2mg/mL	1/500

2.3.8. Analyses statistiques

Les analyses statistiques sont réalisées à l'aide du logiciel GraphPad Prism ; nous utilisons le test ANOVA et le test de comparaison multiple Bonferroni. Les résultats sont exprimés en moyenne±SEM (erreur standard de la moyenne). Une valeur de $p<0.05$ est considérée comme statistiquement significative.

2.4. Résultats

2.4.1. Implication de CalDAG-GEFI dans la signalisation « outside-in » de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$

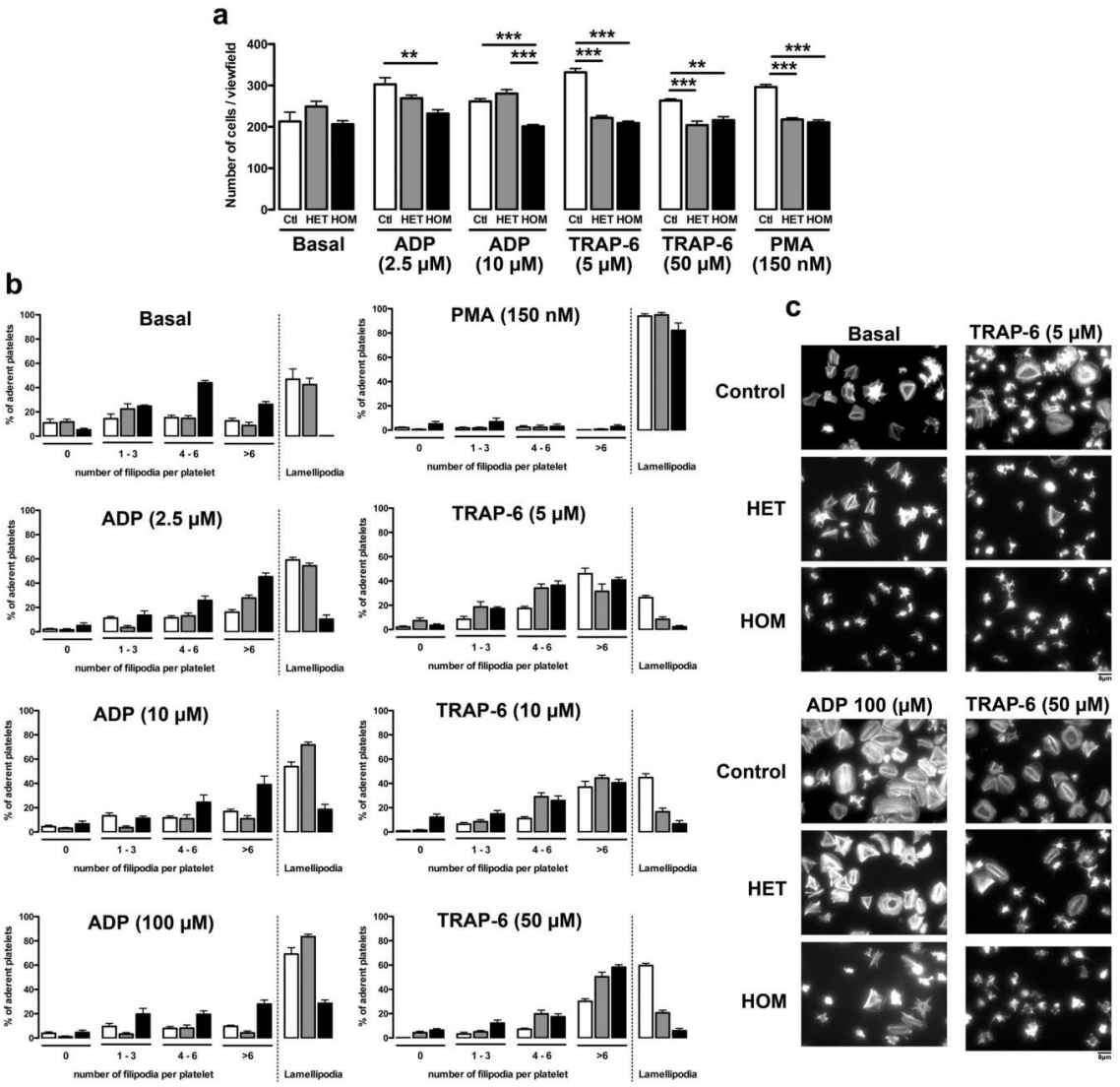

Figure 40 : Etude de l'adhésion et de l'étalement plaquettaires en l'absence de CalDAG-GEFI

*(a) Adhésion statique des plaquettes des patients homozygote (noir), hétérozygote (gris), et des sujets témoins (blanc) sur du fibrinogène (Test ANOVA, test de comparaison multiple Bonferroni; Moyenne±SEM en nombre de cellules/champ microscopique sur 6 champs microscopiques différents; **, p<0.01 ; ***, p< 0.001) (b) Etalement plaquettaire sur fibrinogène des patients des patients homozygote, hétérozygote, et des sujets contrôles (n=2) sur du fibrinogène. (Moyenne±SEM en % de plaquettes adhérentes sur 6 champs microscopiques différents) (c) Images représentatives de l'étalement plaquettaire des patients homozygote, hétérozygote, et des sujets témoins à l'état basal et en présence d'ADP, de TRAP-6 et de PMA.*

CalDAG-GEFI est impliquée dans l'adhésion plaquettaire

Afin d'évaluer le rôle de CalDAG-GEFI dans l'adhésion totale, nous avons testé la capacité des plaquettes provenant des patients HOM et HET pour mut2 à fixer le fibrinogène en condition statique. En l'absence de stimulation, le niveau d'expression de CalDAG-GEFI n'influence pas le nombre de plaquettes adhérentes par champ microscopique. (*Figure 40a)*

Cependant, aucun des stimuli testés (ADP, TRAP-6, PMA) n'augmente la capacité des plaquettes des patients HOM à fixer le fibrinogène ; alors qu'ils augmentent la capacité d'adhésion des plaquettes des sujets contrôles. Chez les HET, seul l'ADP 10µM augmente l'adhésion plaquettaire. En présence de tous les stimuli testés, les plaquettes des patients HOM ont une capacité d'adhésion significativement inférieure à celles des plaquettes des sujets contrôles. Après stimulation par le TRAP-6 (5 et 50µM) et le PMA, l'adhésion des plaquettes des patients HET est également diminuée par rapport à celle des sujets contrôles.

L'absence de CalDAG-GEFI entraine un défaut d'étalement plaquettaire

Par la suite, nous avons étudié les conséquences de l'absence de CalDAG-GEFI sur l'étalement plaquettaire sur du fibrinogène. Les plaquettes déficientes en CalDAG-GEFI (patients HOM) forment des filopodes mais ne parviennent pas à former de lamellipodes. *(Figure 40b et c)* L'incubation avec des doses faibles, intermédiaires ou fortes d'ADP et de TRAP-6 entraine une augmentation du nombre de filopodes formés, mais ne restaure pas la capacité des plaquettes des patients HOM à former des lamellipodes. Il est intéressant de noter que chez les patients déficients en CalDAG-GEFI (HOM), 50µM de TRAP-6 induisent pourtant une activation de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ indépendamment de la voie de signalisation du P2Y12 objectivée par une agrégation plaquettaire normale. De plus, l'ajout de Mn^{2+}, qui force l'intégrine à passer en conformation de « haute affinité » indépendamment de la signalisation «inside-out », ne permet pas de restaurer un étalement plaquettaire normal *(Figure 41)*. Ces résultats suggèrent l'importance de CalDAG-GEFI dans l'étalement plaquettaire, y compris dans des conditions de stimulation où l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ est en conformation de « haute affinité » pour le fibrinogène.

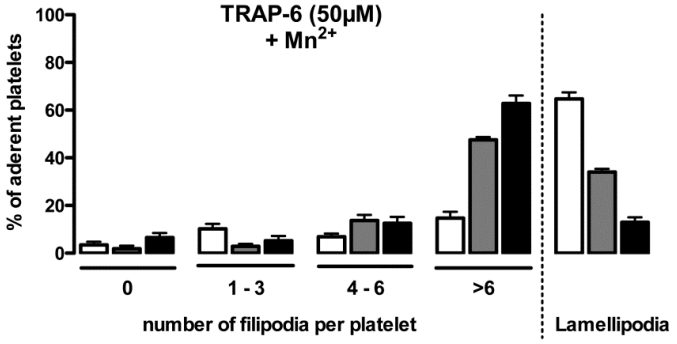

Figure 41 : Effet de l'ajout de Mn^{2+} sur l'étalement plaquettaire en présence de TRAP-6 chez les patients déficients en CalDAG-GEFI

Etalement plaquettaire sur fibrinogène des patients des patients homozygote (noir), hétérozygote (gris), et des sujets contrôles (blanc) (n=2) sur du fibrinogène en présence de TRAP-6 50µM et de Mn^{2+} 1mM (Moyenne±SEM en % de plaquettes adhérentes sur 6 champs microscopiques différents)

Chez les patients hétérozygotes, nous n'observons pas de défaut d'étalement à l'état basal et après stimulation à l'ADP. Etonnamment, après stimulation à toutes les doses de TRAP, les plaquettes HET mut2 ne parviennent presque pas à former de lamellipodes.

Notons que le PMA normalise l'étalement plaquettaire indépendamment du niveau d'expression de CalDAG-GEFI, laissant penser que la voie de signalisation PKC-dépendante assurant la signalisation « inside-out » en contournant CalDAG-GEFI est également efficace dans la signalisation « outside-in ».

2.4.2. Rôle du domaine C1 de CalDAG-GEFI dans la localisation intra cellulaire de la protéine

Les formes native et mutée (mut5 de *RASGRP2*) de CalDAG-GEFI ont une localisation intra cellulaire différente in vitro

Pour explorer l'hypothèse d'une implication du domaine C1 de CalDAG-GEFI dans sa localisation intra cellulaire, nous avons tout d'abord comparé la localisation des formes native et mutée (mut5 de *RASGRP2*) de CalDAG-GEFI. Cette mutation non-sens engendre la substitution d'un acide aminé situé deux résidus en amont du domaine C1, générant une protéine tronquée de 517 acides aminés dont la séquence d'acides aminés de 498 à 517 est différente de la forme native de CalDAG-GEFI.

La forme native est principalement localisée dans les mitochondries et dans les microsomes, alors que la forme mutée de CalDAG-GEFI est majoritairement retrouvée dans le cytosol de la cellule, non associée aux organites subcellulaires *(Figure 42)*.

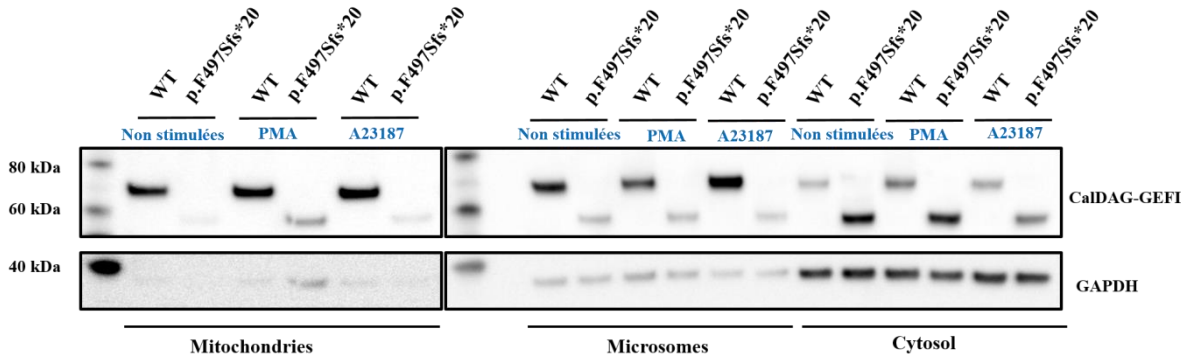

Figure 42 : Localisation subcellulaire des formes native (WT) et mutée (mut5 de *RASGRP2*) de CalDAG-GEFI

Détection de CalDAG-GEFI dans les organites subcellulaires fractionnés grâce à une centrifugation par sédimentation différentielle à partir de cellules GripTite® 293 MSR transfectées avec la forme sauvage et la forme mutée (mut5 de RASGRP2) de CalDAG-GEFI. Les cellules sont stimulées ou non avec 10nM de PMA et 10µM d'ionophore calcique (A23187).

Nous avons ensuite testé l'effet de deux stimuli sur la localisation intra cellulaire de la protéine : un ionophore calcique car, dans la plaquette, CalDAG-GEFI active Rap1b - protéine membranaire - en réponse à une augmentation de la concentration calcique ; et le PMA, analogue du DAG, connu pour entrainer la translocation à la membrane des protéines de la famille RasGRP (160). Aucun des deux stimuli testés n'affecte la localisation subcellulaire de CalDAG-GEFI dans notre modèle cellulaire. Ce résultat était attendu pour le PMA compte tenu de la faible affinité de la protéine pour le DAG (161–163).

Ces résultats suggèrent que le phénotype hémorragique du patient porteur de la mutation 5 de *RASGRP2* pourrait être attribué à une mauvaise localisation de CalDAG-GEFI, alors inapte à activer la protéine membranaire Rap1b.

La localisation intra cellulaire de la protéine CalDAG-GEFI est régulée in vitro par son domaine C1

En vue de confirmer le rôle du domaine C1 de CalDAG-GEFI dans la localisation intra cellulaire de la protéine, nous avons généré un plasmide codant pour la forme tronquée de CalDAG-GEFI avec absence totale du domaine C1, et comparé la localisation subcellulaire des formes native et tronquée de la protéine par immunohistochimie. Afin d'augmenter la spécificité de la détection de CalDAG-GEFI, nous avons étiqueté nos protéines CalDAG-GEFI WT et CalDAG-GEFIΔC1 d'une séquence hémagglutinine (HA) en position N-

terminale ; nous permettant ainsi de détecter notre protéine avec un anticorps dirigé contre l'étiquette HA (*Tableau 8*).

Nous avons réalisé un marquage de la protéine CalDAG-GEFI, de la F-actine et des noyaux dans des cellules HeLa transfectées avec les formes sauvages et tronquée (CalDAG-GEFI ΔC1) de la protéine. Nous n'observons pas de localisation spécifique de la protéine dans ce modèle cellulaire *(Figure 43)*. Notons cependant qu'aucune des deux formes de CalDAG-GEFI n'est associée à la membrane plasmique. Par cette technique, nous ne mettons pas en évidence de différences majeures de localisation entre les deux formes dans ce modèle cellulaire.

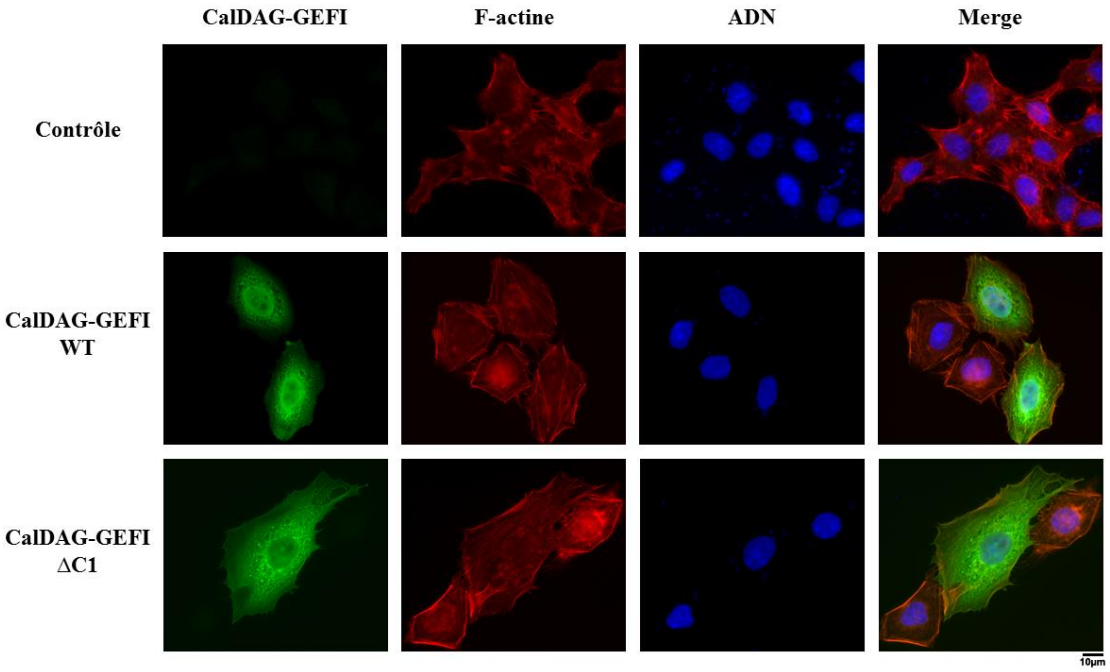

Figure 43 : Images représentatives de la localisation subcellulaire des formes native (WT) et tronquée (ΔC1) de la protéine CalDAG-GEFI dans des cellules HeLa

La F-actine, l'ADN et la protéine CalDAG-GEFI sont marqués in vitro à partir de cellules HeLa transfectées avec les plasmides codant pour les formes native et tronquée (ΔC1) de la protéine CalDAG-GEFI.

Les fractionnements d'organites subcellulaires montrant des différences de localisation entre les formes sauvage et tronquée de CalDAG-GEFI ont été réalisés à partir de cellules GripTite® 293 MSR. Nous avons donc reproduit les analyses d'immunohistochimie sur ce même modèle cellulaire. Pour la forme sauvage de la protéine, le marquage s'organise en de

multiples amas dans l'ensemble dans la cellule, avec une localisation préférentielle dans des zones péri nucléaires et à la membrane plasmique. A l'inverse, la forme tronquée a une localisation diffuse dans le cytosol *(Figure 44)*.

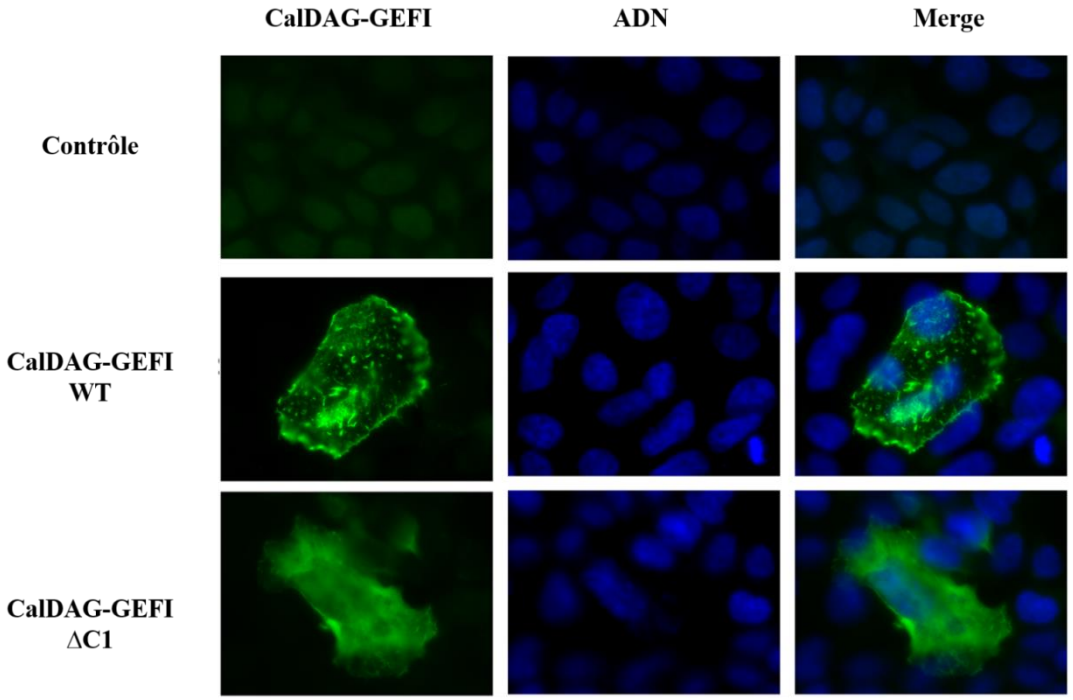

Figure 44 : Images représentatives de la localisation subcellulaire des formes native (WT) et tronquée (ΔC1) de la protéine CalDAG-GEFI dans des cellules GripTite® 293 MSR

L'ADN et la protéine CalDAG-GEFI sont marqués in vitro à partir de cellules GripTite® 293 MSR transfectées avec les plasmides codant pour les formes native et tronquée (ΔC1) de la protéine CalDAG-GEFI.

Les résultats obtenus dans ce modèle cellulaire concordent avec les différences observées par méthode de fractionnement subcellulaire et sont en faveur d'un rôle régulateur du domaine C1 dans la localisation subcellulaire de CalDAG-GEFI.

2.5. Discussion

Notre équipe a précédemment rapporté la première mutation (p.G248W) du gène *RASGRP2* identifiée chez l'homme. Cette mutation faux sens, localisée au niveau du domaine catalytique CDC25 de la protéine, est responsable d'un déficit qualitatif en CalDAG-GEFI : elle conduit à un défaut d'activation de Rap1b sans affecter l'expression de la protéine.
L'identification plus récente d'autres mutations de *RASGRP2* chez l'homme, entrainant un déficit quantitatif de CalDAG-GEFI, nous apportent de nouvelles pistes d'exploration et permettent de mieux connaître la place de la protéine CalDAG-GEFI dans les signalisations « inside-out » et « outside-in » plaquettaires.

Dans ce travail, nous montrons l'implication de la protéine CalDAG-GEFI à la fois dans l'adhésion et l'étalement plaquettaires sur fibrinogène. Il s'agit de la première étude montrant un défaut d'adhésion et d'étalement en l'absence complète de CalDAG-GEFI. L'équipe de Lozano *et al.*(166) a très récemment rapporté deux mutations du gène *RASGRP2*, dont une mutation non-sens. Dans leur étude, ils n'observent pas de différence significative entre la surface moyenne d'une plaquette étalée d'un patient homozygote et celle d'un témoin, et concluent que l'étalement plaquettaire n'est pas affecté par l'absence de CalDAG-GEFI. Cependant, le nombre de plaquettes adhérentes, les différents stades de l'étalement plaquettaire ainsi que la réponse aux agonistes solubles n'ont pas été étudiés ; ces différences de méthodologie peuvent expliquer les discordances avec nos résultats. De plus, notre équipe avait déjà objectivé ces défauts d'adhésion et d'étalement des plaquettes de patients porteurs de la mutation p.G248W, exprimant une forme inactive de CalDAG-GEFI.
En l'absence de stimulation, nous mettons en évidence un blocage de l'étalement plaquettaire chez les patients HOM mut2 au stade de filopodes comme précédemment observé chez les patients porteurs de la mutation p.G248W (140). La stimulation par de fortes doses d'ADP ne restaure que faiblement la formation de lamellipodes, hypothétiquement par une inhibition de la GAP RASA3 via la stimulation de la voie du P2Y12 (77). Le TRAP-6, même à forte dose, ne parvient pas à corriger l'étalement des plaquettes des patients HOM, alors que l'agrégation, quant à elle, est restaurée. Dans ces conditions, l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ est pourtant activée, reflet d'une signalisation « inside-out » fonctionnelle. De surcroit, l'ajout de Mn^{2+} ne permet pas de restaurer un étalement normal. Ces résultats montrent l'implication de la protéine CalDAG-GEFI dans la signalisation « outside-in » de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ outre son rôle dans la signalisation « inside-out ». CalDAG-GEFI pourrait intervenir de manière directe ou indirecte

dans l'activation de Rac1, la Rho GTPase contrôlant la formation des lamellipodes au cours de l'étalement plaquettaire. Il a d'ailleurs été montré chez des souris déficientes à la fois en CalDAG-GEFI et P2Y12 que l'activation de Rac1 est dépendante de la fixation du GTP à Rap1b (167). Le mécanisme précis permettant à Rap1b-GTP de réguler Rac1 dans les plaquettes reste à élucider. Dans d'autres types cellulaires comme les fibroblastes et les leucocytes, différentes Rac-GEFs interagissent spécifiquement avec Rap1b-GTP régulant ainsi l'activation et/ou la localisation cellulaire des Rac-GEF (168,169).

Après stimulation au PMA, nous ne retrouvons aucune altération de l'étalement chez les patients porteurs de la mut2 de *RASGRP2.* Le PMA active directement les PKC et permet ainsi une activation de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ indépendamment de CalDAG-GEFI. Ce résultat atteste que les plaquettes des patients ont une capacité d'étalement similaire à celle des témoins. Ils suggèrent aussi l'existence d'une voie de contournement de CalDAG-GEFI au cours de la signalisation « outside-in » similaire à celle mise en évidence pour la signalisation « inside-out ».

Chez les patients hétérozygotes mut2, nous n'avons pas observé de défaut d'étalement à l'état basal et après stimulation à l'ADP. Il est intéressant de noter que chez les patients hétérozygotes pour la mutation p.G248W, les plaquettes n'arrivaient pas à former de lamellipodes et restaient bloquées au stade de filopodes (140). Cette différence pourrait être expliquée, au moins en partie, par des variations d'expression ou d'activité de l'allèle non mutée, modifiant la réactivité plaquettaire. La mutation p.G248W pourrait aussi conférer à la forme inactive de CalDAG-GEFI un effet dominant négatif, réduisant l'interaction de la forme native de CalDAG-GEFI avec le(s) ligand(s) impliqué(s) dans l'étalement plaquettaire.

Après stimulation au TRAP-6 en revanche, les plaquettes HET mut2 ne parviennent presque pas à former de lamellipodes. Il est pourtant acquis que la stimulation au TRAP-6 entraine une sécrétion d'ADP. Dans nos conditions expérimentales, nous pouvons penser que l'ADP secrété dans le milieu par les plaquettes est trop fortement dilué et ne peut modifier leur réactivité. L'effet observé serait donc dû à la signalisation TRAP-6 uniquement via les récepteurs PAR indépendamment de l'amplification de l'activation plaquettaire générée par la sécrétion granulaire. Ces données soulignent le rôle essentiel joué par la voie de l'ADP au cours de l'étalement plaquettaire, en particulier en présence d'une quantité réduite de CalDAG-GEFI.

En 2011, l'équipe de Bergmeir et al. (164) a généré, via une approche rétrovirale, des souris chimériques exprimant CalDAG-GEFIΔC1 dans les cellules sanguines. La délétion du

domaine C1 de la protéine diminuait fortement l'activation de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ dépendante de CalDAG-GEFI, entrainant une importante réduction de la formation des thrombi in vivo. L'agrégation plaquettaire, tout comme l'adhésion en condition de flux des plaquettes CalDAG-GEFIΔC1 sont fortement diminuées par rapport à celles des plaquettes exprimant la forme sauvage de la protéine. Les fonctions plaquettaires sont tout de même moins affectées que chez les souris totalement déficientes en CalDAG-GEFI. A ce jour, aucune étude ne décrit de quelle manière le domaine C1 contribue à la fonction de la protéine CalDAG-GEFI. Nous avons émis l'hypothèse que les conséquences sur les fonctions plaquettaires de l'absence du domaine C1 de CalDAG-GEFI pourraient-être dues à une mauvaise localisation de la protéine dans la plaquette. L'étude de la mutation 5 de CalDAG-GEFI située deux acides aminés en amont du domaine C1 nous donne l'opportunité d'explorer cette hypothèse. Selon la littérature, CalDAG-GEFI est localisée principalement dans le cytoplasme, et migre à la membrane après stimulation (170).

Dans ce travail, nous mettons en évidence une différence de localisation *in vitro* entre les formes sauvage et mutée de la protéine ; la forme sauvage est principalement localisée dans des fractions cellulaires mitochondriales et microsomales, potentiellement à la membrane plasmique où se situe la protéine Rap1b (171) – cible de CalDAG-GEFI. La forme mutée, quant à elle, est retrouvée majoritairement dans le cytosol. Nous pouvons supposer que le phénotype hémorragique du patient soit dû à une mauvaise localisation de la protéine CalDAG-GEFI qui, ne pouvant s'associer à des organites intracellulaires et/ou à la membrane plasmique, ne parvient pas à activer Rap1b entrainant un défaut d'activation de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$. Ce travail nécessite d'être complété par une étude des conséquences de cette mutation sur l'activation de Rap1b.

Afin de conforter notre postulat d'une régulation de la localisation de la protéine CalDAG-GEFI par son domaine C1, nous avons étudié la localisation de la protéine tronquée CalDAG-GEFIΔC1 par technique d'imagerie. Pour la forme sauvage, le marquage de la protéine s'organise en de nombreux amas pouvant correspondre à des organites intracellulaires. Nous mettons également en évidence un fort marquage à la membrane plasmique. A l'inverse, la protéine tronquée est localisée de manière diffuse dans le cytosol de la cellule.

Certains auteurs proposent que la localisation de CalDAG-GEFI soit régulée par la liaison de son domaine N-terminal avec la F-actine (170). L'ensemble de nos résultats porte à croire que le domaine C1 joue un rôle tout aussi important en régulant la localisation intracellulaire de la protéine. Les domaines C1 sont également connus pour être des domaines d'interaction protéique (172), notamment avec la protéine 14-3-3 (173) et les Ras GTPases (174),

impliquées dans la signalisation « inside-out » des intégrines. Des études supplémentaires sont nécessaires pour élucider ces mécanismes encore inconnus.

En conclusion, nous rapportons pour la première fois un défaut d'adhésion et d'étalement plaquettaires en l'absence complète de CalDAG-GEFI, et apportons la démonstration d'une implication de la protéine dans la signalisation « outside-in » de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$. Nous impliquons le domaine C1 de CalDAG-GEFI dans la régulation de la localisation subcellulaire de la protéine. Nos résultats permettent de mieux comprendre la contribution du domaine C1 à la fonction de la protéine.

La caractérisation des conséquences des mutations nouvellement identifiées dans le gène *RASGRP2* sur les fonctions plaquettaires enrichit de nouvelles connaissances la physiologie et la biologie des plaquettes, et positionne la protéine CalDAG-GEFI comme effecteur clé de la signalisation intra plaquettaire. Ces travaux permettent également d'évaluer la pertinence de son inhibition partielle en thérapeutique. L'expression restreinte de CalDAG-GEFI à peu de types cellulaires (principalement le striatum et les cellules d'origine hématopoïétique) devrait limiter la toxicité de son inhibition. Le cerveau est protégé de l'effet des drogues grâce à la barrière hémato-méningé ; l'effet secondaire redouté est donc l'inhibition de la protéine dans les leucocytes et plus particulièrement dans les polynucléaires neutrophiles. Des études menées sur des souris CalDAG-GEFI -/- révèlent des défauts d'activation des intégrines leucocytaires β1 et β2 (176), et suggèrent également le rôle de CalDAG-GEFI dans le chimiotactisme des polynucléaires neutrophiles indépendamment des intégrines (175). Cependant, d'autres études chez le chien ne rapportent aucun défaut de fonction des polynucléaires neutrophiles (176). Chez l'homme, les leucocytes des patients porteurs de la mutation p.G248W de la protéine ont été explorés par notre équipe (140). Cliniquement, ces patients ne présentent pas de signes d'immunodéficience. Les lymphocytes des patients ne présentent qu'un défaut mineur de l'activation de l'intégrine β2, et l'étude des polynucléaires neutrophiles n'objective pas de défauts de génération des espèces réactives de l'oxygène, d'adhésion ni de chimiotactisme. Très récemment, l'équipe de Lozano *et al.* décrit une diminution d'expression de l'intégrine β1 et un défaut d'activation de l'intégrine β2 dans les polynucléaires neutrophiles des patients déficients en CalDAG-GEFI. D'autre part, il est intéressant de noter que, chez l'homme, la présence d'un seul allèle non muté suffit à prévenir les saignements chez les sujets hétérozygotes pour cette mutation. Chez la souris, l'expression

de 10% de CalDAG-GEFI suffit à empêcher le syndrome hémorragique tout en prévenant la thrombose expérimentale (177). Les études futures devront comparer l'impact sur les fonctions plaquettaires d'une inhibition totale ou partielle de CalDAG-GEFI aux thérapies antiplaquettaires courantes (inhibiteur de la voie de l'acide arachidonique et/ou inhibiteur du récepteur à l'ADP P2Y12). Au vu des données précédemment obtenues dans des modèles murins et chez l'homme, cibler un des domaines régulateurs de CalDAG-GEFI, comme le domaine C1 par exemple, pourrait représenter une stratégie antithrombotique innovante.

CONCLUSION

Les thrombopathies constitutionnelles sont des entités rares et hétérogènes en termes de fréquence, de sévérité et de physiopathologie. Etablir un diagnostic précis est crucial devant toute suspicion de thrombopathie constitutionnelle : celui-ci permet de prévenir toute erreur thérapeutique, et de prédire l'évolution de la pathologie, particulièrement dans les formes syndromiques. Le diagnostic d'orientation de thrombopathie d'origine génétique est basé sur les éléments relativement simples : un interrogatoire détaillé à la recherche d'antécédents hémorragiques à prédominance cutanéo-muqueuse, un examen clinique objectivant ou pas des signes cliniques extra-hématologiques, une numération plaquettaire avec appréciation de la taille et de la morphologie des plaquettes, ainsi qu'un un bilan de coagulation standard ; ces examens pouvant être réalisés dans tous les centres hospitaliers. En cas de suspicion de thrombopathie constitutionnelle, le patient sera adressé en seconde intention dans un centre spécialisé en liaison avec le Centre de Référence des Pathologies Plaquettaires (CRPP) afin d'approfondir l'exploration biologique et d'établir un diagnostic de certitude. Plusieurs enquêtes de pratique ont mis en évidence une grande hétérogénéité des approches diagnostiques couramment employées. Les recommandations publiées en 2015 par le SSC de l'ISTH préconisent une approche standardisée facilitant l'orientation diagnostique de ces pathologies rares. En dépit de cette démarche et du nombre de techniques dont nous disposons aujourd'hui pour appréhender les différentes fonctions plaquettaires, un grand nombre de thrombopathies demeurent encore inexpliquées. Leur exploration devrait, dans les années à venir, bénéficier des progrès des nouvelles techniques d'analyse génétique. Le séquençage parallèle de nombreux gènes cibles, qui constitue un outil remarquable d'aide au diagnostic des maladies constitutionnelles rares, est d'ores et déjà possible.

Ces nouvelles approches d'analyse génétique, tel le séquençage d'exome, ont permis, au cours des dernières années, de réaliser des progrès considérables qui ont rapidement abouti à la caractérisation moléculaire et fonctionnelle de plusieurs anomalies responsables de thrombopathies constitutionnelles. Celles-ci représentent un modèle remarquable d'étude de la physiologie plaquettaire, et plus largement cellulaire ; notre travail sur l'exploration d'un déficit en CalDAG-GEFI en est une illustration.

La caractérisation moléculaire de thrombopathies constitutionnelles telles que la thrombasthénie de Glanzmann a, par le passé, servi de base à la mise au point de stratégies antithrombotiques. L'exploration complète de thrombopathies nouvellement rapportées s'avère ainsi d'autant plus intéressante qu'elle pourrait de même contribuer à élaborer de nouvelles stratégies antiplaquettaires innovantes.

BIBLIOGRAPHIE

1. Schultze M. Ein heizbarer Objecttisch und seine Verwendung bei Untersuchungen des Blutes. Arch Für Mikrosk Anat. 1 déc 1865;1(1):1‑42.

2. Bizzozero G. Ueber einen neuen Forrnbestandteil des Blutes und dessen Rolle bei der Thrombose und Blutgerinnung. Arch Für Pathol Anat Physiol Für Klin Med. 1882;90:261‑332.

3. Till JE, McCulloch EA. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. 1961. Radiat Res. août 2012;178(2):AV3-7.

4. Bryder D, Rossi DJ, Weissman IL. Hematopoietic stem cells: the paradigmatic tissue-specific stem cell. Am J Pathol. août 2006;169(2):338‑46.

5. Eaves CJ. Hematopoietic stem cells: concepts, definitions, and the new reality. Blood. 23 avr 2015;125(17):2605‑13.

6. Bluteau D, Lordier L, Di Stefano A, Chang Y, Raslova H, Debili N, et al. Regulation of megakaryocyte maturation and platelet formation. J Thromb Haemost. juill 2009;7:227‑34.

7. Lordier L, Jalil A, Aurade F, Larbret F, Larghero J, Debili N, et al. Megakaryocyte endomitosis is a failure of late cytokinesis related to defects in the contractile ring and Rho/Rock signaling. Blood. 2008;112(8):3164–3174.

8. Junt T, Schulze H, Chen Z, Massberg S, Goerge T, Krueger A, et al. Dynamic Visualization of Thrombopoiesis Within Bone Marrow. Science. 21 sept 2007;317(5845):1767‑70.

9. Laboratoire d'Hématologie Cellulaire du CHU d'Angers [Internet]. [cité 4 déc 2016]. Disponible sur: http://www.hematocell.fr/index.php/enseignement-de-%20lhematologie-cellulaire/plaquettes-sanguines-et-leur-pathologie/24-physiologie-de-la-%20megacaryopoiese

10. Kaushansky K. The molecular mechanisms that control thrombopoiesis. J Clin Invest. 1 déc 2005;115(12):3339‑47.

11. Kuter DJ, Rosenberg RD. The reciprocal relationship of thrombopoietin (c-Mpl ligand) to changes in the platelet mass during busulfan-induced thrombocytopenia in the rabbit. Blood. 15 mai 1995;85(10):2720‑30.

12. Colman RW. Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice. Lippincott Williams & Wilkins; 2006. 1903 p.

13. White JG, Escolar G. The blood platelet open canalicular system: a two-way street. Eur J Cell Biol. déc 1991;56(2):233‑42.

14. Escolar G, Leistikow E, White JG. The fate of the open canalicular system in surface and suspension-activated platelets. Blood. 1 nov 1989;74(6):1983‑8.

15. White JG. The substructure of human platelet microtubules. Blood. oct 1968;32(4):638‑48.

16. Hartwig JH. The Platelet: Form and Function. Semin Hematol. janv 2006;43, Supplement 1:S94‑100.

17. Flaumenhaft R, Dilks JR, Rozenvayn N, Monahan-Earley RA, Feng D, Dvorak AM. The actin cytoskeleton differentially regulates platelet α-granule and dense-granule secretion. Blood. 2005;105(10):3879–3887.

18. Michelson AD, éditeur. Platelets. 3rd ed. London ; Waltham, MA: Academic Press; 2013. 1353 p.

19. Mumford AD, Frelinger AL, Gachet C, Gresele P, Noris P, Harrison P, et al. A review of platelet secretion assays for the diagnosis of inherited platelet secretion disorders: Thromb Haemost. 16 avr 2015;114(1):14‑25.

20. Youssefian T, Massé J-M, Rendu F, Guichard J, Cramer EM. Platelet and Megakaryocyte Dense Granules Contain Glycoproteins Ib and IIb-IIIa. Blood. 1 juin 1997;89(11):4047‑57.

21. Nishibori M, Cham B, McNicol A, Shalev A, Jain N, Gerrard JM. The protein CD63 is in platelet dense granules, is deficient in a patient with Hermansky-Pudlak syndrome, and appears identical to granulophysin. J Clin Invest. avr 1993;91(4):1775‑82.

22. Israels SJ, McMillan EM, Robertson C, Singhory S, McNicol A. The lysosomal granule membrane protein, LAMP-2, is also present in platelet dense granule membranes. Thromb Haemost. avr 1996;75(4):623‑9.

23. Furchgott RF, Vanhoutte PM. Endothelium-derived relaxing and contracting factors. FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol. juill 1989;3(9):2007‑18.

24. Jackson SP. Arterial thrombosis—insidious, unpredictable and deadly. Nat Med. nov 2011;17(11):1423‑36.

25. Kasirer-Friede A, Kahn ML, Shattil SJ. Platelet integrins and immunoreceptors. Immunol Rev. 1 août 2007;218(1):247‑64.

26. Offermanns S. Activation of Platelet Function Through G Protein–Coupled Receptors. Circ Res. 8 déc 2006;99(12):1293‑304.

27. Jandrot-Perrus M, Gratacap M-P, Lhermusier T, Sié P, Payrastre B. Nouvelles molécules ciblées et modulation des fonctions plaquettaires : anticiper, démontrer, gérer, utiliser. Hématologie. 1 oct 2010;16(5):345‑54.

28. Kobe B, Deisenhofer J. The leucine-rich repeat: a versatile binding motif. Trends Biochem Sci. oct 1994;19(10):415‑21.

29. Luo S-Z, Mo X, Afshar-Kharghan V, Srinivasan S, López JA, Li R. Glycoprotein Ibα forms disulfide bonds with 2 glycoprotein Ibβ subunits in the resting platelet. Blood. 15 janv 2007;109(2):603.

30. Lanza F, Gachet C, David T, Mangin P. Signalisation via le complexe GPIb-V-IX plaquettaire. Hématologie. 29 sept 2008;14(4):273‑84.

31. Veyradier A, Fressinaud É, Goudemand J, Meyer D. von Willebrand disease. Hématologie. 1 oct 2011;17(4):278‑88.

32. Fowler WE, Fretto LJ, Hamilton KK, Erickson HP, McKee PA. Substructure of human von Willebrand factor. J Clin Invest. oct 1985;76(4):1491‑500.

33. Siediecki CA, Lestini BJ, Kottke-Marchant KK, Eppell SJ, Wilson DL, Marchant RE. Shear-dependent changes in the three-dimensional structure of human von Willebrand factor. Blood. 15 oct 1996;88(8):2939‑50.

34. Jurk K, Clemetson KJ, de Groot PG, Brodde MF, Steiner M, Savion N, et al. Thrombospondin-1 mediates platelet adhesion at high shear via glycoprotein Ib (GPIb): an alternative/backup mechanism to von Willebrand factor. FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol. août 2003;17(11):1490‑2.

35. Mangin P, Yuan Y, Goncalves I, Eckly A, Freund M, Cazenave J-P, et al. Signaling role for phospholipase C gamma 2 in platelet glycoprotein Ib alpha calcium flux and cytoskeletal reorganization. Involvement of a pathway distinct from FcR gamma chain and Fc gamma RIIA. J Biol Chem. 29 août 2003;278(35):32880‑91.

36. Moroi M, Jung SM, Nomura S, Sekiguchi S, Ordinas A, Diaz-Ricart M. Analysis of the Involvement of the von Willebrand Factor–Glycoprotein Ib Interaction in Platelet Adhesion to a Collagen-Coated Surface Under Flow Conditions. Blood. 1 déc 1997;90(11):4413‑24.

37. Nieswandt B, Watson SP. Platelet-collagen interaction: is GPVI the central receptor? Blood. 15 juill 2003;102(2):449‑61.

38. Watson SP, Auger JM, McCarty OJT, Pearce AC. GPVI and integrin alphaIIb beta3 signaling in platelets. J Thromb Haemost JTH. août 2005;3(8):1752‑62.

39. Zahid M, Mangin P, Loyau S, Hechler B, Billiald P, Gachet C, et al. The future of glycoprotein VI as an antithrombotic target. J Thromb Haemost JTH. déc 2012;10(12):2418‑27.

40. Mammadova-Bach E, Ollivier V, Loyau S, Schaff M, Dumont B, Favier R, et al. Platelet glycoprotein VI binds to polymerized fibrin and promotes thrombin generation. Blood. 30 juill 2015;126(5):683‑91.

41. Xiao T, Takagi J, Coller BS, Wang J-H, Springer TA. Structural basis for allostery in integrins and binding to fibrinogen-mimetic therapeutics. Nature. 4 nov 2004;432(7013):59‑67.

42. Luo B-H, Carman CV, Springer TA. Structural Basis of Integrin Regulation and Signaling. Annu Rev Immunol. 2007;25:619.

43. Varga-Szabo D, Pleines I, Nieswandt B. Cell Adhesion Mechanisms in Platelets. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 1 mars 2008;28(3):403‑12.

44. Sarratt KL, Chen H, Zutter MM, Santoro SA, Hammer DA, Kahn ML. GPVI and α2β1 play independent critical roles during platelet adhesion and aggregate formation to collagen under flow. Blood. 15 août 2005;106(4):1268‑77.

45. Moroi M, Onitsuka I, Imaizumi T, Jung SM. Involvement of activated integrin alpha2beta1 in the firm adhesion of platelets onto a surface of immobilized collagen under flow conditions. Thromb Haemost. mai 2000;83(5):769‑76.

46. Inoue O, Suzuki-Inoue K, Dean WL, Frampton J, Watson SP. Integrin alpha2beta1 mediates outside-in regulation of platelet spreading on collagen through activation of Src kinases and PLCgamma2. J Cell Biol. 3 mars 2003;160(5):769‑80.

47. Wagner CL, Mascelli MA, Neblock DS, Weisman HF, Coller BS, Jordan RE. Analysis of GPIIb/IIIa receptor number by quantification of 7E3 binding to human platelets. Blood. 1 août 1996;88(3):907‑14.

48. Savage B, Saldívar E, Ruggeri ZM. Initiation of platelet adhesion by arrest onto fibrinogen or translocation on von Willebrand factor. Cell. 26 janv 1996;84(2):289‑97.

49. Fredriksson R, Lagerström MC, Lundin L-G, Schiöth HB. The G-Protein-Coupled Receptors in the Human Genome Form Five Main Families. Phylogenetic Analysis, Paralogon Groups, and Fingerprints. Mol Pharmacol. 1 juin 2003;63(6):1256‑72.

50. Vassilatis DK, Hohmann JG, Zeng H, Li F, Ranchalis JE, Mortrud MT, et al. The G protein-coupled receptor repertoires of human and mouse. Proc Natl Acad Sci U S A. 15 avr 2003;100(8):4903‑8.

51. Coughlin SR. Thrombin signalling and protease-activated receptors. Nature. 14 sept 2000;407(6801):258‑64.

52. Coughlin SR. Protease-activated receptors in hemostasis, thrombosis and vascular biology. J Thromb Haemost. 1 août 2005;3(8):1800‑14.

53. Smyth SS, Woulfe DS, Weitz JI, Gachet C, Conley PB, Goodman SG, et al. G-Protein–Coupled Receptors as Signaling Targets for Antiplatelet Therapy. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 1 avr 2009;29(4):449‑57.

54. Angiolillo DJ, Capodanno D, Goto S. New drugs series: Platelet thrombin receptor antagonism and atherothrombosis. Eur Heart J. janv 2010;31(1):17.

55. Jantzen H-M, Gousset L, Bhaskar V, Vincent D, Tai A, Reynolds EE, et al. Evidence for Two Distinct G-protein-coupled ADP Receptors Mediating Platelet Activation. Thromb Haemost. 1999;81(1):111‑7.

56. Bell DN, Spain S, Goldsmith HL. The effect of red blood cells on the ADP-induced aggregation of human platelets in flow through tubes. Thromb Haemost. 19 févr 1990;63(1):112‑21.

57. Hechler B, Gachet C. P2 receptors and platelet function. Purinergic Signal. sept 2011;7(3):293‑303.

58. Abrams CS, Zhang J, Downes CP, Tang X w, Zhao W, Rittenhouse SE. Phosphopleckstrin inhibits gbetagamma-activable platelet phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase. J Biol Chem. 11 oct 1996;271(41):25192‑7.

59. Gratacap M-P, Guillermet-Guibert J, Martin V, Chicanne G, Tronchère H, Gaits-Iacovoni F, et al. Regulation and roles of PI3Kβ, a major actor in platelet signaling and functions. Adv Enzyme Regul. 2011;51(1):106‑16.

60. Hechler B, Léon C, Vial C, Vigne P, Frelin C, Cazenave JP, et al. The P2Y1 receptor is necessary for adenosine 5'-diphosphate-induced platelet aggregation. Blood. 1 juill 1998;92(1):152‑9.

61. Mahaut-Smith MP, Jones S, Evans RJ. The P2X1 receptor and platelet function. Purinergic Signal. sept 2011;7(3):341‑56.

62. Schaff M. Etude des mécanismes d'adhérence et d'activation des plaquettes sanguines appliquée à l'identification de nouvelles cibles anti-thrombotiques plus sûres. Strasbourg; 2012.

63. Ting HJ, Khasawneh FT. Platelet function and Isoprostane biology. Should isoprostanes be the newest member of the orphan-ligand family? J Biomed Sci. 6 avr 2010;17(1):24.

64. Giannarelli C, Zafar MU, Badimon JJ. Prostanoid and TP-receptors in atherothrombosis: is there a role for their antagonism? Thromb Haemost. nov 2010;104(5):949‑54.

65. Gratacap M-P, Guillermet-Guibert J, Martin V, Chicanne G, Tronchère H, Gaits-Iacovoni F, et al. Regulation and roles of PI3Kβ, a major actor in platelet signaling and functions. Adv Enzyme Regul. 2011;51(1):106‑16.

66. Yang J, Wu J, Kowalska MA, Dalvi A, Prevost N, O'Brien PJ, et al. Loss of signaling through the G protein, Gz, results in abnormal platelet activation and altered responses to psychoactive drugs. Proc Natl Acad Sci U S A. 29 août 2000;97(18):9984‑9.

67. Skop BP, Brown TM. Potential Vascular and Bleeding Complications of Treatment With Selective Serotonin Reuptake Inhibitors. Psychosomatics. 1 janv 1996;37(1):12‑6.

68. Johnston-Cox HA, Yang D, Ravid K. Physiological implications of adenosine receptor-mediated platelet aggregation. J Cell Physiol. janv 2011;226(1):46‑51.

69. Gleim S, Kasza Z, Martin K, Hwa J. Prostacyclin receptor/thromboxane receptor interactions and cellular responses in human atherothrombotic disease. Curr Atheroscler Rep. mai 2009;11(3):227‑35.

70. Falati S, Patil S, Gross PL, Stapleton M, Merrill-Skoloff G, Barrett NE, et al. Platelet PECAM-1 inhibits thrombus formation in vivo. Blood. 15 janv 2006;107(2):535‑41.

71. Kawasaki H, Springett GM, Toki S, Canales JJ, Harlan P, Blumenstiel JP, et al. A Rap guanine nucleotide exchange factor enriched highly in the basal ganglia. Proc Natl Acad Sci. 1998;95(22):13278–13283.

72. Crittenden JR, Bergmeier W, Zhang Y, Piffath CL, Liang Y, Wagner DD, et al. CalDAG-GEFI integrates signaling for platelet aggregation and thrombus formation. Nat Med. sept 2004;10(9):982‑6.

73. Ma Y-Q, Qin J, Plow EF. Platelet integrin alpha(IIb)beta(3): activation mechanisms. J Thromb Haemost JTH. juill 2007;5(7):1345‑52.

74. Shen B, Zhao X, O'Brien KA, Stojanovic-Terpo A, Delaney MK, Kim K, et al. A directional switch of integrin signalling and a new anti-thrombotic strategy. Nature. 7 nov 2013;503(7474):131‑5.

75. Bernardi B, Guidetti GF, Campus F, Crittenden JR, Graybiel AM, Balduini C, et al. The small GTPase Rap1b regulates the cross talk between platelet integrin α2β1 and integrin αIIbβ3. Blood. 1 avr 2006;107(7):2728‑35.

76. Chrzanowska-Wodnicka M, Smyth SS, Schoenwaelder SM, Fischer TH, White GC. Rap1b is required for normal platelet function and hemostasis in mice. J Clin Invest. 1 mars 2005;115(3):680‑7.

77. Stefanini L, Paul DS, Robledo RF, Chan ER, Getz TM, Campbell RA, et al. RASA3 is a critical inhibitor of RAP1-dependent platelet activation. J Clin Invest. 1 avr 2015;125(4):1419‑32.

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

78. Malinin NL, Plow EF, Byzova TV. Kindlins in FERM adhesion. Blood. 20 mai 2010;115(20):4011‑7.

79. Franke B, Akkerman JW, Bos JL. Rapid Ca2+-mediated activation of Rap1 in human platelets. EMBO J. 15 janv 1997;16(2):252.

80. Cifuni SM, Wagner DD, Bergmeier W. CalDAG-GEFI and protein kinase C represent alternative pathways leading to activation of integrin αIIbβ3 in platelets. Blood. 1 sept 2008;112(5):1696‑703.

81. Romer LH, Birukov KG, Garcia JGN. Focal Adhesions Paradigm for a Signaling Nexus. Circ Res. 17 mars 2006;98(5):606‑16.

82. Miranti CK, Leng L, Maschberger P, Brugge JS, Shattil SJ. Identification of a novel integrin signaling pathway involving the kinase Syk and the guanine nucleotide exchange factor Vav1. Curr Biol CB. 3 déc 1998;8(24):1289‑99.

83. Min SH, Abrams CS. Regulation of platelet plug formation by phosphoinositide metabolism. Blood. 22 août 2013;122(8):1358‑65.

84. Bouaouina M, Halbwachs-Mecarelli L. Leukocyte and platelet integrin activation and adhesion. Hématologie. 1 janv 2006;12(1):21‑33.

85. Payrastre B, Alessi M-C, Sie P. Pathophysiology of inherited platelet disorders. Hématologie. 1 janv 2014;20(1):20‑35.

86. Harrison P, Mackie I, Mumford A, Briggs C, Liesner R, Winter M, et al. Guidelines for the laboratory investigation of heritable disorders of platelet function. Br J Haematol. 1 oct 2011;155(1):30‑44.

87. Picker SM. In-vitro assessment of platelet function. Transfus Apher Sci. juin 2011;44(3):305‑19.

88. Latger-Cannard V, Hoarau M, Salignac S, Baumgart D, Nurden P, Lecompte T. Mean platelet volume: comparison of three analysers towards standardization of platelet morphological phenotype. Int J Lab Hematol. juin 2012;34(3):300‑10.

89. Briggs C, Harrison P, Machin SJ. Continuing developments with the automated platelet count. Int J Lab Hematol. avr 2007;29(2):77‑91.

90. Counting† IC for S in HEP on CS of LHTF on P, Counting† IC for S in HEP on CS of LHTF on P. Platelet Counting by the RBC/Platelet Ratio Method. Am J Clin Pathol. 1 mars 2001;115(3):460‑4.

91. Jung H, Jeon H-K, Kim H-J, Kim S-H. Immature platelet fraction: establishment of a reference interval and diagnostic measure for thrombocytopenia. Korean J Lab Med. oct 2010;30(5):451‑9.

92. Briggs C, Kunka S, Hart D, Oguni S, Machin SJ. Assessment of an immature platelet fraction (IPF) in peripheral thrombocytopenia. Br J Haematol. juill 2004;126(1):93‑9.

93. Cannavo I, Ferrero-Vacher C, Sudaka I, Aquaronne D, Berthier F, Raynaud S. [Assessment of an immature platelet fraction (IFP%) in the diagnosis of thrombocytopenia]. Ann Biol Clin (Paris). août 2010;68(4):415‑20.

94. Perl L, Lerman-Shivek H, Rechavia E, Vaduganathan M, Leshem-Lev D, Zemer-Wassercug N, et al. Response to prasugrel and levels of circulating reticulated platelets in patients with ST-segment elevation myocardial infarction. J Am Coll Cardiol. 18 févr 2014;63(6):513‑7.

95. Cesari F, Marcucci R, Caporale R, Paniccia R, Romano E, Gensini GF, et al. Relationship between high platelet turnover and platelet function in high-risk patients with coronary artery disease on dual antiplatelet therapy. Thromb Haemost. mai 2008;99(5):930‑5.

96. Ibrahim H, Nadipalli S, DeLao T, Guthikonda S, Kleiman NS. Immature platelet fraction (IPF) determined with an automated method predicts clopidogrel hyporesponsiveness. J Thromb Thrombolysis. févr 2012;33(2):137‑42.

97. Bernlochner I, Goedel A, Plischke C, Schüpke S, Haller B, Schulz C, et al. Impact of immature platelets on platelet response to ticagrelor and prasugrel in patients with acute coronary syndrome. Eur Heart J. 1 déc 2015;36(45):3202‑10.

98. Rosa J-P. The gray platelet syndrome. Hématologie. 1 mars 2013;19(2):123‑35.

99. Rapport_Hemostase et coagulation_Tome 1 - biologie_anomalie_hemostase_t1_temps_de_saignement_-_rapport_devaluation_2011-08-10_14-55-5_340.pdf [Internet]. [cité 4 déc 2016]. Disponible sur: http://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2011-08/biologie_anomalie_hemostase_t1_temps_de_saignement_-_rapport_devaluation_2011-08-10_14-55-5_340.pdf

100. Kundu SK, Heilmann EJ, Sio R, Garcia C, Davidson RM, Ostgaard RA. Description of an in vitro platelet function analyzer--PFA-100. Semin Thromb Hemost. 1995;21 Suppl 2:106‑12.

101. Marshall PW, Williams AJ, Dixon RM, Growcott JW, Warburton S, Armstrong J, et al. A comparison of the effects of aspirin on bleeding time measured using the Simplate method and closure time measured using the PFA-100, in healthy volunteers. Br J Clin Pharmacol. août 1997;44(2):151‑5.

102. Mammen EF, Comp PC, Gosselin R, Greenberg C, Hoots WK, Kessler CM, et al. PFA-100 system: a new method for assessment of platelet dysfunction. Semin Thromb Hemost. 1998;24(2):195‑202.

103. Hayward CPM, Harrison P, Cattaneo M, Ortel TL, Rao AK. Platelet function analyzer (PFA)-100® closure time in the evaluation of platelet disorders and platelet function. J Thromb Haemost. 1 févr 2006;4(2):312‑9.

104. Karger R, Donner-Banzhoff N, Müller H-H, Kretschmer V, Hunink M. Diagnostic performance of the platelet function analyzer (PFA-100) for the detection of disorders of primary haemostasis in patients with a bleeding history-a systematic review and meta-analysis. Platelets. juin 2007;18(4):249‑60.

105. Sladky JL, Klima J, Grooms L, Kerlin BA, O'Brien SH. The PFA-100 ® does not predict delta-granule platelet storage pool deficiencies. Haemoph Off J World Fed Hemoph. juill 2012;18(4):626‑9.

106. Born GV. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. Nature. 9 juin 1962;194:927‑9.

107. O'brien JR. The adhesiveness of native platelets and its prevention. J Clin Pathol. mars 1961;14:140‑9.

108. Michelson AD. Platelets. 2nd ed. London ; Waltham, MA: Academic Press; 2007.

109. Cazenave JP, Hemmendinger S, Beretz A, Sutter-Bay A, Launay J. [Platelet aggregation: a tool for clinical investigation and pharmacological study. Methodology]. Ann Biol Clin (Paris). 1983;41(3):167‑79.

110. Cardinal DC, Flower RJ. The electronic aggregometer: a novel device for assessing platelet behavior in blood. J Pharmacol Methods. févr 1980;3(2):135‑58.

111. Shattil SJ, Cunningham M, Hoxie JA. Detection of activated platelets in whole blood using activation-dependent monoclonal antibodies and flow cytometry. Blood. juill 1987;70(1):307‑15.

112. Linden MD, Frelinger AL, Barnard MR, Przyklenk K, Furman MI, Michelson AD. Application of flow cytometry to platelet disorders. Semin Thromb Hemost. oct 2004;30(5):501‑11.

113. Shattil SJ, Hoxie JA, Cunningham M, Brass LF. Changes in the platelet membrane glycoprotein IIb.IIIa complex during platelet activation. J Biol Chem. 15 sept 1985;260(20):11107‑14.

114. Takahashi H, Yoshino N, Shibata A. Measurement of platelet factor 4 and beta-thromboglobulin by an enzyme-linked immunosorbent assay. Clin Chim Acta Int J Clin Chem. 30 juin 1988;175(1):113‑4.

115. Blann AD, Nadar SK, Lip GYH. The adhesion molecule P-selectin and cardiovascular disease. Eur Heart J. déc 2003;24(24):2166‑79.

116. Israels SJ, Gerrard JM, Jacques YV, McNicol A, Cham B, Nishibori M, et al. Platelet dense granule membranes contain both granulophysin and P-selectin (GMP-140). Blood. 1 juill 1992;80(1):143‑52.

117. Holmsen H, Dangelmaier CA. Measurement of secretion of adenine nucleotides. Methods Enzymol. 1989;169:195‑205.

118. Holmsen H, Weiss HJ. Further evidence for a deficient storage pool of adenine nucleotides in platelets from some patients with thrombocytopathia--« storage pool disease ». Blood. févr 1972;39(2):197‑209.

119. Mezzano D, Aranda E, Rodríguez S, Foradori A, Lira P. Increase in density and accumulation of serotonin by human aging platelets. Am J Hematol. juill 1984;17(1):11‑21.

120. Eynard N, Flachaire E, Lestra C, Broyer M, Zaidan R, Claustrat B, et al. Platelet serotonin content and free and total plasma tryptophan in healthy volunteers during 24 hours. Clin Chem. 1993;39(11):2337–2340.

121. Kumar AM, Kumar M, Deepika K, Fernandez JB, Eisdorfer C. A modified HPLC technique for simultaneous measurement of 5-hydroxytryptamine and 5-hydroxyindoleacetic acid in cerebrospinal fluid, platelet and plasma. Life Sci. 1990;47(19):1751‑9.

122. Torfs SC, Maes AA, Delesalle CJ, Deprez P, Croubels SM. Comparative analysis of serotonin in equine plasma with liquid chromatography--tandem mass spectrometry and enzyme-linked immunosorbent assay. J Vet Diagn Investig Off Publ Am Assoc Vet Lab Diagn Inc. nov 2012;24(6):1035‑42.

123. Gobbi G, Mirandola P, Tazzari PL, Ricci F, Caimi L, Cacchioli A, et al. Flow cytometry detection of serotonin content and release in resting and activated platelets. Br J Haematol. juin 2003;121(6):892‑6.

124. Maurer-Spurej E, Pittendreigh C, Wu JK. Diagnosing platelet delta-storage pool disease in children by flow cytometry. Am J Clin Pathol. avr 2007;127(4):626‑32.

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

126. Cattaneo M. Light transmission aggregometry and ATP release for the diagnostic assessment of platelet function. Semin Thromb Hemost. mars 2009;35(2):158‑67.

127. Wall JE, Buijs-Wilts M, Arnold JT, Wang W, White MM, Jennings LK, et al. A flow cytometric assay using mepacrine for study of uptake and release of platelet dense granule contents. Br J Haematol. févr 1995;89(2):380‑5.

128. Gresele P. Diagnosis of inherited platelet function disorders: guidance from the SSC of the ISTH. J Thromb Haemost. 1 févr 2015;13(2):314‑22.

129. Rodeghiero F, Tosetto A, Abshire T, Arnold DM, Coller 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.

130. Nurden AT, Fiore M, Nurden P, Pillois X. Glanzmann thrombasthenia: a review of ITGA2B and ITGB3 defects with emphasis on variants, phenotypic variability, and mouse models. Blood. 1 déc 2011;118(23):5996‑6005.

131. Lanza F. Bernard-Soulier syndrome (hemorrhagiparous thrombocytic dystrophy). Orphanet J Rare Dis. 16 nov 2006;1:46.

132. Dumont B, Lasne D, Rothschild C, Bouabdelli M, Ollivier V, Oudin C, et al. Absence of collagen-induced platelet activation caused by compound heterozygous GPVI mutations. Blood. 27 août 2009;114(9):1900‑3.

133. Hermans C, Wittevrongel C, Thys C, Smethurst PA, Van Geet C, Freson K. A compound heterozygous mutation in glycoprotein VI in a patient with a bleeding disorder. J Thromb Haemost JTH. août 2009;7(8):1356‑63.

134. Othman M, Kaur H, Favaloro EJ, Lillicrap D, Di Paola J, Harrison P, et al. Platelet type von Willebrand disease and registry report: communication from the SSC of the ISTH. J Thromb Haemost. 1 févr 2016;14(2):411‑4.

135. Cattaneo M. The platelet $P2Y_{12}$ receptor for adenosine diphosphate: congenital and drug-induced defects. Blood. 17 févr 2011;117(7):2102‑12.

136. Watson S, Daly M, Dawood B, Gissen P, Makris M, Mundell S, et al. Phenotypic approaches to gene mapping in platelet function disorders - identification of new variant of P2Y12, TxA2 and GPVI receptors. Hamostaseologie. janv 2010;30(1):29‑38.

137. Hirata T, Ushikubi F, Kakizuka A, Okuma M, Narumiya S. Two thromboxane A2 receptor isoforms in human platelets. Opposite coupling to adenylyl cyclase with different sensitivity to Arg60 to Leu mutation. J Clin Invest. 15 févr 1996;97(4):949‑56.

138. Mumford AD, Dawood BB, Daly ME, Murden SL, Williams MD, Protty MB, et al. A novel thromboxane A2 receptor D304N variant that abrogates ligand binding in a patient with a bleeding diathesis. Blood. 14 janv 2010;115(2):363‑9.

139. Geneviève D, Proulle V, Isidor B, Bellais S, Serre V, Djouadi F, et al. Thromboxane synthase mutations in an increased bone density disorder (Ghosal syndrome). Nat Genet. mars 2008;40(3):284‑6.

140. Canault M, Ghalloussi D, Grosdidier C, Guinier M, Perret C, Chelghoum N, et al. Human CalDAG-GEFI gene (*RASGRP2*) mutation affects platelet function and causes severe bleeding. J Exp Med. 30 juin 2014;211(7):1349‑62.

141. Lozano ML, Cook A, Bastida JM, Paul DS, Iruin G, Cid AR, et al. Novel mutations in RASGRP2 encoding for CalDAG-GEFI abrogate Rap1 activation causing platelet dysfunction. Blood. 1 janv 2016;blood-2015-11-683102.

142. Kato H, Nakazawa Y, Kurokawa Y, Kashiwagi H, Morikawa Y, Morita D, et al. Human CalDAG-GEFI deficiency increases bleeding and delays αIIbβ3 activation. Blood. 8 déc 2016;128(23):2729‑33.

143. Etzioni A. Leukocyte adhesion deficiency III - when integrins activation fails. J Clin Immunol. nov 2014;34(8):900‑3.

144. Roberts AE, Allanson PJE, Tartaglia M, Gelb PBD. Noonan syndrome. Lancet. 26 janv 2013;381(9863):333.

145. Lee BH, Kim J-M, Jin HY, Kim G-H, Choi J-H, Yoo H-W. Spectrum of Mutations in Noonan Syndrome and Their Correlation with Phenotypes. J Pediatr. 1 déc 2011;159(6):1029‑35.

146. Smpokou P, Tworog-Dube E, Kucherlapati RS, Roberts AE. Medical complications, clinical findings, and educational outcomes in adults with Noonan syndrome. Am J Med Genet A. 1 déc 2012;158A(12):3106‑11.

147. Artoni A, Selicorni A, Passamonti SM, Lecchi A, Bucciarelli P, Cerutti M, et al. Hemostatic Abnormalities in Noonan Syndrome. Pediatrics. 1 mai 2014;133(5):e1299‑304.

148. Rosa J-P. Le syndrome des plaquettes grises. Hématologie. 1 mars 2013;19(2):123‑35.

149. Blavignac J, Bunimov N, Rivard GE, Hayward CPM. Quebec Platelet Disorder: Update on Pathogenesis, Diagnosis, and Treatment. Semin Thromb Hemost. sept 2011;37(06):713‑20.

150. Gissen P, Johnson CA, Morgan NV, Stapelbroek JM, Forshew T, Cooper WN, et al. Mutations in VPS33B, encoding a regulator of SNARE-dependent membrane fusion, cause arthrogryposis-renal dysfunction-cholestasis (ARC) syndrome. Nat Genet. avr 2004;36(4):400‑4.

151. Lo B, Li L, Gissen P, Christensen H, McKiernan PJ, Ye C, et al. Requirement of VPS33B, a member of the Sec1/Munc18 protein family, in megakaryocyte and platelet alpha-granule biogenesis. Blood. 15 déc 2005;106(13):4159‑66.

152. Favier R, Jondeau K, Boutard P, Grossfeld P, Reinert P, Jones C, et al. Paris-Trousseau syndrome : clinical, hematological, molecular data of ten new cases. Thromb Haemost. nov 2003;90(5):893‑7.

153. Jedlitschky G, Cattaneo M, Lubenow LE, Rosskopf D, Lecchi A, Artoni A, et al. Role of MRP4 (ABCC4) in platelet adenine nucleotide-storage: evidence from patients with delta-storage pool deficiencies. Am J Pathol. mars 2010;176(3):1097‑103.

154. Introne W, Boissy RE, Gahl WA. Clinical, molecular, and cell biological aspects of Chediak-Higashi syndrome. Mol Genet Metab. oct 1999;68(2):283‑303.

155. Certain S, Barrat F, Pastural E, Deist FL, Goyo-Rivas J, Jabado N, et al. Protein truncation test of LYST reveals heterogenous mutations in patients with Chediak-Higashi syndrome. Blood. 1 févr 2000;95(3):979‑83.

156. Huizing M, Helip-Wooley A, Westbroek W, Gunay-Aygun M, Gahl WA. Disorders of lysosome-related organelle biogenesis: clinical and molecular genetics. Annu Rev Genomics Hum Genet. 2008;9:359‑86.

157. Weiss HJ, Vicic WJ, Lages BA, Rogers J. Isolated deficiency of platelet procoagulant activity. Am J Med. août 1979;67(2):206‑13.

158. Suzuki J, Umeda M, Sims PJ, Nagata S. Calcium-dependent phospholipid scrambling by TMEM16F. Nature. 9 déc 2010;468(7325):834‑8.

159. Malvezzi M, Chalat M, Janjusevic R, Picollo A, Terashima H, Menon AK, et al. Ca2+-dependent phospholipid scrambling by a reconstituted TMEM16 ion channel. Nat Commun. 2013;4:2367.

160. Johnson JE, Goulding RE, Ding Z, Partovi A, Anthony KV, Beaulieu N, et al. Differential membrane binding and diacylglycerol recognition by C1 domains of RasGRPs. Biochem J. 1 sept 2007;406(Pt 2):223.

161. Johnson JE, Goulding RE, Ding Z, Partovi A, Anthony KV, Beaulieu N, et al. Differential membrane binding and diacylglycerol recognition by C1 domains of RasGRPs. Biochem J. 1 sept 2007;406(Pt 2):223‑36.

162. Clyde-Smith J, Silins G, Gartside M, Grimmond S, Etheridge M, Apolloni A, et al. Characterization of RasGRP2, a Plasma Membrane-targeted, Dual Specificity Ras/Rap Exchange Factor. J Biol Chem. 13 oct 2000;275(41):32260‑7.

163. Czikora A, Lundberg DJ, Abramovitz A, Lewin NE, Kedei N, Peach ML, et al. Structural Basis for the Failure of the C1 Domain of Ras Guanine Nucleotide Releasing Protein 2 (RasGRP2) to Bind Phorbol Ester with High Affinity. J Biol Chem. 20 mai 2016;291(21):11133‑47.

164. Stolla M, Stefanini L, Roden RC, Chavez M, Hirsch J, Greene T, et al. The kinetics of αIIbβ3 activation determines the size and stability of thrombi in mice: implications for antiplatelet therapy. Blood. 20 janv 2011;117(3):1005‑13.

165. Graham JM. Fractionation of subcellular organelles. In: Curr Protoc Cell Biol. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2015; 69:3.1.1-3.1.22.

166. Lozano ML, Cook A, Bastida JM, Paul DS, Iruin G, Cid AR, et al. Novel mutations in RASGRP2 encoding for CalDAG-GEFI abrogate Rap1 activation causing platelet dysfunction. Blood. 1 janv 2016;blood-2015-11-683102.

167. Stefanini L, Boulaftali Y, Ouellette TD, Holinstat M, Désiré L, Leblond B, et al. Rap1-Rac1 circuits potentiate platelet activation. Arterioscler Thromb Vasc Biol. févr 2012;32(2):434‑41.

168. Gérard A, Mertens AEE, van der Kammen RA, Collard JG. The Par polarity complex regulates Rap1- and chemokine-induced T cell polarization. J Cell Biol. 12 mars 2007;176(6):863‑75.

169. Arthur WT, Quilliam LA, Cooper JA. Rap1 promotes cell spreading by localizing Rac guanine nucleotide exchange factors. J Cell Biol. 11 oct 2004;167(1):111‑22.

170. Caloca MJ, Zugaza JL, Vicente-Manzanares M, Sánchez-Madrid F, Bustelo XR. F-actin-dependent Translocation of the Rap1 GDP/GTP Exchange Factor RasGRP2. J Biol Chem. 5 juill 2004;279(19):20435‑46.

171. Lova P, Paganini S, Hirsch E, Barberis L, Wymann M, Sinigaglia F, et al. A Selective Role for Phosphatidylinositol 3,4,5-Trisphosphate in the Gi-dependent Activation of Platelet Rap1B. J Biol Chem. 1 mars 2003;278(1):131‑8.

172. Colón-González F, Kazanietz MG. C1 domains exposed: from diacylglycerol binding to protein-protein interactions. Biochim Biophys Acta. août 2006;1761(8):827‑37.

173. Hausser A, Storz P, Link G, Stoll H, Liu YC, Altman A, et al. Protein kinase C mu is negatively regulated by 14-3-3 signal transduction proteins. J Biol Chem. 2 avr 1999;274(14):9258‑64.

174. Williams JG, Drugan JK, Yi GS, Clark GJ, Der CJ, Campbell SL. Elucidation of binding determinants and functional consequences of Ras/Raf-cysteine-rich domain interactions. J Biol Chem. 21 juill 2000;275(29):22172‑9.

175. Bergmeier W, Goerge T, Wang H-W, Crittenden JR, Baldwin ACW, Cifuni SM, et al. Mice lacking the signaling molecule CalDAG-GEFI represent a model for leukocyte adhesion deficiency type III. J Clin Invest. juin 2007;117(6):1699‑707.

176. Boudreaux MK, Catalfamo JL, Klok M. Calcium-diacylglycerol guanine nucleotide exchange factor I gene mutations associated with loss of function in canine platelets. Transl Res J Lab Clin Med. août 2007;150(2):81‑92.

177. Piatt R, Paul DS, Lee RH, McKenzie SE, Parise LV, Cowley DO, et al. Mice Expressing Low Levels of CalDAG-GEFI Exhibit Markedly Impaired Platelet Activation With Minor Impact on Hemostasis. Arterioscler Thromb Vasc Biol. sept 2016;36(9):1838‑46.

SERMENT DE GALIEN

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

- *D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.*
- *D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.*
- *De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.*
- *En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.*

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre, méprisé de mes confrères, si j'y manque.

EXPLORATION BIOLOGIQUE DES THROMBOPATHIES CONSTITUTIONNELLES - DÉFICIT EN CalDAG-GEFI : UN EXEMPLE DE RECHERCHE TRANSLATIONNELLE

Les thrombopathies constitutionnelles représentent un groupe hétérogène de pathologies rares dues à des atteintes fonctionnelles plaquettaires, responsables de syndromes hémorragiques d'intensité variable. Leur prévalence demeure certainement sous-estimée compte tenu des difficultés de leur exploration biologique et de la complexité des processus moléculaires régulant la fonction plaquettaire. Nous traiterons, à travers l'exemple d'un déficit en CalDAG-GEFI, des stratégies pouvant être mises en œuvre pour caractériser des thrombopathies de mécanisme physiopathologique inconnu.

La protéine CalDAG-GEFI, codée par le gène *RASGRP2*, constitue le principal facteur d'échange de la GTPase Rap1b dans la plaquette. Nous avons identifié par séquençage d'exome deux nouvelles mutations dans le gène *RASGRP2* au sein de deux familles présentant une symptomatologie hémorragique sévère. Dans ce travail, nous montrons que l'absence de CalDAG-GEFI entraine un défaut d'adhésion et d'étalement plaquettaires sur fibrinogène, preuve de l'implication de CalDAG-GEFI dans la signalisation « outside-in » de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$. La deuxième partie du travail démontre que le domaine C1 de la protéine régule sa localisation intracellulaire, suggérant que l'absence du domaine C1 résulte en une mauvaise localisation de la protéine dans la plaquette, responsable d'une dysfonction plaquettaire.

La caractérisation de thrombopathies constitutionnelles rares enrichit la compréhension de la physiologie et de la biologie des plaquettes, compréhension primordiale pour le développement de stratégies antithrombotiques innovantes : la dissection moléculaire du déficit en CalDAG-GEFI en est une illustration.

MÉMOIRE DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES DE BIOLOGIE MEDICALE
tenant lieu de **THÈSE POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE**
2017

Florence GOLESI