



DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

N°...../S

Mémoire de fin d'études

Présenté par

GADI Hayat

Pour l'obtention du diplôme de

Master en biologie

Spécialité: Analyses Biologiques et biochimiques

Thème

**La dystrophie thrombocytaire hémorragique (DTH),
Etude des récepteurs de l'hémostase
(Le syndrome de Bernard Soulier)**

Soutenue publiquement le **19 / 06 / 2017**

Devant le Jury

Président	M. BEKADA. S	U. Mostaganem
Examineurs	M. BENGUETTAT. Z	U. Mostaganem
Encadreur	M. DAHMOUNI. S	U. Mostaganem
Co-encadreur	M. ITALHI	U. Mostaganem

*Thème réalisé au Laboratoire de l'Hôpital de Ain Tedles de Mostaganem
et l'EHU 1^{er} novembre d'Oran.*

Année universitaire : 2016 / 2017

REMERCIEMENTS

En préambule à ce travail je remercie

Allah

*Qui m'a inspiré et m'a guidé dans le bon
chemin*

Je vous dois ce que je suis devenu

Louanges et remerciements

Pour votre clémence et miséricorde

*Je tiens d'abord Un grand merci du fond du
cœur et très sincèrement mon promoteur M^{er}.
DAHMOUNI. S, pour sa patience, son aide, ses
conseils, sa disponibilité, et ses
orientations pour l'accomplissement de ce
travail,*

*Je souhaite exprimer mes gratitudes à M^{er}.
BENKADA, pour l'honneur qu'il me fait en
présidant le jury de ce mémoire. Je tiens
aussi à remercier vivement Monsieur Dr
BENGUETTAT. Z, pour l'intérêt qu'il porte à
ce travail en accepte de l'examiner.*

Mes remerciements s'adressent également à Dr **ITALHI** et Dr **BRAHIMI** et toutes les personnes qui nous ont apporté leur soutien.

Que chacun trouve dans l'accomplissement de ce mémoire l'expression de mes reconnaissances les plus sincères.

Notre gratitude et nos sincères remerciements s'adressent également au personnel du laboratoire de l'hôpital d'Ain Tedless et l'EHU d'Oran.

Enfin nous remercions tout ceux et toute celle qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

DEDICACES

*A ceux qui me sont les plus chers
A ceux qui m'ont toujours encouragé*

Je dédie cette thèse à ...

*A mes très cher parents, qui m'ont
encouragée, toujours poussée à aller plus
loin et qui m'ont permis de poursuivre mes
études. Je suis fière des valeurs et des
principes qu'ils m'ont transmis et j'espère
qu'ils le sont également de moi.*

*que Dieu vous préserve santé et vous offre
réussite et prospérité.*

*A mes chères sœurs **Souad** et **Fatima** avec ces
maries **Hamza** et **Abdelkader**, a mon cher frère
Khatir et ces enfants **Islam** et **Abdelhadi** avec
qui j'ai et je partagerai ma vie, avec qui
j'ai et je passerai des moments agréables et
ils y auront plein à l'avenir. Que ce travail
soit le témoignage des sentiments les plus
chers que j'ai pour vous*

*A mon très cher fiancé « **Mohamed** »:*

*Aucune dédicace ne saurait exprimer l'estime
que j'ai pour toi. Ton dévouement, tes
encouragements et ta gentillesse, ont été
pour moi d'un grand soutien. Je te remercie.*

Que Dieu te protège et te procure joie et
bonheur.

A mes amis, **Fatoomti, Arbia, Nourhane** et
Salima pour leur encouragement et le
dévouement dont ils ont fait preuve. Que ce
travail soit le témoignage d'une amitié
sincère.

A M^{er}. Mohamed Benarbia pour ses nombreux
coups de main. Je le remercie du fond du cœur
pour tout le soutien qu'il m'a apporté.
A ceux dont l'oubli du nom n'est pas celui du
cœur.

A tous mes collègues et camarades de
promotion 2016 / 2017.

A tous ceux qui ont contribué à ma formation.

Liste des figures

Figure 1: Morphologie et ultrastructure des thrombocytes	3
Figure 2 : Développement des mégacaryocytes et formation des thrombocytes sanguins..	6
Figure 3 : Modifications morphologiques des précurseurs au cours de la mégacaryocytopoïèse.....	7
Figure 4 : Les phases de l'hémostase	11
Figure 5 : les étapes de L'hémostase primaire	12
Figure 6 : le changement de forme des thrombocytes dans l'adhésion et l'activation thrombocytaire	14
Figure 7 : Voies de signalisation mises en jeu lors de l'activation thrombocytaire	16
Figure 8 : Phases successives de la formation du thrombus blanc : adhésion, activation, agrégation.	18
Figure 9 : Structure du complexe GPIb-V-IX et domaines fonctionnels.....	19
Figure 10 : Cascade de signalisation de GPVI.....	21
Figure 11 : Signalisation de l'intégrine GPIIb/IIIa	23
Figure 12 : Frottis sanguin montrant un thrombocyte (A) normal, et (B) géant	26
Figure 13 : Mutations de GPIb α (A), GPIb β (B) et GPIX (C) associées au syndrome de Bernard-Soulier de type faux-sens (vert), non-sens (rouge) ou à l'origine d'un codon stop (bleu)	29
Figure 14 : évaluation des taux de thrombocytes, leucocytes et des érythrocytes pour le sexe féminin.....	39
Figure 15 : évaluation des taux de thrombocytes, leucocytes et et des érythrocytes pour le sexe masculin	40
Figure 16: évaluation des taux de l'hémoglobine pour le sexe féminin et masculin	40
Figure 17: évaluation des taux de CD61, CD41a et CD42b pour le sexe féminin.....	43
Figure 18: évaluation des taux de CD61, CD41a et CD42b pour le sexe masculin..	44

Liste des tableaux

Tableau 1 : Principales substances contenues dans les granules thrombocytaires.	5
Tableau 2 : Rôle de l'interaction des récepteurs thrombocytaires avec leurs ligands solubles et les voies de signalisations dans les réponses thrombocytaires	17
Tableau 3 : Principaux types de thrombopathies constitutionnelles	24
Tableau 4 : Le mode de transmission de la maladie de syndrome de Bernard-Soulier	27
Tableau 5: résultats du frottis sanguin chez le sexe féminin et le sexe masculin.	41
Tableau 6: présentation des résultats de l'immunophénotypage.	42
Tableau 7: taux de CD61, CD41a et CD42b pour le sexe féminin.....	43
Tableau 8: taux de CD61, CD41a et CD42b pour le sexe masculin.....	44

Liste des abréviations

5'HT : Sérotonine

AA: Acide Arachidonique

AC: Adénylate Cyclase

ADP: Adénosine Diphosphate

AMPc : Adénosine 3', 5'- Monophosphate Cyclique

ARNm: Acide Ribonucléique Messenger

ATP: Adénosine Triphosphate

BFU-E: Burst-Forming Unit Erythrocyte ou Progéniteur Erythrocyte Précoce

BFU-MK: Burst-Forming Unit megakaryocyte ou Progéniteur Mégacaryocyte Précoce

Ca²⁺ : les ions de Calcium

CD : Cluster Différenciation

CE: Cellule Endothéliale

CFU-MK: Colony-Forming Unit Megakaryocyte ou Progéniteur Mégacaryocyte Tardif

PMKB: Promégacaryoblaste

CLP: Progéniteur Commun Lymphoïde

CMF : Cytométrie en Flux

CMP: Progéniteur Commun Myéloïde

C-MPL: Récepteur de la Thrombopoïétine

DAG: Diacylglycérol ou 1, 2-diacyl glycerol

DMS : Système Membrane de Démarcation

EDTA : Éthylène Diamine Tétra Acétique

EGF: Epidermal Growth Factor

Fc: Fragment Cristallisable

FcR γ : Chaîne γ Des Récepteurs Fc

Fg: Fibrinogène

Fn: Fibronectine

GMP: Progéniteur Granulocyte/Monocyte

GP: Glycoprotéine

GPI: Glycosylphosphatidylinositol

HAB: Hémangioblaste

HSC: Cellule Souche Hématopoïétique

IP: Prostacyclin

IP2: Inositol 1, 4, 5-trisphosphate
IP3: Inositol 1, 4, 5-trisphosphate
ITAM: Immunoreceptor Tyrosine-Based Activatory Motifs
ITIM: Immunoreceptor Tyrosine-Based Inhibition Motifs
LAT: Linker of Activation of T cell
MAP: kinase: Mitogen Activated Protein Kinase
MEP: Progéniteur Érythrocyte/Mégacaryocyte
MGG: May-Grünwald-Giemsa
MO: Moelle Osseuse
MPP: Progéniteur Multipotent
NFS : Numération Formule Sanguine
NO: monoxyde d'azote
PAF: Paraformaldéhyde
PAI-1: Plasminogen Activator Inhibitor-1
PAR : Protéase-Activated Receptor
PBS: Phosphate Buffer Saline
PCE: Progéniteur De Cellule Endothéliale
PDGF: Platelet-Driven Growth Factor
PECAM-1: Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule 1
PF-4: Facteur Thrombocytaire 4
PG: prostaglandines
PI3K: phosphoinositide 3 kinase
PIP₂: Phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate
PIP₃: Phosphatidylinositol 3, 4, 5-triphosphate
PKC : Protéine Kinase C
PL: phospholipide
PLC : phospholipase C
PLC/A2: phospholipase C/A2
PLC γ ₂ : Phospholipase C γ ₂
Plt: plaquette
PRP : Plasma Riche en Plaquettes
RCPG : Récepteurs Couplés Aux Protéines G Hétérotrimériques
RTK : Récepteurs A Activité Tyrosine Kinase
SDF-1: Stromal Derived Factor 1

SH (2 ou 3) : Domaine d'Homologie à src (2 ou 3)

SHIP: SH2 domain-containing Inositol-5-Phosphatase

SLP-76: Src homology 2 domain-containing leukocyte protein of 76kDa

STD: Système Tubulaire Dense

Syk: Spleen Tyrosine Kinase

TGFβ: Transforming Growth Factor β

TSP-1: trombospondine-1

TxA2: thromboxane A2

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor

VWF: Facteur Von Willebrand ou Von Willebrand Factor

Sommaire

Introduction générale	1
-----------------------------	---

Chapitre I : les plaquettes sanguines

1. Présentation générale des plaquettes sanguines	3
1.1. Structure des plaquettes sanguines	3
1.2. La formation des thrombocytes : la thrombopoïèse	5
1.2.1. La formation des proplaquettes	6
1.2.2. La libération des thrombocytes	8
1.3. Les fonctions des thrombocytes	10
2. La physiologie thrombocytaire et le rôle des thrombocytes dans l'hémostase	11
2.1. Généralité sur l'hémostase	11
2.2. L'hémostase primaire	11
2.2.1. La phase vasculaire	12
2.2.2. L'adhésion thrombocytaire	13
2.2.3. L'activation thrombocytaire	13
2.2.4. L'agrégation thrombocytaire	17
3. Les principaux récepteurs thrombocytaires	18
3.1. Les récepteurs d'adhésion	18
3.1.1. Le complexe GPIb-IX-V	18
3.1.2. Le complexe GPVI	20
3.2. Les récepteurs d'activation	21
3.2.1. Les récepteurs couplés aux protéines G hétérotrimériques (RCPG)	21
3.2.2. Les récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK)	21
3.2.3. Les récepteurs de type intégrine	22
4. Les maladies liées aux thrombocytes	23

Chapitre II : Syndrome de Bernard-Soulier

1. Thrombopathies constitutionnelles	24
1.1. Classification des thrombopathies constitutionnelles	24
2. Syndrome de Bernard-Soulier	25

2.1.Présentation clinique	25
2.3.Présentation biologique	25
2.4.Mode de transmission de la maladie	26
2.5.Présentation génétique	28
3.Gènes, biosynthèse et expression du complexe GPIb-V-IX	29
4.La physiopathologie	30
4.1.Chez la femme	30
4.1.1.Ménorragie	30
4.1.2.Saignement durant la grossesse et l'accouchement	30
4.1.3.Chez les nouveau-nés	31
5. Diagnostic biologique	31
6.Prise en charge thérapeutique	32
6.1.Mesures préventives	33
6.2.Transfusion de plaquettes	33
6.3.Antifibrinolytiques	34

Chapitre III : Matériels et Méthodes

1.Problématique	35
2.Objectif de l'étude	35
3.Lieu et population d'études	35
4.Matériels et produits utilisés	36
4.1.Matériels utilisés	36
4.2.Produits utilisés	36
5.Méthodologie de travail	36
5.1.L'hémogramme ou Numération Formule Sanguine (NFS)	36
5.1.1.Méthode	36
5.2.Frottis sanguin coloré au May-Grunwald-Giemsa	36
5.3.l'immunophénotypage par la cytométrie en flux	37
5.3.1.Méthode	37

Résultats et discussion

1.Résultats et discussions	39
1.1.L'hémogramme ou Numération Formule Sanguine (NFS)	39
1.1.1. Évaluation des taux de thrombocytes, leucocytes et des érythrocytes	39
1.1.2. Évaluation des taux de l'hémoglobine.....	40
1.2.Frottis sanguin coloré au May-Grunwald-Giemsa	41
1.3.L'immunophénotypage par la cytométrie en flux	42
1.3.1.Chez le sexe féminin	43
1.3.2.Chez le sexe masculin	44
2.La discussion générale	45
Conclusion générale	46
Références bibliographiques	47

Annexes

Résumé

Partie bibliographique

Introduction générale

Introduction générale :

Les thrombocytes sanguins sont de petites cellules anucléées issues de la fragmentation des mégacaryocytes (MK), ils jouent un rôle primordial à la réparation vasculaire et au maintien de l'hémostase notamment dans l'hémostase primaire. En cas de brèche vasculaire, les plaquettes vont adhérer au sous endothélium vasculaire exposé grâce à leurs récepteurs d'adhésion, puis elles vont s'activer sur cette surface pour agréger et former un clou plaquettaire mettant fin au saignement, par un agrégat des thrombocytes reliées entre elles par le fibrinogène (Fg) pour fermer la brèche vasculaire.

Ainsi dans les cas de déficit quantitatif en ce type cellulaire ou en cas d'anomalie qualitative, les patients peuvent être exposés à un risque hémorragique plus ou moins important.

Comme dans le cas d'une thrombopathie constitutionnelle qui correspondent à un groupe de pathologies liées à des atteintes fonctionnelles thrombocytaires entraînant d'intensité variable. Ces pathologies thrombocytaires héréditaires sont dues à des anomalies génétiques affectant l'expression ou la fonctionnalité de protéines impliquées dans le contrôle de diverses étapes de l'activation des plaquettes en particulier la sécrétion, l'adhésion, l'agrégation et l'activité procoagulante.

Et parmi les types des thrombopathies constitutionnelles, le syndrome de Bernard Soulier est une dystrophie thrombocytaire hémorragique très rare (1 cas pour 10⁶ naissances) de transmission autosomique récessive, caractérisé par des thrombocytes géantes en nombre réduit (macrothrombopénie), un temps de saignement allongé pouvant dépasser les 20 min avec un défaut d'attachement des thrombocytes au niveau des sites de lésions vasculaires qui rend difficile la formation du caillot sanguin. Ce syndrome hémorragique est liée à un déficit génétique, quantitatif ou qualitatif en glycoprotéine GPIb-IX-V, complexe glyco-protéique de la membrane thrombocytaire qui joue un rôle essentiel dans l'hémostase primaire en tant que récepteur du facteur Von Willebrand (VWF).

Ce syndrome entraîne un risque élevé chez les patients hémorragique qui peut conduire à la mort à cause des thrombocytes non fonctionnels.

Dans l'espoir de prévenir ce risque un suivi adéquat des paramètres hématologique est nécessaire, qui est représenté par la détermination des apports quantitatifs des cellules sanguines et l'étude de la morphologie de ces cellules surtout les thrombocytes, aussi la

quantification des glycoprotéines plaquettaires pour repérer les cellules anormales et déterminer les caractéristiques phénotypique.

Ou hasard on à trouvé deux patients dans la willaya de Mostaganem d'origine Syrien. Pour cela cette étude à été réalisé au niveau du laboratoire d'analyse de l'hôpital d'Ain Tedles (Mostaganem) pendant une durée de 2 mois et le service d'hématologie et de thérapie cellulaire dans l'unité d'allogreffe de moelle osseuse au niveau de l'EHU 1^{er} novembre d'Oran pendant 2 semaines.

L'objectif est donc de vérifier le risque du syndrome de Bernard Soulier chez les deux patients par la réalisation des principales techniques d'analyse adoptées à cette maladie.

Le manuscrit est structuré en deux parties. La première présente une synthèse bibliographique en deux chapitres. Le premier concerne les plaquettes sanguines, et le deuxième chapitre est pour le syndrome de Bernard Soulier.

La partie pratique est subdivisée en deux partie : matériels et méthode et la partie résultats et discussion complétées par une conclusion générale rassemblant et interprétant les résultats obtenus de ce travail.

Chapitre I

1. Présentation générale des plaquettes sanguines :

1.1. Structure des plaquettes sanguines :

Les plaquettes ou thrombocytes sont les plus petits éléments figurés du sang. Elles ont été découvertes tardivement en 1882 par Bizzozero à cause de leur petite taille puis redécouvertes en 1960 après plusieurs décennies d'oubli (Gaetano, 2001; Rozman, 2002).

Se sont des cellules anucléées provenant de la fragmentation du cytoplasme de grandes cellules de la moelle osseuse hématopoïétique, les mégacaryocytes (Hertwig and Italiano, 2003). Elles sont rélargies dans le sang où leur nombre varie dans des conditions physiologiques de 150 000 à 400 000/μl. Leur durée de vie est 7 à 12 jours avant leur élimination par phagocytose des macrophages du système réticulo-histiocytaire au sein du foie, de la rate et la moelle osseuse (Figure 1).

Les thrombocytes sont les acteurs essentiels du maintien de l'intégrité vasculaire. Leur fonction majeure est d'assurer l'hémostase dite « primaire » conduisant à la formation d'un thrombus riche en thrombocytes ou « thrombus blanc » (Furie and Furie, 2008). Cependant, on s'aperçoit aujourd'hui qu'elles ont également un rôle important dans les processus de cicatrisation, de régulation de l'inflammation, d'angiogénèse et de séparation des vaisseaux lymphatiques et sanguins (Leslie, 2010).

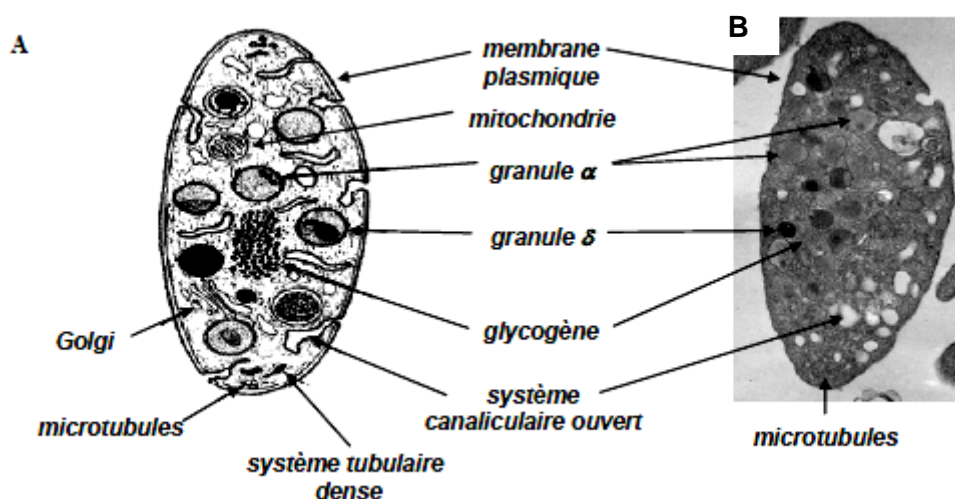


Figure 1: Morphologie et ultrastructure des thrombocytes (David, 2006).

A. Résumé des principales caractéristiques ultrastructurales observées sur une coupe longitudinale d'un thrombocyte discoïde. B. En regard une coupe de thrombocyte discoïde au repos examinée en microscopie électronique à transmission.

a. La membrane plasmique :

La membrane thrombocytaire est constituée à l'instar de toute membrane cellulaire d'une double couche phospholipidique au sein de laquelle sont ancrées des glycoprotéines hydrophobes responsables de la charge négative de la membrane et de ce fait des forces de répulsion existant entre thrombocytes elles mêmes et entre les thrombocytes et l'endothélium (**Boudreaux, 2010**).

Les phospholipides membranaires sont répartis de façon asymétrique; les phospholipides neutres étant sur l'hémi-membrane externe et les phospholipides négativement chargés sur l'hémi-membrane interne. Ils jouent un rôle important dans la modulation de l'activité thrombocytaire, en tant que messagers intracellulaires et métabolites.

L'asymétrie membranaire des phospholipides est maintenue par une translocase ATP dépendante dont le fonctionnement est influencé par la concentration cytoplasmique en calcium et les stocks d'ATP disponibles (**Lachenal, 2013**).

Lors de l'activation thrombocytaire, il y a une translocation de certains phospholipides chargés négativement vers l'hémi-membrane externe où ils jouent le rôle de co-facteur pour la thrombine et l'hydrolyse des phospholipides, entraînant la formation de thromboxane et l'activation de récepteurs membranaires (**Lachenal, 2013**).

Les glycoprotéines ancrées dans la membrane thrombocytaire jouent le rôle de récepteurs et elles transmettent des signaux vers les structures cytoplasmiques comme par exemple les structures contractiles ou sécrétrices.

Les principales glycoprotéines (GP) présentes à la surface de la cellule sont :

- GPIb-IX-V qui se lie au VWF ;
- GPVI qui se lie au collagène ;
- GPIIb-IIIa qui se lie au fibrinogène et permet de ce fait l'agrégation thrombocytaire.

Les thrombocytes possèdent également d'autres récepteurs membranaires pour de nombreux agonistes (PAF, thromboxane A₂, thrombine, ADP ...) (**Legru, 2009**).

b. Le cytoplasme (les organites):

Les organites comprennent des mitochondries, des grains de glycogène, le système tubulaire dense (STD), qui correspond au réticulum endoplasmique, séquestre le Ca²⁺ et des granules de stockage dont le contenu est sécrété lors de l'activation (**Tableau 1**) (**Boneu and Cazenave 1997 ; Ruiz et al., 2004**). Ces derniers sont de trois types. Les

granules α sont les plus abondants et contiennent notamment des glycoprotéines adhésives, des facteurs de coagulation et des facteurs de croissance. Les granules denses ou δ renferment de forte concentration de substance pro-agrégantes et pro-coagulantes comme l'ADP, l'ATP, le Ca^{2+} et les polyphosphates. Enfin les granules λ sont analogues aux lysosomes et contiennent de nombreuses protéases (**Boneu and Cazenave 1997 ; Ruiz et al., 2004**).

Les thrombocytes ne contiennent pas de noyaux, néanmoins elles renferment des ARNm issus des mégacaryocytes. Elles possèdent l'équipement nécessaire (polyribosomes, réticulum endoplasmique rugueux) pour la traduction de ces ARNm. Cependant, cette activité traductionnelle est principalement limitée aux thrombocytes nouvellement formées ou activées par des agonistes (**Gnatenko et al., 2003**).

Tableau 1 : Principales substances contenues dans les granules thrombocytaires. (**Mackman, 2004**;)

granules α	granules denses δ	granules λ
<p>glycoprotéines adhésives (Ex : fibrinogène, FW, TSP-1, fibronectine, vitronectine)</p> <p>facteurs de coagulation (Ex : facteurs V, XI, XIII, facteurs tissulaire, kininogène de haut poids moléculaire)</p> <p>Inhibiteurs de la fibrinolyse (Ex : α_2-antiplasmine, PAI-1)</p> <p>Facteurs de croissance et chimiokines (Ex : PDGF, TGFβ, EGF, VEGF, PF4)</p> <p>P-sélectine</p> <p>Albumine</p>	<p>ADP (~ 650 mM)</p> <p>ATP (~ 440 mM)</p> <p>Sérotonine (~ 650mM)</p> <p>Pyrophosphates (~ 650mM)</p> <p>Polyphosphates (~ 650mM)</p> <p>Ca^{2+} (~ 2 M)</p>	<p>Hydrolases acides (Ex : cathepsines)</p> <p>Métalloprotéases (Ex :collagénases)</p>

EGF : epidermal growth factor ; PAI-1 : plasminogen activator inhibitor-1 ; PDGF : platelet-driven growth factor ; PF4 : platelet factor 4 ; TGF β : transforming growth factor β ; TSP-1 : thrombospondine-1 ; VEGF : vascular endothelial growth factor

1.2. La formation des thrombocytes : la thrombopoïèse

La formation se déroule dans la moelle osseuse, les thrombocytes sont produites à partir de la prolifération et de la différenciation des progénitures mégacaryocytaires médullaires usées des cellules souches hématopoïétiques (**Hoffman, 1989 ; Vainchenker et**

al., 1995) par la mégacaryocytopoïèse (**Figure 2**). Leur nombre usuel circulant dans le sang périphérique est de $150-400 \cdot 10^9$ Plts /l. Environ $2 \cdot 10^{11}$ Plts doivent être produites chaque jour chez l'homme adulte, chaque seconde, approximativement $2 \cdot 10^6$ Plts sont produites dans le corps humain (**Beutler, 2001**).

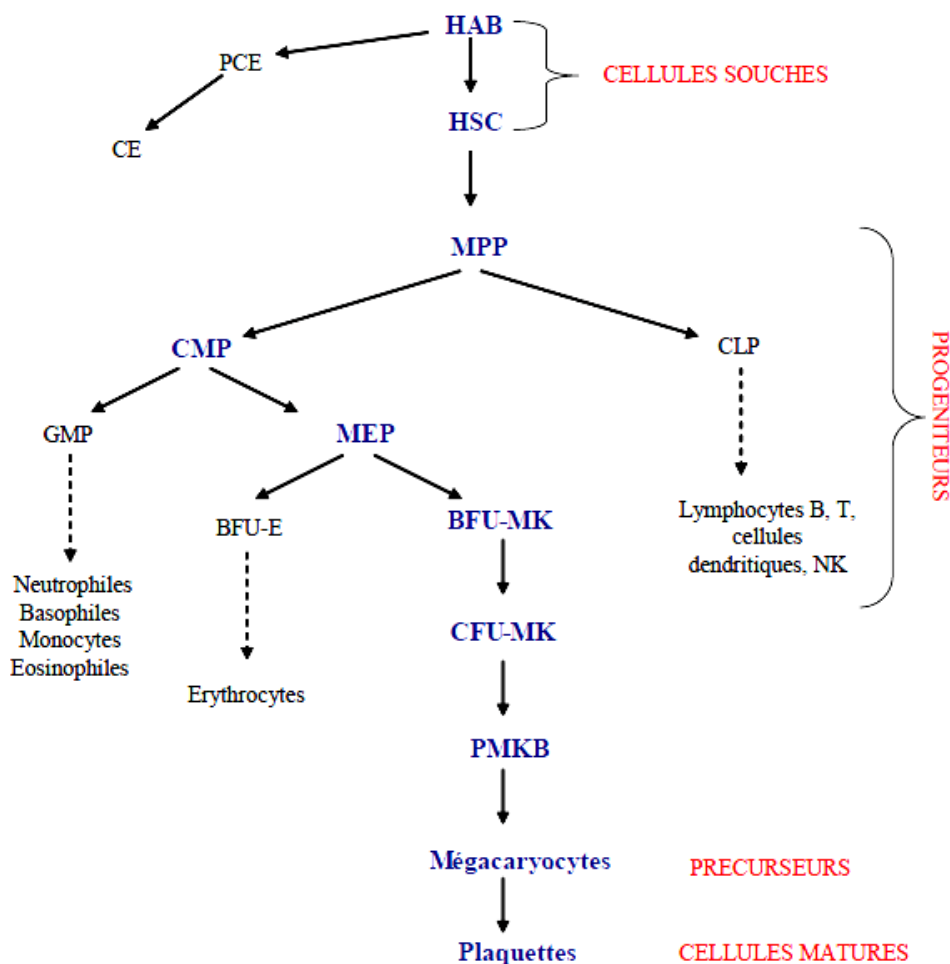


Figure 2 : Développement des mégacaryocytes et formation des thrombocytes sanguins.

(Guillot, 2008)

HAB: hémangioblaste, HSC: cellule souche hématopoïétique, PCE: progéniteur de cellule endothéliale, CE: cellule endothéliale, MPP: progéniteur multipotent, CLP: progéniteur commun lymphoïde, CMP: progéniteur commun myéloïde, GMP: progéniteur granulocyte/monocyte, MEP: progéniteur érythrocyte/mégacaryocyte, BFU-E: "burst-forming unit erythrocyte" ou progéniteur érythrocyte précoce, BFU-MK: "burst-forming unit megakaryocyte" ou progéniteur mégacaryocyte précoce, CFU-MK: "colony-forming unit megakaryocyte" ou progéniteur mégacaryocyte tardif, PMKB: promégacaryoblaste.

1.2.1. La formation des proplaquettes :

A ce stade, les mégacaryocytes sont polyploïdes (4N-128N) avec un noyau multilobé.

Le cytoplasme renferme un important système membranaire interne (granules, réseau de membrane de démarcation). Ce système de membrane de démarcation (DMS) est en

continuité avec la membrane plasmique et se définit comme un réservoir de membrane indispensable pour la formation des proplaquettes (**Patel et al., 2005**).

L'élaboration des thrombocytes est un processus dynamique impliquant notamment les éléments du cytosquelette. La formation des proplaquettes nécessite une grande organisation de manière à transformer le cytoplasme des mégacaryocytes, cellules de grande taille donc d'un volume important, en prolongements cytoplasmiques de 100 à 500 μm de long et de 2 à 4 μm de diamètre (**Figure 3**).

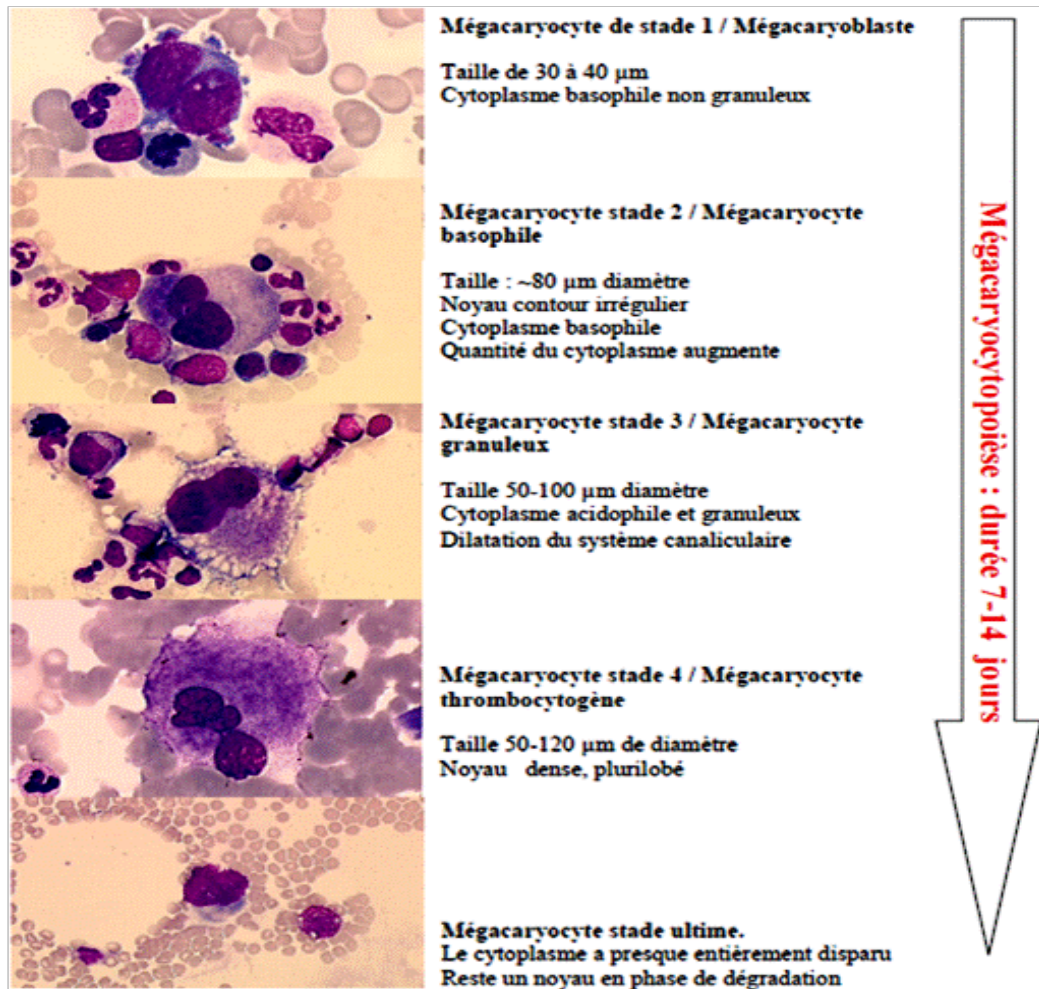


Figure 3 : Modifications morphologiques des précurseurs au cours de la mégacaryocytopoïèse. (D'après le laboratoire d'hématologie du CHU d'Angers).

Observations par microscopie d'un frottis médullaire coloré au May-Grumwald Giemsa,

L'existence des proplaquettes a été démontrée à la fois sur des modèles murins (**Poujol et al., 1998; Italiano et al., 1999**), puis validée chez l'homme (**Choi et al., 1995; Cramer et al., 1997**). Les données de la littérature indiquent que la formation des proplaquettes commence à un seul endroit à la surface du mégacaryocyte. Puis par vagues

successives se produit une arborescence pour former un réseau interconnecté de proplaquettes. L'allure générale de ces proplaquettes est une succession de renflements reliés par de fins ponts cytoplasmiques. La formation des proplaquettes se poursuit jusqu'à l'utilisation complète du cytoplasme et du DMS. A terme le noyau du mégacaryocyte est compacté et expulsé du corps de la cellule pour être dégradé. La libération des thrombocytes ne se produit qu'à l'extrémité de ces proplaquettes. En effet Italiano et al. ont montré sur des mégacaryocytes de souris analysés en vidéo-microscopie, que la formation des thrombocytes murins se fait à l'extrémité distale des proplaquettes (**Italiano et al., 1999**).

Le système des microtubules (dimères de tubulines α et $\beta 1$) joue un rôle important dans la formation des proplaquettes et la libération des thrombocytes (**Cramer et al., 1997**). Les microtubules s'organisent en anneau à l'extrémité des proplaquettes de façon très similaire à leur organisation dans les thrombocytes circulantes (**Schulze et al., 2004**). La présence de la tubuline $\beta 1$ est indispensable à la formation des proplaquettes, des thrombocytes et une absence de microtubules entraînent une thrombocytopénie (**Tablin et al., 1990; Schwer et al., 2001**).

L'organisation des proplaquettes et leur agencement est indispensable pour permettre une production importante et écologique de thrombocytes. Italiano et al. ont montré sur des mégacaryocytes murins que les proplaquettes forment de nombreuses ramifications ce qui permet de multiplier considérablement les extrémités libératrices de thrombocytes (**Italiano et al., 1999**). De plus, en utilisant la cytochalasine B (inhibiteur de l'assemblage de l'actine) les auteurs montrent que ceux-ci n'empêchent pas la formation et la croissance des proplaquettes mais que cela inhibe la formation de ramifications.

L'ensemble des organelles et des granules qui structurent les thrombocytes sont acheminés essentiellement grâce au réseau de microtubules et aux protéines associées (dynéine, kinésine). Ainsi les thrombocytes sont entièrement formés à l'extrémité des proplaquettes leur libération peut alors s'opérer.

1.2.2. La libération des thrombocytes :

Bien que la libération des thrombocytes se produise à l'extrémité des proplaquettes, ces cellules ne possèdent pas un chimiotactisme fort. Ce dernier implique que les thrombocytes doivent être libérés dans le courant sanguin donc dans les sinusoides médullaires de la moelle. Or la longueur des proplaquettes ne permet pas à l'ensemble des mégacaryocytes d'atteindre cette zone circulatoire. Les données de la littérature suggèrent

un rôle important du stroma médullaire en particulier le collagène de type 1; les mégacaryocytes via les récepteurs GP VI et l'intégrine $\alpha 2\beta 3$ interagissent avec le collagène ce qui réduit la formation de proplaquettes à l'intérieur de la moelle (**Sabri et al., 2004**). Le fibrinogène endothélial favorise la formation des proplaquettes. A ce titre, la présence de l'intégrine $\alpha \text{IIb}\beta 3$, récepteur au collagène, lorsqu'il est activé au fibrinogène, était indispensable pour la formation des proplaquettes (**Larson and Watson, 2006a; b**). Nous verrons qu'il est également important que les mégacaryocytes migrent vers les sinusoides vasculaires afin de permettre la libération des thrombocytes. Cette migration est contrôlée par des cytokines notamment le SDF-1.

La machinerie de l'apoptose serait impliquée dans la formation des thrombocytes. Les mégacaryocytes présentent lors de la libération des thrombocytes à leur surface un marquage positif à l'annexine V, une fragmentation de l'ADN et leur noyau est excentré (**Zauli et al., 1997**). De ce fait les expériences menées sur les protéines impliquées dans le phénomène d'apoptose ont été étudiées au niveau des mégacaryocytes matures. Ainsi la surexpression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 dans des mégacaryocytes CD41+ (ou GPIIb ou αIIb) inhibe totalement la formation des proplaquettes. Une fois les proplaquettes formées, l'activation des caspases devient diffuse dans tout le cytoplasme et conduit à l'apoptose du mégacaryocyte sénescant. En effet, l'élaboration de ces proplaquettes s'accompagne d'une activation des caspases 3 et 9. L'inhibition de l'activité des caspases empêche cette différenciation (**De Botton et al., 2002**).

Au final après 7 jours environs de différenciation, un mégacaryocyte (l'ensemble représente 0,05% des cellules de la moelle osseuse) produira en moyenne 10^4 thrombocytes ce qui conduit à la formation au total par l'ensemble des mégacaryocytes de 10^{11} thrombocytes par jour. Dans les 5 litres de sang, chez l'homme, la numération thrombocytaire se situe entre 150 et 400 000 thrombocytes / μL où 1/3 des thrombocytes sont séquestrées dans la rate. Leur durée de vie est en moyenne de 8 à 10 jours et la production de thrombocytes peut être multipliée par 10 en cas de stress suggérant ainsi une homéostasie réactive (24-48 heures après une thrombocytopenie induite) (**Deutsch and Tomer, 2006**).

Ainsi la formation des thrombocytes fait intervenir un certain nombre d'éléments : les mégacaryocytes qui vont les produire, un environnement qui conditionne en partie cette production, et des cytokines régulatrices. Comme nous allons le décrire succinctement dans la partie suivante, différents niveaux de signalisation sont mis en jeu favorisant ou diminuant l'équilibre à la fois de la mégacaryocytopoïèse et de la thrombocytopoïèse.

1.3. Les fonctions des thrombocytes :

Le rôle principal des thrombocytes est de maintenir l'intégrité des vaisseaux sanguins à travers l'hémostase (**Frojmovic et al., 1982**). Les mécanismes qui sont responsables de la formation d'un thrombus thrombocytaire artériel sont les mêmes mécanismes qui sont impliqués dans l'hémostase physiologique (**Ross, 1999**). Les thrombocytes circulants peuvent différer en taille et en potentiel hémostatique (**Frojmovic et al., 1982 ; van der Loo and Martin, 1997**). L'activation des thrombocytes leur permet ensuite d'adhérer, de sécréter et d'agréger (**Moog et al., 2001**). Le risque de l'athérosclérose coronarienne est surtout lié au risque de déclenchement du processus thrombotique à la surface d'une plaque rompue. L'exposition de cette surface thrombogène induit l'adhésion des thrombocytes circulants. Ceci implique différents récepteurs membranaires thrombocytaires permettant d'accomplir les fonctions des thrombocytes qui sont: le complexe GPIb/IX/V, un récepteur principal pour le vWf, la GPIIb/IIIa qui lie le fibrinogène quand il est activé, et la P-sélectine qui permet aux thrombocytes d'interagir avec plusieurs types cellulaires (**Giesberts et al., 1995 ; Schneider et al., 2000**).

Bien que l'hémostase constitue le rôle principal des thrombocytes, ces derniers participent également à d'autres processus physiologiques comme l'inflammation (**Rondina et al., 2013**) et la néoangiogenèse (**Kisucka et al., 2006**), notamment en sécrétant leur contenu granulaire. Ou la formation des vaisseaux lymphatiques (**Bertozi et al., 2010**), la progression tumorale (**Pinedo et al., 1998**) et la dissémination métastatique (**Labelle et al., 2011**), notamment par l'interaction directe des glycoprotéines membranaires.

En plus de ces derniers, les thrombocytes sont considérés comme des cellules immunes. En effet, ces cellules expriment des récepteurs étant capables de détecter des pathogènes et de sécréter plusieurs molécules inflammatoires et/ou immunomodulatrices qui peuvent interagir avec les autres cellules immunes (ou non immunes comme les cellules endothéliales – EC) de l'environnement et moduler les réponses cellulaires de l'immunité innée ainsi qu'adaptative (**Cognasse et al., 2005**).

2. La physiologie thrombocytaire et le rôle des thrombocytes dans l'hémostase

2.1. Généralité sur l'hémostase:

L'hémostase regroupe l'ensemble des processus physiologique qui arrêtent le saignement suite à une lésion vasculaire (Versteeg, Heemeskerk et al., 2013). L'hémostase se compose de trois étapes intriquées et interdépendantes, qui se nomment l'hémostase primaire, la coagulation et la fibrinolyse. Ces trois étapes nécessitent une contribution adéquates de trois éléments, qu'ils sont : i) la paroi vasculaire, ii) les éléments du sang, en particulier les thrombocytes et certains protéines plasmatiques, et iii) les forces hémodynamiques. L'hémostase primaire comprend une vasoconstriction, qui en ralentissant le débit sanguin réduit l'hémorragie, et conduit à la formation d'un clou thrombocytaire obturant la brèche vasculaire. La coagulation résulte d'une cascade enzymatique qui mène à la génération de thrombine puis à la formation d'un réseau de fibrine insoluble permettant de consolider le clou thrombocytaire. Enfin, la fibrinolyse résorbe le clou fibrino- thrombocytaire, rétablissant une circulation sanguine normale (Figure 4) (Furie et Furie, 2008 ; Versteeg, Heemeskerk et al., 2013).

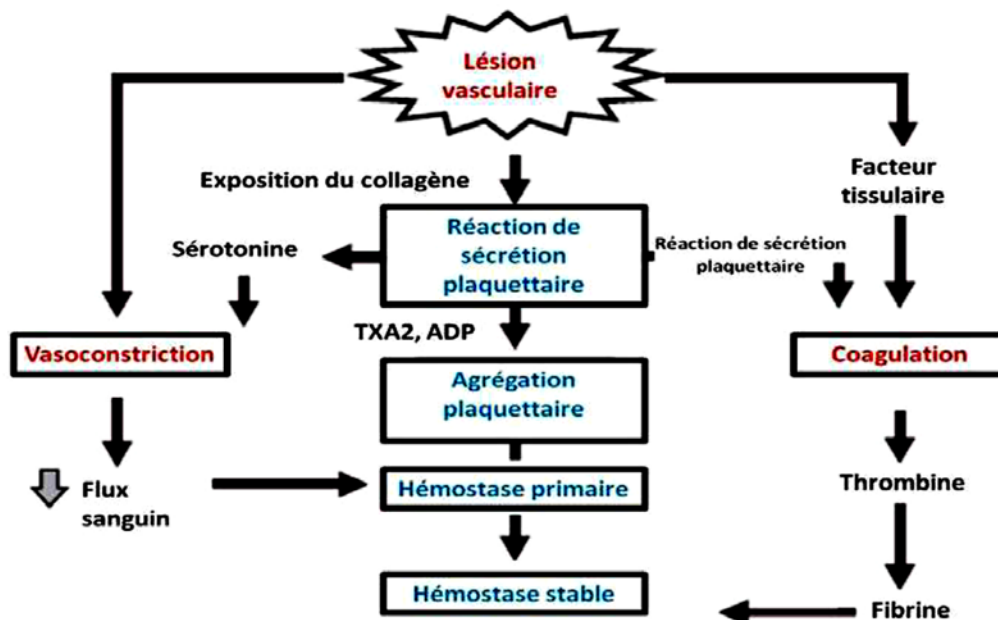


Figure 4 : Les phases de l'hémostase (Colvin, 2004)

2.2. L'hémostase primaire :

L'hémostase primaire correspond à la première étape de l'hémostase, phénomène physiologique servant à stopper le saignement. Ce processus implique la paroi vasculaire,

les thrombocytes, les facteurs de coagulation et les protéines adhésives qui aboutissent à l'obturation de la brèche vasculaire grâce à la formation d'un thrombus blanc fibrino-thrombocytaire (Cines et al., 1998).

La formation du clou thrombocytaire intervient dans plusieurs étapes à savoir :

- vasoconstriction ;
- adhésion des thrombocytes au sous endothélium ;
- activation et sécrétion thrombocytaire ;
- agrégation des thrombocytes entre elles avec formation d'un clou thrombocytaire.

Ce processus est rapidement mis en oeuvre et conduit à la formation d'un clou thrombocytaire (ou thrombus blanc) fragile qui sera consolidé au cours de l'hémostase secondaire par un réseau de fibrine (De Revel, 2004 ; Legru, 2009). (Figure 5).

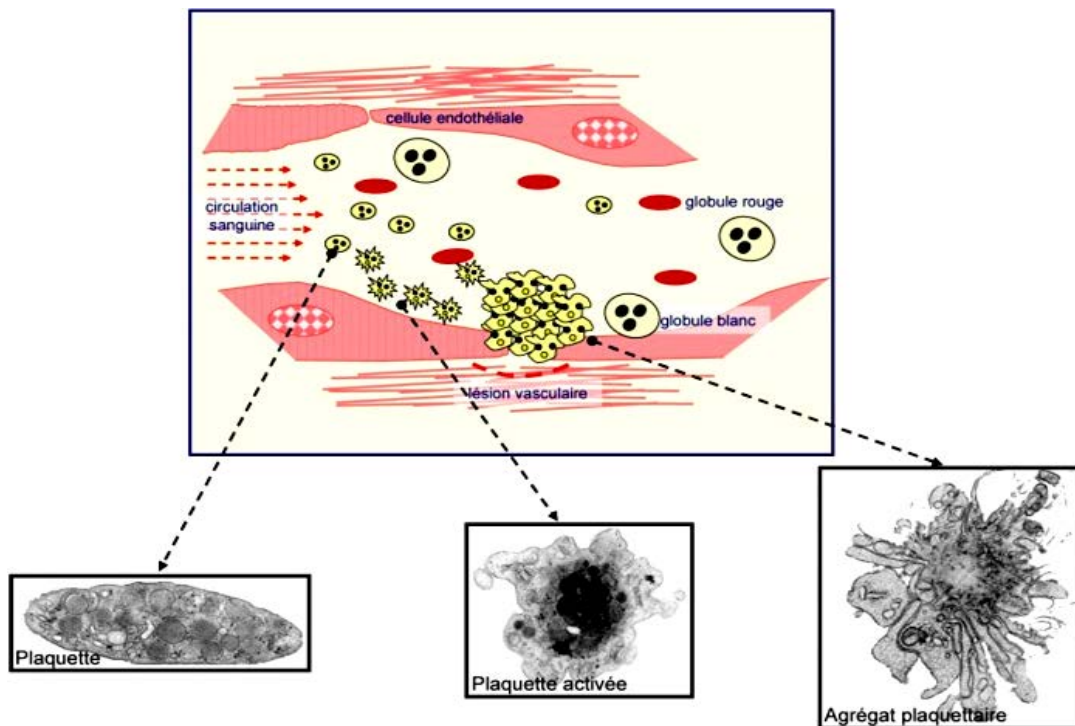


Figure 5 : les étapes de L'hémostase primaire (<http://www.maladies-plaquettes.org/administration/media/tiny-mce/images/rub1/flux-sanguin.jpg>)

2.2.1. La phase vasculaire

Suite à la rupture d'une région de l'endothélium, une vasoconstriction passive se met en place. Celle-ci est due à l'élasticité intrinsèque des vaisseaux sanguins. De plus, l'endothélium sécrète de nombreuses hormones qui entraînent la vasoconstriction, cette fois active, du vaisseau sanguin et favorisent ainsi, l'agrégation thrombocytaire et la coagulation (Cines, et al., 1998).

Parallèlement, les cellules endothéliales adjacentes de la lésion perdent leurs propriétés antithrombotiques pour devenir pro-thrombotiques, en présentant à leur surface des facteurs tissulaires, ce qui participe à l'activation des thrombocytes pour initier la seconde phase de l'hémostase primaire (Marmur, et al., 1993). En condition physiologique, les cellules endothéliales plus éloignées continuent de présenter à leur surface des protéines anti-thrombotiques, ce qui empêche la dissémination des réactions hémostatiques.

2.2.2. L'adhésion thrombocytaire :

Les thrombocytes adhèrent, sur les berges de la plaie vasculaire, au collagène dénudé et à la matrice extracellulaire sous-endothéliale du tissu conjonctif en présence d'un cofacteur, le facteur vWF. Cette protéine plasmatique est synthétisée par les cellules endothéliales et les thrombocytes; elle est nécessaire pour l'adhésion des thrombocytes aux fibres de collagène: elle réalise un pont moléculaire entre le collagène exposé et le récepteur des différentes glycoprotéines (GPs) situées sur la surface des thrombocytes activées. Les GPs thrombocytaires sont des complexes phospholipidiques, comme GPIb-IX-V et GPIIb-IIIa, qui jouent un rôle crucial dans la coagulation intrinsèque, car elles possèdent des sites de liaison pour le calcium et les facteurs plasmatiques.

Les thrombocytes forment initialement une monocouche recouvrant la brèche vasculaire et leur activation se fait en quelques secondes (10 à 20 s). Les thrombocytes adhèrent au vWF fixé sur le collagène sous-endothélial (type I ou III) par l'intermédiaire du récepteur GPIb-IX-V. Cette adhésion est passagère et réversible : pendant cette phase, les thrombocytes peuvent se déplacer lentement sur les berges de la plaie et éventuellement s'en détacher si elles ne sont pas activées.

D'autres interactions contribuent également au processus d'adhésion : par exemple, la liaison entre le récepteur thrombocytaire du collagène de la GPIa-IIa/VI et les fibrilles de collagène sous-endothélial, lorsque le flux sanguin est faible comme dans les capillaires (Nizamaldin et al, 2012).

2.2.3. L'activation thrombocytaire :

L'activation des thrombocytes est caractérisée par deux phénomènes principaux: leur changement de forme et leur activation métabolique. Il s'agit de processus actifs nécessitant de l'énergie (sous forme d'ATP) et la disponibilité intracytoplasmique des ions

calcium (Ca^{2+}) indispensables à l'activation du système contractile actinomyosine. Détaillons ces deux mécanismes:

a. Le changement de forme :

Il est dû à un influx de calcium permettant la phosphorylation de la myosine et sa liaison à l'actine, phénomène responsable du changement de forme thrombocytaire. Discoïdes à l'état de repos les thrombocytes activés deviennent sphériques, émettent des pseudopodes (**Figure 6**).

Seules les thrombocytes en contact avec le substrat s'étalent et couvrent une surface importante de fibrilles conjonctives. Le vWF et la fibronectine multiplient alors les liens entre le thrombocyte et la paroi. C'est l'adhésion secondaire qui est irréversible.

Les thrombocytes recrutés par la suite émettent, quant à elles, des pseudopodes. C'est l'enchevêtrement de leurs pseudopodes qui permet une meilleure agrégation et la formation du clou thrombocytaire.

Suite au changement de forme survient la phase de sécrétion (release) qui est un processus d'exocytose. En effet, la réorganisation des microtubules et des microfilaments intra thrombocytaires induit la migration des granules qui se rassemblent dans la partie centrale du cytoplasme. Les granules fusionnent avec le système canaliculaire ouvert et libèrent leur contenu qui se déverse ainsi dans le plasma environnant.

Ce phénomène permet la libération de nombreuses substances proagrégantes (ADP, fibrinogène, sérotonine), procoagulantes (facteur V, VWF, fibrinogène) ou vasomotrices (sérotonine, NO, TXA2) contribuant à l'amplification du processus d'hémostase primaire et créant les conditions favorables à la coagulation plasmatique (**Renard, 2006**).

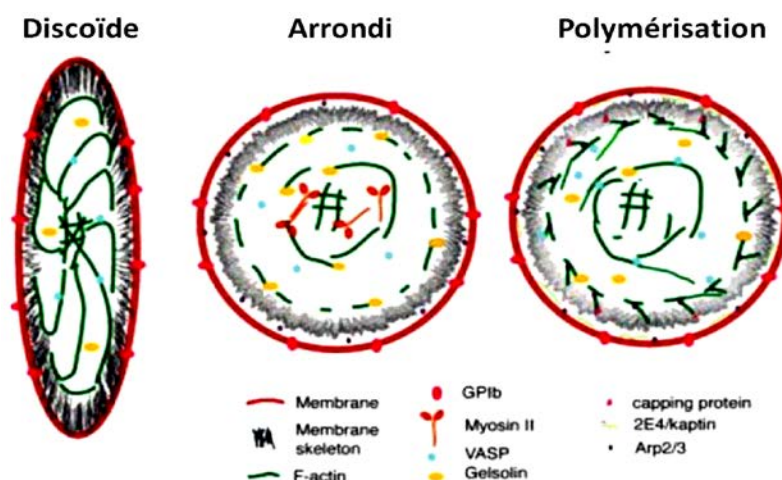


Figure 6 : le changement de forme des thrombocytes dans l'adhésion et l'activation thrombocytaire (**Bearer et al., 2002**).

b. L'activation métabolique :

Après l'adhésion, les thrombocytes sont activés par le collagène sous-endothélial et par la thrombine générée à leur surface. Les thrombocytes interagissent avec le collagène par le GPIa/IIa et avec la thrombine par son récepteur fonctionnel. La thrombine active les thrombocytes par l'intermédiaire de protéines G couplées au récepteur de la thrombine (protéine G_p, qui active la phospholipase C (PLC) et protéine G_i, qui inhibe l'activité de l'adénylate cyclase (AC) et réduit le taux d'AMPc). L'augmentation du calcium cytosolique et l'activation de la protéine kinase C ont pour conséquence l'activation de la phospholipase A, qui transforme l'acide arachidonique (AA) des phospholipides membranaires en prostaglandines (PG) G₂, puis en PGH₂ par la cyclo-oxygénase. Le PGH₂ est converti en TXA₂. L'activation thrombocytaire entraîne la contraction des microtubules et la libération du contenu des granulations endogènes. Les granules denses fusionnent d'abord avec la membrane et libèrent leur contenu, notamment l'ADP, qui est un activateur secondaire et un agent agrégeant, qui va recruter les thrombocytes naïfs au niveau de la lésion vasculaire. L'activation thrombocytaire déclenche des réponses telles que l'adhésion ou la sécrétion ou l'agrégation thrombocytaire, que ce soit par des forces de cisaillement élevées, ou par un endommagement ou dysfonction endothéliale ou par un agoniste (**Dandachli, 2010**). (**Figure 7**).

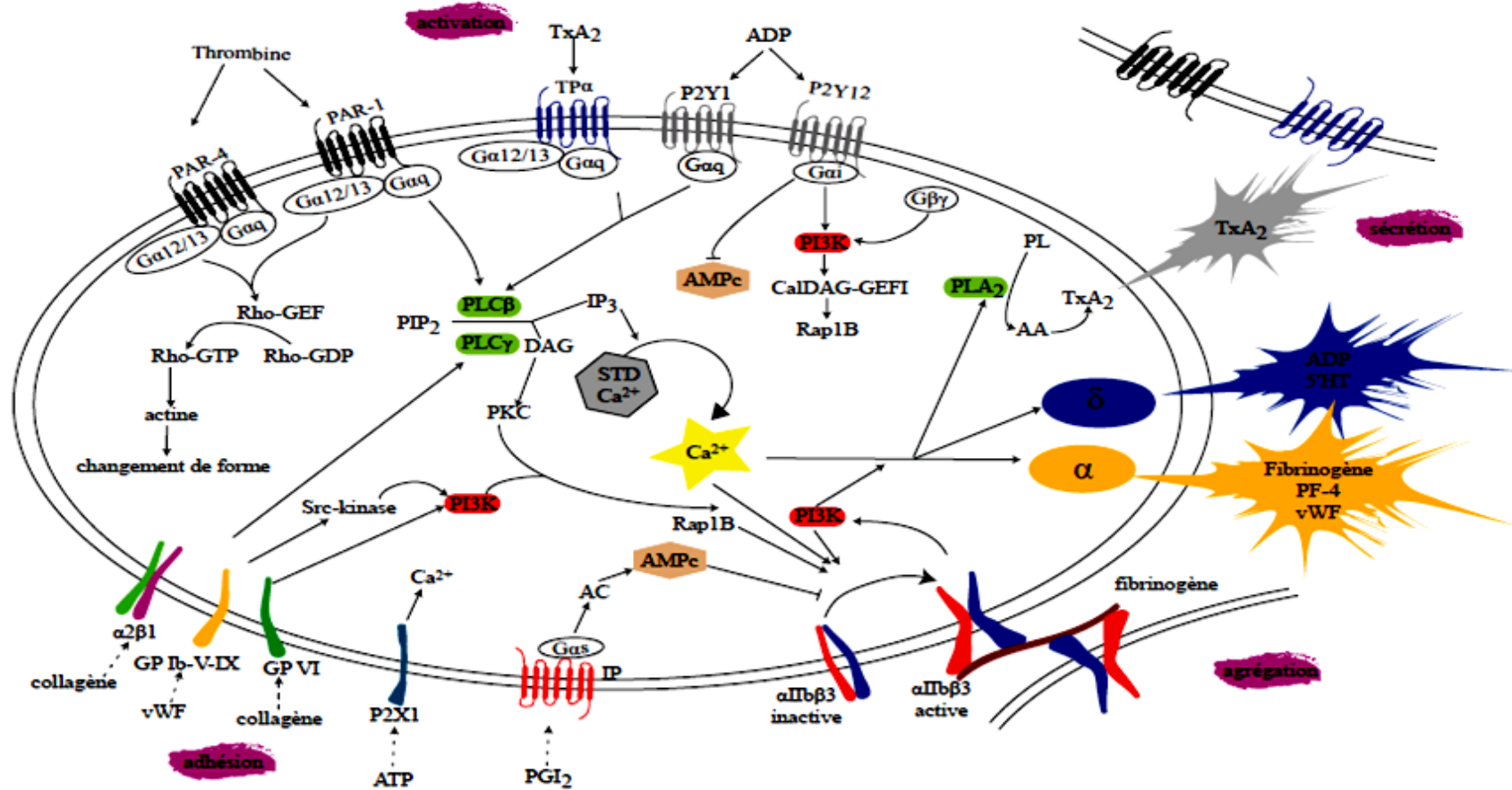


Figure 7 : Voies de signalisation mises en jeu lors de l'activation thrombocytaire (Woulfe D.S. 2005).

Les agonites interagissent avec leurs récepteurs spécifiques et déclenchent différents signaux intracellulaires avec principalement: activation de la PLC, formation d'IP3 et de DAG, activation de la PI3 kinase et de la cPLA2, libération de l'acide arachidonique et formation de thromboxane A2 puissant agent pro-agrégant. Il se produit en même temps une dégranulation (granules α et δ) ce qui amplifie la réponse thrombocytaire.

vWF: facteur von Willebrand, delta: granule delta, alpha: granule alpha, STD: système tubulaire dense, IP3: inositol 1,4,5 triphosphate, PF-4: facteur thrombocytaire 4, PL: phospholipide, AA: acide arachidonique, TxA2: thromboxane A2, 5HT: sérotonine, PLC/A2: phospholipase C/A2, PI3K: phosphoinositide 3 kinase, AC: adénylate cyclase

2.2.4. L'agrégation thrombocytaire :

L'agrégation thrombocytaire est le processus au cours duquel, les thrombocytes adhèrent les uns sur les autres aux sites de lésion vasculaire formant le clou thrombocytaire. Ce processus est déclenché transitoirement pendant la première activation thrombocytaire ensuite amplifiée par la fixation du Fg sur son récepteur α IIb β 3 activé (**Li et al., 2010**). La signalisation « inside-out » conduit au changement conformationnel des intégrines augmentant sa concentration au niveau membranaire et son affinité avec les ligands solubles particulièrement le Fg. Ce ligand devient donc un substrat adhésif pour engager les autres thrombocytes adjacents aux agrégats. Par ailleurs, l'interaction de l'intégrine α IIb β 3 – Fg stabilise l'agrégation grâce à la signalisation « outside-in » et la formation de la fibrine ancre les agrégats thrombocytaires à la paroi du vaisseau. Lors de contraintes de cisaillement élevé, l'agrégation est plus dépendante de l'interaction du vWF/Fn qu'avec les intégrines α IIb β 3 (**Jackson, 2007**) (**tableau 2**).

Tableau 2 : Rôle de l'interaction des récepteurs thrombocytaires avec leurs ligands solubles et les voies de signalisations dans les réponses thrombocytaires (**Li et al., 2010**)(modifié).

Phase de réponse	Ligands	Récepteurs	Voie de signalisation
Adhésion	vWf	GP Ib-IX-V (CD42a, b, c)	PI3K
	Collagène	Intégrine $\alpha_2\beta_1$, GP VIFcR γ	PI3K, PLC γ
	Fg, fibrine (Fn)	Intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ = GP IIb-IIIa (CD41 + CD61= CD41b)	
	Fibronectine (fn)	Intégrine $\alpha_5\beta_1$	
	Laminine	Intégrine $\alpha_6\beta_1$	
	Thrombospondine	GP IV (CD36)	
Activation	Thrombine	PAR1, PAR4	Gq, G12/13, PLC β
	ADP	P2Y1, P2Y12	Gq, Gi, Rho, PLC β
	TxA2	TP α , TP β	Gq, G12/13, PLC β
	Adrénaline	α_2A	Gz
	Sérotonine	5-HT2A	Gq
Agrégation	Fg, fn, vWf	Intégrine α IIb β 3 activée	PI3K, PLC γ
	vWf	GP Ib-IX-V	PI3K
Stabilisation/Rétraction	P-sélectine	GP Ib-IX-V	
	CD40L	Intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$	
	Fn	Intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$	

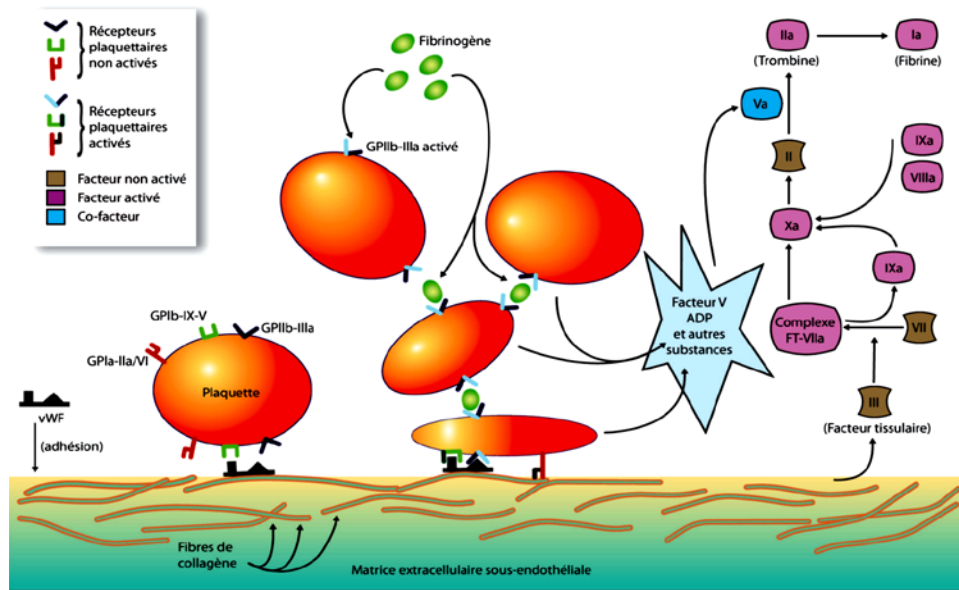


Figure 8 : Phases successives de la formation du thrombus blanc : adhésion, activation, agrégation. (Modifié d'après Kasirer-Freide et al., 2004)

3. Les principaux récepteurs thrombocytaires :

3.1. Les récepteurs d'adhésion :

3.1.1. Le complexe GPIb-IX-V :

Le complexe GPIb-V-IX est le principal récepteur du facteur Willebrand (FW). Il appartient à la famille des protéines riches en leucine, qui assurent des interactions protéines-protéines et sont impliquées dans des fonctions d'adhérence et de signalisation cellulaire (Kobe and Kajava, 2001). Il est constitué de 4 GP transmembranaires de type I : la GPIb α (135 kDa) et la GPIb β (26 kDa) qui sont liées par un pont disulfure, la GPV (82 kDa) et la GPIX (20 kDa) qui sont associées de manière non covalente (Luo, Mo et al., 2007). A la surface du thrombocyte, on dénombre environ 25 000 copies du complexe GPIb-IX et 12 000 copies de GPV (Luo and Li, 2008). (Figure 9).

Le complexe glycoprotéique GPIb-V-IX thrombocytaire, assure une fonction clé en hémostase en se liant au vWF, ce qui permet le recrutement des thrombocytes circulantes au niveau d'une brèche vasculaire. Cette liaison, impliquant la partie extracellulaire de la GPIb α , assure l'adhésion dans les conditions très particulières de flux élevé des artères et de la microcirculation. Une étape de roulement et de ralentissement des thrombocytes précède leur adhésion stable, leur activation, et finalement l'agrégation et la formation du clou thrombocytaire. L'adhésion s'accompagne d'une signalisation intracellulaire, propre au GPIb-V-IX, en réponse au vWF immobilisé sur une surface et qui se traduit par le changement de forme des thrombocytes et l'émission de filopodes. La voie de signalisation

implique une kinase de la famille Src, l'activation de $PLC\gamma_2$, la production d'IP₃ et la mobilisation des stocks internes de Ca^{2+} . Cette activation initiale de faible intensité s'amplifie pour aboutir à l'activation de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ et à l'étalement des thrombocytes. Dans une majorité d'études l'activation thrombocytaire *via* la GPIb-V-IX a été décrite dans l'agrégomètre et en réponse au facteur Willebrand soluble. Dans ces conditions, la signalisation mesurée n'est pas directement due au complexe GPIb-V-IX mais résulte majoritairement de voies d'amplification par des agonistes sécrétés (ADP) ou synthétisés (TxA₂) par le thrombocyte et requiert l'activation de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$. Ces réponses impliquent des effecteurs, PI3 kinase, MAP kinases et PKC, qui ne dépendent pas strictement du complexe GPIb-V-IX. Les domaines cytoplasmiques du complexe impliqués dans sa signalisation propre restent à identifier. Les portions intracellulaires des sous-unités GPIb α et GPIb β , qui ne possèdent pas d'activité enzymatique, contiennent des sites de liaison pour des partenaires qui interagissent directement (filamine, 14-3-3 ζ , et calmoduline) ou indirectement (PI3kinase, SHIP-2 et a-actinine), et dont la fonction reste à établir. (Lanza et al., 2008)

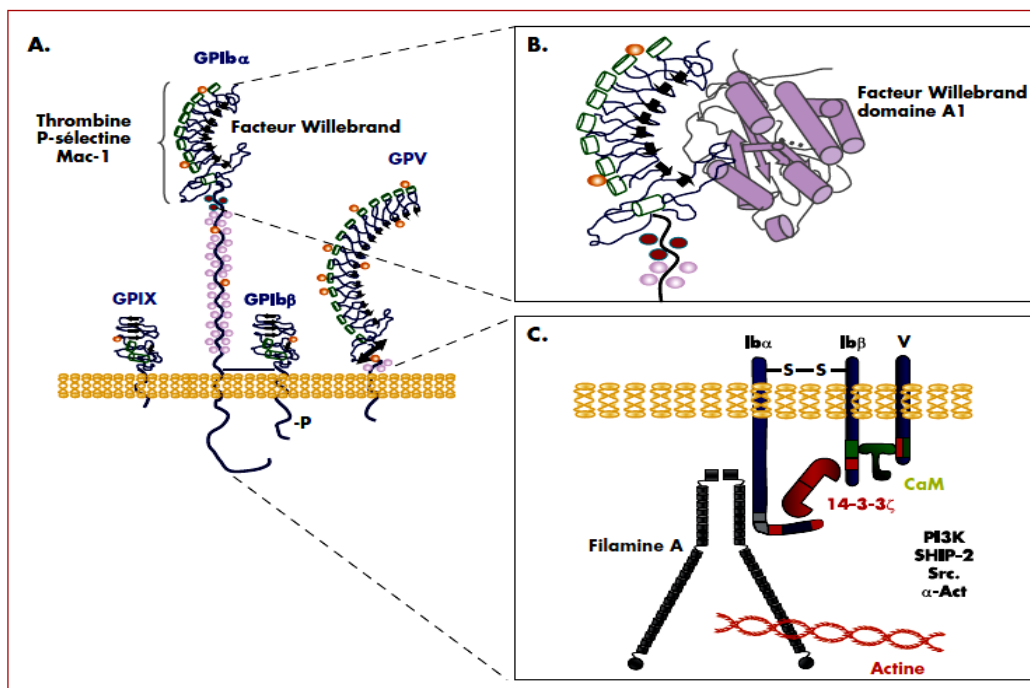


Figure 9 : Structure du GPIb-V-IX et domaines fonctionnels. (Lanza et al., 2008)

A) Le complexe GPIb-V-IX est constitué de la sous-unité GPIba, GPIbb, GPIIX et GPV. Les régions extracellulaires contiennent un ou plusieurs domaines riches en leucine (LR). La partie LR N-terminale de la GPIba contient les sites de liaison pour le facteur Willebrand, la thrombine, la P-sélectine et l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ (Mac-1). Une région étirée richement O-glycosylée est située en aval du domaine LR. B) Le domaine A1 du facteur Willebrand interagit avec les extrémités N et C-terminales de la région LR. C) la partie intracellulaire du complexe interagit avec trois partenaires directs. La filamine A se lie au GPIba permettant un pontage avec l'actine sous membranaire. La protéine 14-3-3 ζ se lie à la fois à la GPIba et à la GPIbb. La calmoduline (CaM) se lie à la GPIbb et à la GPV. La PI3 kinase, SHIP-2, Src et l'a-actinine (a-Act) interagissent indirectement.

3.1.2. Le complexe GPVI:

Le GPVI est une glycoprotéine de 58 kDa exprimée spécifiquement dans la lignée mégacaryocytaire à raison de 3000 à 5000 copier par thrombocyte (**best et al., 2003**). Elle comporte deux domaines extracellulaires de type immunoglobuline interagissant avec le collagène fibrillaire. Par sa région transmembranaire, elle s'associe à la chaîne γ des récepteurs Fc (FcR γ), qui est nécessaire à son expression et lui assure une capacité de signalisation (**Watson et al., 2005**). La GPVI est un récepteur de faible affinité pour le collagène, auquel elle permet l'attachement des thrombocytes en condition statique. En présence de flux, sa principale fonction est d'induire l'activation d'intégrines $\alpha_2\beta_1$ et $\alpha_{IIb}\beta_3$ via notamment le relargage d'ADP et de TxA₂, ce qui conduit à l'adhérence et l'agrégation des thrombocytes (**Sarratt et al., 2005**).

Le récepteur thrombocytaire majeur du collagène est la GPVI, qui s'associe avec le récepteur FcR γ contenant deux sites ITAM dont la phosphorylation par le Src, Lyn et Fyn conduit à la cascade de recrutement et de phosphorylation du SYK, puis des protéines adaptatrice de type LAT et de la PLC γ 2. LAT sont associées directement à la PI3k.

Ce complexe permet le recrutement de la PIP3 qui se lie au domaine PH de la PLC γ 2 phosphorylée favorisant son association avec la membrane (**Watson et al., 2001**). Cette cascade de signalisation permet la libération des molécules de message secondaire tel que le DAG et l'IP3 dans les thrombocytes, initialisant l'activation thrombocytaire. L'IP3 favorise la sécrétion du Ca²⁺ à partir du système tubulaire et le DAG active la PKC puis le Rap1b conduisant à l'activation de la GPIIb/IIIa (signalisation inside-out) (**Watson et al., 2005**) (**Figure 10**).

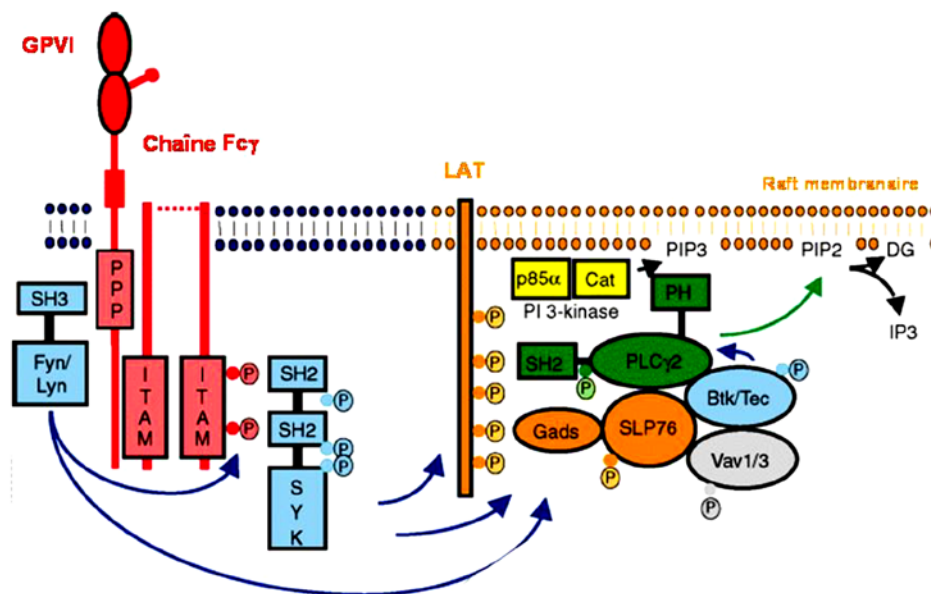


Figure 10 : Cascade de signalisation de GPVI (Watson et al., 2005).

DDG : diacylglycérol ; GADs : Grb2adaptor downstream of Shc ; FcR γ : Chaîne γ des récepteurs Fc ; LAT : Linker of activation of T cell ; PIP₂ : Phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate ; PIP₃ : Phosphatidylinositol 3, 4, 5-triphosphate ; SLP-76 : Src homology 2 domain-containing leukocyte protein of 76kDa ; Syk : spleen tyrosine kinase

3.2. Les récepteurs d'activation :

3.2.1. Les récepteurs couplés aux protéines G hétérotrimériques (RCPG)

Le recrutement davantage de thrombocytes est permis par l'accumulation dans une zone restreinte au niveau de la lésion, de médiateurs produits et/ou libérés par les thrombocytes.

Ces médiateurs sont principalement les nucléotides ADP/ATP, le thromboxane A2 (TxA2) produit par les thrombocytes, et la thrombine générée via le facteur tissulaire plasmatique sur la surface des thrombocytes. Ces médiateurs agissent au niveau des thrombocytes via des récepteurs couplés aux protéines G hétérotrimériques ou RCPG. Les protéines G sont constituées de trois sous unités $G\alpha$, $G\beta$ et $G\gamma$. Les différentes sous unités $G\alpha$ exprimées par les thrombocytes sont $G\alpha_s$, q , $12/13$, z et $i2/3$ (Wettschureck and Offermanns, 2005).

3.2.2. Les récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK) :

Les récepteurs à activité tyrosine kinase provoquent une fois activés, une cascade de phosphorylation sur des résidus tyrosines. Soit le récepteur possède cette activité intrinsèque c'est le cas par exemple du récepteur de la thrombopoïétine (C-MPL), soit le

récepteur est associé à des tyrosines kinases comme la GPVI- FcR γ et le complexe Ib-V-IX.

Le dimère de FcR γ contient deux sites ITAM « Immunoreceptor tyrosine-based activatory motifs ». La phosphorylation de ces motifs induit une cascade de signalisation faisant intervenir des tyrosines kinases Syk et des protéines adaptatrices membranaires LAT « Linker for Activation of T-cells ». Enfin, ce complexe permet la phosphorylation et l'activation de la phospholipase C γ 2. De plus la protéine LAT est associée à la PI3-kinase qui génère notamment le substrat de la PLC γ . Les domaines ITAM peuvent subir une régulation via des protéines transmembranaires contenant des domaines ITIM « Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs ». Parmi ces protéines PECAM-1 serait un inhibiteur de la signalisation impliquant GPVI-FcR γ (Watson *et al.*, 2001). La signalisation induite par la GPIb-V-IX suit les mêmes voies.

3.2.3. Les récepteurs de type intégrine :

Les intégrines appartiennent à une famille de récepteurs hétérodimériques transmembranaires dont l'expression est ubiquitaire. Les intégrines thrombocytaires sont constituées de la sous unité β 1 ou β 3 avec une sous unité α . On peut identifier l' α 2 β 1 (récepteur du collagène), l' α 5 β 1 (récepteur du fibronectine (Fn)), l' α 6 β 1 (récepteur du laminine), l' α I**b β 3 (récepteur de la Fg, vWF...) et l' α v β 3 (récepteur de la vitronectine) (Nieswandt *et al.*, 2009). En quantité abondante au niveau de la membrane thrombocytaire, l'intégrine α I**b β 3, une fois activée, joue un rôle indispensable à l'homéostasie et lors de l'adhésion des thrombocytes à la matrice extracellulaire.****

Après activation thrombocytaire des récepteurs (RTK ou RCPG) par leurs ligands solubles respectifs, on observe un ensemble de signalisations intracellulaires conduisant à l'activation – dans un second temps - des intégrines, et notamment l' α I**b β 3 caractérisant la voie « inside-out » (Figure 11A) (Cifuni *et al.*, 2008; Jackson and Schoenwaelder, 2010). Cette activation entraîne un changement de conformation des récepteurs membranaires qui favorise leur affinité avec les ligands (le Fg et le vWF) et déclenche une signalisation « outside-in » (Figure 11B), responsable de la deuxième vague d'activation thrombocytaire de manière irréversible (Shattil and Newman, 2004) et notamment la libération du contenu des granules dont la plupart réagissent comme des médiateurs de « feedback positive » pour amplifier les réponses thrombocytaires.**

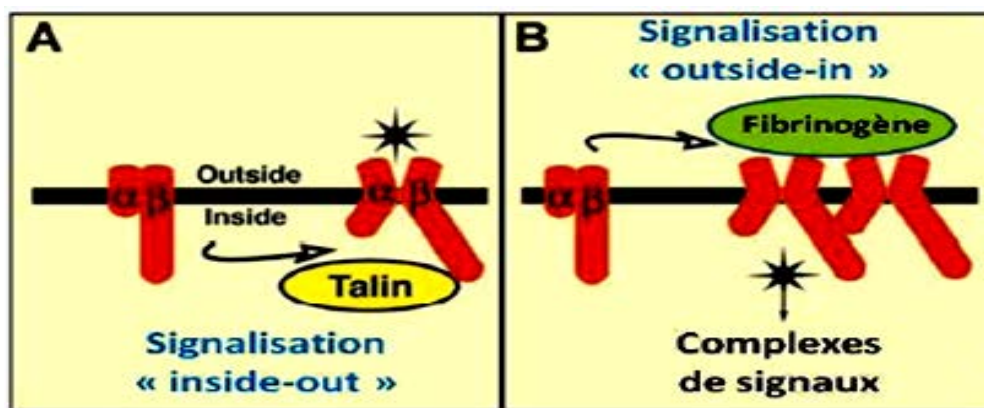


Figure 11 : Signalisation de l'intégrine GPIIb/IIIa (Shattil and Newman, 2004).

4. Les maladies liées aux thrombocytes:

Les maladies liées aux plaquettes se manifestent cliniquement par des troubles de la coagulation. Ces troubles peuvent aussi bien se traduire par une thrombocytopenie (numération thrombocytaire basse) ou plus rarement par thrombocytose (numération thrombocytaire haute). Ces maladies peuvent être de nature héréditaire ou immune (Trevisan, 2011).

- a. **Les maladies de nature héréditaire**, dues au mauvais fonctionnement des plaquettes, sont extrêmement rares (comme les thrombasthénies de Glanzmann liée à l'absence de complexe GP IIb/IIIa sur les membranes thrombocytaires ou la maladie de Bernard Soulier liée au complexe IbIX-V) La plus répandue est la maladie de von Willbrand, touchant le facteur de coagulation du même nom, qui est présente dans 1% de la population mondiale. Les maladies de nature immune sont beaucoup plus répandues et sont le plus souvent de type allo-immunes.
- b. **Les maladies allo-immunes** qui ont les répercussions cliniques les plus graves sont : la thrombocytopenie néonatale allo-immunes, l'état réfractaire aux transfusions thrombocytaires et le purpura post transfusionnel (Trevisan, 2011).

Chapitre II

1. Thrombopathies constitutionnelles :

Les thrombopathies constitutionnelles sont des pathologies liées à une ou plusieurs anomalie (s) fonctionnelle (s) des thrombocytes sanguins qui jouent un rôle primordial dans l'hémostase. Leur participation requiert l'intégralité de leurs diverses fonctions (**Kouakou, 2009**).

Les thrombopathies constitutionnelles ou héréditaires sont des affections rares. Elles sont ; soit isolées, soit associées à d'autres anomalies héréditaires. Elles peuvent être quantitatives ou qualitatives, voir pour certaines les deux à la fois. Leur connaissance, chaque jour affinée, en particulier, grâce à la biologie moléculaire, a permis toutefois de formidables progrès dans la compréhension de la physiologie plaquettaire.

Ainsi, ces anomalies fonctionnelles thrombocytaires peuvent être classées selon le type de réponse plaquettaire qui se trouve anormale (adhésion, activation, sécrétion, agrégation, fonction procoagulante). En fait, ces étapes sont intimement intriquées et une telle distinction des dysfonctions plaquettaires reste souvent problématique. Aussi, elles peuvent être répertoriées en se basant sur les divers éléments constituant les thrombocytes (**Elalamy, 2006**). Mais, pour une classification optimale, il est judicieux d'associer les deux types comme l'ont fait certains auteurs (**Franchini, 2008; Salles et al., 2008**).

1.1. Classification des thrombopathies constitutionnelles :

Tableau 3 : Principaux types de thrombopathies constitutionnelles (**Ramasamy, 2004**)

Anomalies de l'adhésion (GPIIb-IX-V)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Maladie de Bernard et Soulier ▪ Pseudo-Willebrand plaquettaire
Anomalies de l'agrégation Primaire (GPIIb-IIIa)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Thrombasthénie de Glanzmann
Anomalies des récepteurs d'agonistes solubles	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Récepteurs du thromboxane (Tx) A2 ▪ Récepteurs de l'acide adénosine ADP
Anomalies de la signalisation cellulaire	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Déficit en cyclo-oxygénase ▪ Déficit en thromboxane synthétase ▪ Défaut de la mobilisation calcique ▪ Défaut de synthèse des phosphatidylinositols ▪ Anomalies du système des protéines G
Anomalies de la sécrétion granulaire	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Pool vide delta ▪ Pool vide alpha ou syndrome des thrombocytes gris ▪ Facteur V Québec
Anomalies de la fonction procoagulante thrombocytaire	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Syndrome de Scott ▪ Syndrome de Stormorken

2. Syndrome de Bernard-Soulier :

2.1. Présentation clinique :

Le syndrome de Bernard Soulier (BSS) est une thrombopathie hémorragique liée à un déficit génétique, quantitatif ou qualitatif, en glycoprotéine GPIb-V- IX. Elle se transmet selon le mode autosomique récessif (**Hadj Kacem et al., 2010**).

Ce syndrome est une pathologie très rare décrite pour la première fois en 1948 par Jean Bernard et Jean-Pierre Soulier (**Payraastre et al., 2014**). Il a été une des premières formes de thrombopénies décrite. Il fait partie des formes non syndromiques de thrombopénie constitutionnelle même si la symptomatologie hémorragique est très importante. En effet, nous verrons qu'une thrombopathie s'associe à la macrothrombopénie observée (**Strassel et al., 2009**).

Le BSS est présent dans 1 cas pour 10^6 naissances (**Lanza, 2006**), et moins de 100 cas ont été ainsi rapportés dans la littérature principalement dans les populations du Japon, d'Europe et d'Amérique du nord (**Elalamy, 2006**). De transmission autosomique récessive, seuls les individus homozygotes ou hétérozygotes composites présentent un syndrome hémorragique sévère. Il se manifeste rapidement après la naissance chez le nouveau-né (saignement au niveau du cordon, pétéchies) (**Elalamy, 2006**) et dans la jeune enfance par un purpura, une épistaxis, des saignements gingivaux ou encore des ménorragies chez l'adulte. Les saignements gastro-intestinaux et l'hématurie sont plus rares. Les manifestations hémorragiques les plus graves surviennent surtout après un traumatisme ou un geste chirurgical (appendicectomie, extraction dentaire) (**Balduini and Savoia, 2012**). La sévérité et la fréquence des saignements diffèrent d'un patient à l'autre (**Hadj Kacem et al., 2010**).

2.2. Présentation biologique

Sur le plan biologique, le BSS se présente par une thrombopénie d'intensité variable (20 - 150 G/L), elle se caractérise par une absence d'adhésion des thrombocytes au sous-endothélium vasculaire, avec un contingent de thrombocytes géantes aisément reconnaissables sur le frottis sanguin (**Gohda et al., 2007**), avec un temps de saignement allongé pouvant dépasser 20 min (**Hadj Kacem et al., 2010**).

Alors le frottis sanguin permet d'apprécier une des caractéristiques du BSS à savoir une dystrophie thrombocytaire avec présence de thrombocytes géantes (**figure 12**). En

microscopie électronique, certains auteurs rapportent également la présence de vacuoles cytoplasmique au niveau plaquettaire (**Doucet, 2016**).

L'étude de l'agrégation thrombocytaire montrée que la population de thrombocytes géants s'expliquerait par un défaut de maturation des mégacaryocytes mais aussi par l'altération des interactions entre la membrane et le cytosquelette thrombocytaire.

En microscopie électronique, les thrombocytes se caractérisent par de nombreuses vacuoles cytoplasmiques également retrouvées dans les mégacaryocytes. Elle révèle également des anomalies du système de démarcation mégacaryocytaire. Une thrombopathie est associée au BSS, mise en évidence par un défaut d'agglutination à la ristocétine qui se traduit par une diathèse hémorragique sévère (**Doucet, 2016**). La réponse à la thrombine est également diminuée alors que celles à l'ADP et au collagène restent normales. (**Poinsard, 2012**)

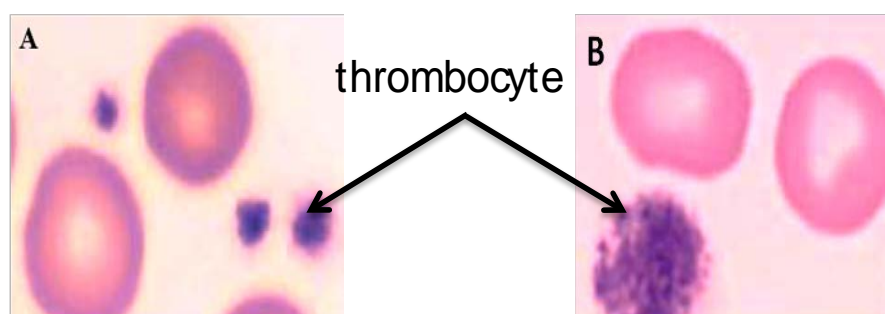


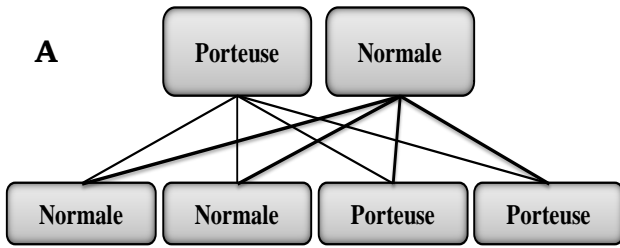
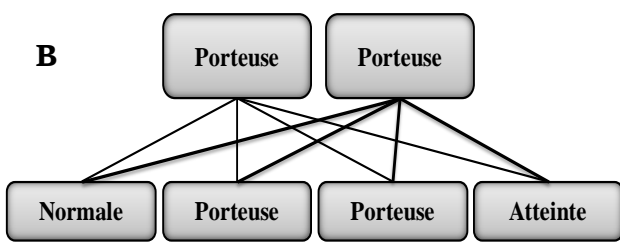
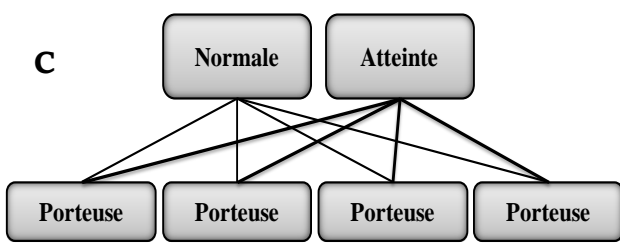
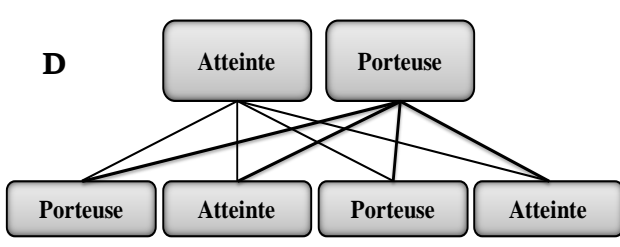
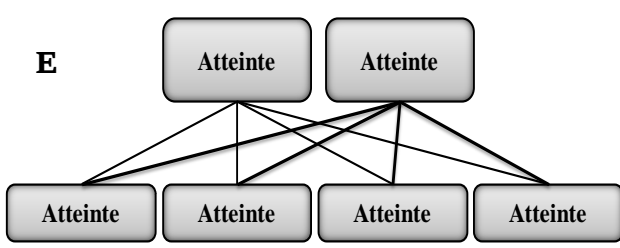
Figure 12 : Frottis sanguin montrant un thrombocyte (A) normal, et (B) géant (**Latger, 2011**)

2.3. Mode de transmission de la maladie :

Le syndrome de Bernard-Soulier est un syndrome autosomique récessif, ce qui veut dire que les deux parents doivent être porteurs de la modification génétique (même si habituellement ils ne sont pas eux-mêmes atteints de la maladie) et la transmettre à leur enfant.

Comme toutes les anomalies qui se transmettent de cette façon, ce syndrome est plus répandu dans les régions du monde où le mariage entre proches parents est commun (mariage consanguin). Le syndrome de Bernard-Soulier affecte autant les hommes que les femmes (**FMH, 2012**) (**tableau 4**).

Tableau 4 : Le mode de transmission de la maladie de syndrome de Bernard-Soulier
(SCH, 2008) (modifier).

<p>A- montre ce qui peut survenir lorsqu'une personne porteuse du gène du BSS a un enfant avec une personne qui ne l'est pas. Il y a une chance sur deux que l'enfant soit porteur.</p>	<p>A</p>  <pre> graph TD P1[Porteuse] --- C1[Normale] P1 --- C2[Porteuse] N1[Normale] --- C3[Porteuse] N1 --- C4[Porteuse] </pre>
<p>B- montre ce qui peut se passer lorsque deux personnes porteuses du gène du BSS ont un enfant. Il y a une chance sur quatre que l'enfant soit atteint du BSS, une chance sur deux qu'il soit porteur et une chance sur quatre qu'il soit normal.</p>	<p>B</p>  <pre> graph TD P1[Porteuse] --- C1[Normale] P1 --- C2[Porteuse] P2[Porteuse] --- C3[Porteuse] P2 --- C4[Atteinte] </pre>
<p>C- montre ce qui peut arriver lorsqu'une personne atteinte du BSS a des enfants avec une personne normale. Tous les enfants seront porteurs, mais aucun d'entre eux ne sera atteint de la maladie.</p>	<p>C</p>  <pre> graph TD N1[Normale] --- C1[Porteuse] N1 --- C2[Porteuse] A1[Atteinte] --- C3[Porteuse] A1 --- C4[Porteuse] </pre>
<p>D- montre ce qui peut se produire lorsqu'une personne atteinte du BSS a un enfant avec une personne porteuse. Il y a une chance sur deux que l'enfant soit porteur. Il y a aussi une chance sur deux que l'enfant soit atteint du BSS.</p>	<p>D</p>  <pre> graph TD A1[Atteinte] --- C1[Porteuse] A1 --- C2[Atteinte] P1[Porteuse] --- C3[Porteuse] P1 --- C4[Atteinte] </pre>
<p>E- montre ce qui se produit lorsque deux personnes atteintes du BSS ont des enfants. En pareil cas, tous les enfants en seront atteints.</p>	<p>E</p>  <pre> graph TD A1[Atteinte] --- C1[Atteinte] A1 --- C2[Atteinte] A2[Atteinte] --- C3[Atteinte] A2 --- C4[Atteinte] </pre>

2.4. Présentation génétique :

Sur le plan moléculaire, les défauts génétiques responsables du BSS ont été localisés sur les gènes des GPIb α , GPIb β et GPIX situés, respectivement, sur les chromosomes 17 (17p12), 22 (22q11) et 3 (3q21) (**Hadj Kacem et al., 2010**). Il y a des mutations sur ces gènes empêchent la formation du complexe GPIb-V-IX lors de son assemblage dans le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi. Plusieurs mutations ont été décrites pour GPIb α , GPIb β et GPIX comprenant des mutations de type faux-sens, non-sens, décalant le cadre de lecture ou stop. Dans la majorité des cas, GPIb n'est plus exprimée à la surface des thrombocytes mais dans de rares cas elle peut être exprimée sous une forme non fonctionnelle. Classiquement, ces défauts, transmis sur un mode autosomique récessif (**Payraastre et al., 2014**), avec souvent une notion de consanguinité (**Hadj Kacem et al., 2010**), sont uniques pour un individu donné ou une famille. Il existe également des formes de SBS de transmission autosomique dominante (formes dites monoalléliques) dans lesquelles la thrombopénie et les manifestations hémorragiques sont modérées ou absentes (**Balduini and Savoia, 2012**). Le BSS résulte d'un déficit quantitatif ou qualitatif du complexe glycoprotéique thrombocytaire GPIb-IX-V assurant la liaison avec le vWF. Plus de 50 mutations impliquant les gènes codant pour GPIb α , GPIb β ou GPIX ont été identifiés (**figure 13**) (**Savoia et al., 2011**).

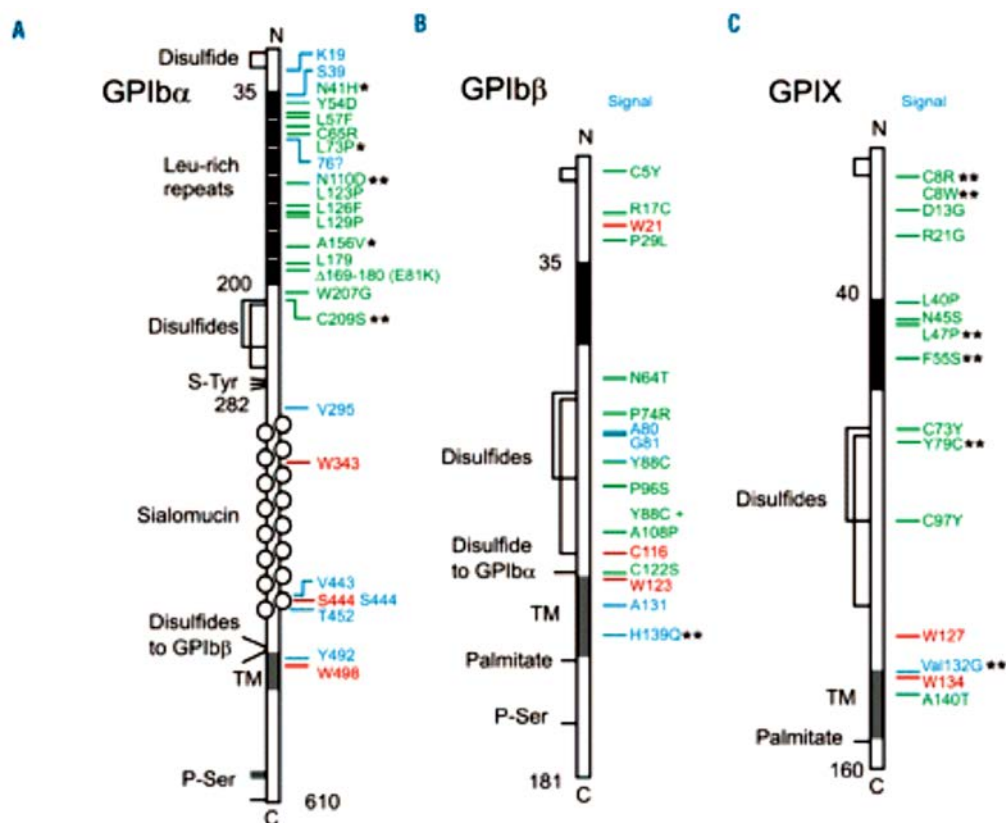


Figure 13 : Mutations de GPIb α (A), GPIb β (B) et GPIX (C) associées au syndrome de Bernard-Soulier de type faux-sens (vert), non-sens (rouge) ou à l'origine d'un codon stop (bleu) (**Poinsard, 2012**)

3. Gènes, biosynthèse et expression du complexe GPIb-V-IX :

Chaque sous-unité est codée par un gène distinct. Le gène codant pour la GPIb α est localisé sur le bras court du chromosome 17, le gène de la GPIb β sur le bras long du chromosome 22 et les gènes de la GPIX et de la GPV sur le bras long du chromosome 3. La séquence codante des sous-unités GPIb α , GPIX et GPV est contenue dans un seul exon, alors que celle de la GPIb β est contenue dans deux exons. Les promoteurs de ces quatre gènes présentent des similitudes. Ils contiennent des sites de reconnaissance pour les facteurs de transcription GATA et ETS qui sont retrouvés dans d'autres gènes exprimés dans les lignées mégacaryocytaire et érythroïde. La grande majorité des études a montré que le complexe GPIb-V-IX ne s'exprime que dans le mégacaryocyte et le thrombocyte. Toutefois, certains ont montré une expression dans la cellule endothéliale, notamment dans des conditions d'inflammation (**David, 2006**).

Des cellules transmises par différentes combinaisons des sous-unités du complexe ont démontré la nécessité de GPIb α , GPIb β et GPIX pour une expression optimale à la surface des cellules. Ceci est confirmé par l'étude de patients Bernard-Soulier qui montrent

qu'un défaut d'une des trois sous-unités entraîne une diminution sévère de l'expression du complexe dans le thrombocyte. La GPIIb/IIIa semble jouer un rôle central, par sa capacité à interagir et à stabiliser ses deux partenaires (David, 2006).

L'importance des domaines transmembranaires de la GPIIb/IIIa et de la GPIIb/IIIa pour une bonne expression du complexe (Mo et al., 2006). Une biosynthèse efficace du complexe GPIIb/IIIa a lieu en l'absence de GPV (Kahn et al., 1999). A l'inverse, l'expression de la GPV à la surface de la cellule nécessite la présence des trois sous-unités (Strassel et al., 2004).

Le complexe est assemblé dès le compartiment du réticulum endoplasmique où débute le processus de N-glycosylation. Puis, lors du transit au travers des compartiments du Golgi d'autres modifications post-traductionnelles ont lieu telles que les O-glycosylations, la sulfatation des tyrosines, la palmitoylation ou la myristoylation des cystéines (Ulsemer et al., 2001).

4. La physiopathologie:

4.1. Chez la femme :

4.1.1. La ménorragie :

La ménorragie est un important problème de saignement chez les femmes après la puberté. L'emploi de contraceptifs oraux peut permettre de régulariser le cycle menstruel et de prévenir les règles abondantes. On peut également administrer un anti fibrinolytique sous forme de comprimés d'acide tranéxamique pour ralentir le processus de désintégration des caillots de sang. Les hémorragies peuvent être particulièrement graves lorsqu'une adolescente a ses premières règles. (SCH, 2008)

4.1.2. Le saignement durant la grossesse et l'accouchement :

Les femmes enceintes qui sont atteintes du syndrome de Bernard-Soulier devraient être suivies par l'équipe d'un centre de traitement des troubles de la coagulation. Bien que l'anesthésie épidurale soit chose courante lors d'un accouchement, elle comporte certains risques pour les femmes atteintes de cette maladie. (SCH, 2008)

Les deux complications majeures pendant la grossesse sont :

Les hémorragies maternelles à l'accouchement et surtout dans le post-partum avec une période à risque de 6 semaines. Les transfusions de concentrés plaquettaires à titre prophylactique ne sont pas systématiques et sont réservées en cas d'urgence hémorragique

ou avant une césarienne. Une délivrance artificielle avec révision utérine est systématique. Les agents ocytotique sont les traitements de première intention dans le post-partum immédiat. Les anti-fibrinolytiques et la desmopressine peuvent être essayés. Les contraceptifs oraux peuvent ensuite être une alternative ;

La thrombopénie fœtale par allo-immunisation fœto-maternelle antiplaquettaire avec un risque d'hémorragie, notamment intracrânienne, et de mort fœtale in utéro ou à l'accouchement. Le dépistage d'anticorps antiplaquettaire (anti-HLA, anti-glycoprotéine Ib-V- IX) doit être systématique durant toute la grossesse. La prise en charge thérapeutique pendant la grossesse n'est pas bien établie : immunoglobulines intraveineuses plus ou moins corticostéroïdes (**Berrébi, 2008**).

4.1.3. les nouveau-nés :

Le syndrome de Bernard-Soulier est souvent diagnostiqué lorsqu'on observe un saignement inhabituel chez un nouveau-né ou un tout-petit. Il suffit alors de procéder à des analyses sanguines en laboratoire pour confirmer le diagnostic. Alors cette maladie hémorragique héréditaire se manifeste rapidement après la naissance chez le nouveau-né et caractérisé par un saignement au niveau du cordon et par la pétéchie (**Elalamy, 2006**)

Chez le nouveau-né, il est souvent plus difficile d'affirmer l'existence d'un trouble de la sécrétion. Dans certains cas, il faut évoquer une thrombopathie aiguë chez un enfant dont la mère a pris de l'aspirine dans les 10 jours qui précèdent la naissance (**Labrune, 2004**), la drogue s'accumulant dans le foie et le rein du fœtus avec une élimination très réduite

5. Diagnostic biologique :

L'exploration biologique d'un syndrome hémorragique est donc orientée par les données de l'interrogatoire et de l'examen clinique.

Un bilan initial d'hémostase comprend:

- Numération plaquettaire, dans le cadre d'un hémogramme, permet de détecter une éventuelle thrombopénie associée ou des anomalies morphologiques plaquettaires lors de l'examen morphologique du frottis sanguin.
- Rétraction du caillot
- Temps de Quick et temps de céphaline/activateur.
- Temps de saignement (TS).

Selon les résultats obtenus à ces différents tests, on pourra alors associer des tests plus spécifiques :

- Le temps d'occlusion au PFA-100 TM est déterminé en sang total citraté dans des conditions de flux par la mesure du temps d'occlusion de l'orifice d'une membrane de nitrocellulose recouverte d'activateurs plaquettaires.
- L'agrégation plaquettaire et/ou la bioluminescence permet l'étude des fonctions plaquettaires (adhésion, agrégation, sécrétion).
- La cytométrie en flux étudie l'exploration des glycoprotéines plaquettaires en évaluant spécifiquement le nombre de récepteurs glycoprotéiques présents à la surface membranaire ou induits en réponse à un agoniste donné en dressant le phénotype membranaire.
- La microscopie électronique des plaquettes permet la recherche de modifications morphologiques ou architecturales particulières qui peuvent orienter ou aider à établir le diagnostic. La microscopie électronique met en évidence les altérations ultra-structurales qui seraient à l'origine de l'altération fonctionnelle, soulignant le lien intime qui existe entre la structure et l'activité d'une plaquette sanguine. L'extraordinaire complexité de la membrane plasmique, du cytosquelette, des organelles intracellulaires, de la machinerie enzymatique et des étapes métaboliques à l'origine de la réponse plaquettaire rend compte de la difficulté du diagnostic et des innombrables mécanismes potentiellement responsables de l'atteinte fonctionnelle plaquettaire.
- Etude moléculaire des protéines de membrane (**Elalamy, 2006**).

6. Prise en charge thérapeutique :

Les patients avec des thrombopathies constitutionnelles peuvent avoir un saignement significatif. Les troubles les plus sévères (BSS, CAMT et WAS) peuvent être associés à une hémorragie mortelle (**Michele P. Lambert, 2011**).

Le but de la prise en charge thérapeutique de ces pathologies plaquettaires est double : mettre en place des mesures prophylactiques pour prévenir toute hémorragie et stopper tout saignement par des mesures à visée curative pour rétablir une hémostase suffisante (**Elalamy, 2006**).

Les patients devraient être préparés pour les procédures chirurgicales et invasives avec des transfusions de plaquettes, de la desmopressine ou des antifibrinolytiques, selon la tendance de saignement de l'individu (**Carlo et al., 2002**).

6.1. Mesures préventives :

Ces mesures consistent à éviter tout comportement majorant le risque hémorragique comme la pratique de sports violents, la manipulation d'objets contondants, les injections intramusculaires et tout traitement interférant avec les fonctions plaquettaires (anti-agrégants plaquettaires, anti-inflammatoires) sont contre-indiqués.

La prévention des saignements gingivaux repose sur un suivi dentaire régulier et une bonne hygiène buccale. La contraception hormonale peut diminuer les ménorragies chez les femmes avec des troubles plaquettaires (**Chi et al., 2010**).

La gestion de manifestations hémorragiques superficielles, et notamment en cas d'épistaxis, repose, en premier lieu, sur des mesures locales par compression directe à l'aide d'une compresse voire une compresse hémostatique en cas d'échec.

L'efficacité de ces mesures nécessite, en effet, une véritable éducation du patient, de son entourage et du personnel médical soignant.

6.2. Transfusion de plaquettes :

Les transfusions de plaquettes prophylactiques pourrait sembler la mesure la plus appropriée pour la prévention des hémorragies dans les thrombopénies constitutionnelles.

Elle est indiquée en cas d'hémorragie sévère, en per-partum pour les césariennes programmées et dans des chirurgies à haut risque hémorragique. Ces transfusions doivent rester limitées afin de prévenir une allo-immunisation anti-HLA et donc la survenue d'un état réfractaire aux transfusions. Cette iso-immunisation rend les transfusions de plaquettes inefficaces (**Elalamy, 2006**)

A noter qu'aucune étude n'a été réalisée dans le cadre de thrombopathies constitutionnelles, mais le taux d'allo-immunisation devrait être plus élevé parce que ces patients, à la différence de ceux avec une leucémie ou un lymphome, ne reçoivent pas des traitements immunosuppresseurs.

Le risque d'allo-immunisation est encore plus élevé chez les sujets avec BSS homozygote avec absence du complexe GPIb-IX-V parce qu'ils reconnaissent ces protéines sur les plaquettes transfusées comme étrangères. Sur cette base, les patients atteints de thrombopénies devrait recevoir des transfusions de plaquettes seulement pour traiter une hémorragie active qui ne peut être gérée par ailleurs et comme prophylaxie avant une intervention chirurgicale ou d'autres contraintes hémostatiques. Lorsque disponibles, les

plaquettes de donneurs HLA compatibles doivent être utilisées pour prévenir ou surmonter l'allo-immunisation (**Carlo et al., 2002**).

6.3. Antifibrinolytiques :

L'utilisation d'acide aminocaproic ou l'acide tranexamique dans le cas de saignement cutanéomuqueux, de ménorragies, ou de saignement gastrointestinal a été rapportée chez de nombreux patients avec à la fois une thrombopénie et un dysfonctionnement plaquettaire génétique (**Bolton et al. 2006**).

Ces médicaments peuvent diminuer le besoin de transfusions plaquettaires de routine et devraient être utilisés tôt au début des épisodes hémorragiques.

Chapitre III

Matériels et Méthodes

1. Problématique :

Le syndrome de Bernard Soulier (SBS) est une thrombopathie hémorragique liée à un déficit génétique en glycoprotéine thrombocytaire GPIb-V-IX et elle se transmet selon le mode autosomique récessif.

Ce syndrome est une pathologie très rare mais il entraîne un risque élevé chez les patients peut conduire la mort surtout lorsqu'ils ont un petit saignement qui peut devenir une hémorragie très grave à cause des thrombocytes non fonctionnelles.

Dans l'espoir de prévenir ce risque un suivi adéquat des paramètres hématologique est nécessaire, qui est représenté par la détermination des apports quantitatifs des cellules sanguines et l'étude de la morphologie de ces cellules surtout les thrombocytes, aussi la quantification des glycoprotéines plaquettaires pour repérer les cellules anormales et déterminer les caractéristiques phénotypique.

2. Objectif de l'étude :

L'objet visé dans le cadre de cette étude expérimentale, est de vérifier le risque du syndrome de Bernard Soulier chez les sujets malades par la réalisation des principales techniques d'analyse adoptées à cette maladie et pour cela les examens sont:

- ✓ L'hémogramme pour donner des apports quantitatifs sur les cellules sanguines ;
- ✓ Le frottis sanguin qui détermine la morphologie de ces cellules sanguines ;
- ✓ La réalisation de l'immunophénotypage en cytométrie en flux pour la quantification des glycoprotéines thrombocytaire responsable à cette maladie tel que le GPIb α , GPIb β , GPIX et GPV.
- ✓ Vérifier les glycoprotéines plaquettaires responsables a cette maladie.

3. Lieu et population d'études :

Ce travail expérimental à été réalisé au niveau du laboratoire d'analyse de l'hôpital d'Ain Tedles (Mostaganem) pendant une durée de 2 mois et le service d'hématologie et de thérapie cellulaire dans l'unité d'allogreffe de moelle osseuse au niveau de l'EHU 1^{er} novembre d'Oran pendant 2 semaines.

Cette expérimentation est portée sur un échantillon représentatif de 2 malades présentes le syndrome de Bernard Soulier : un garçon de 10 ans et une fille de 15ans comparés aux témoins normaux.

4. Matériels et produits utilisés :

4.1. Matériels utilisés :

Tube citraté; Tube à EDTA ; Tube secs ; Pipettes ; Capillaire à micro-hématocrite ; Lame à microscope identifié ; Microscope photonique OLYMPUS CH30 (**Annexe 1**); Centrifugeuse MIKRO 220A (**Annexe 2**); Coulter BECKMAN COULTER (**Annexe 3**) ; Incubateur MEMERT (**Annexe 4**); Cytomètre BD FACSCanto™ II (**Annexe 5**); Logiciel de FCS Express.

4.2. Produits utilisés :

May Grunwald (MG) (éosine – bleu de méthylène) (**Annexe 6**); Colorant Giemsa (éosine – azur de méthylène) (**Annexe 6**); L'huile d'émersion; PBS Phosphate Buffer Saline; Anticorps CD61 (**Annexe 7**); Anticorps CD41a (**Annexe 7**); Anticorps CD42b ;

5. Méthodologie de travail :

5.1. L'hémogramme ou Numération Formule Sanguine (NFS) :

L'hémogramme est un examen biologique utilisé pour dépister, explorer et suivre la plupart des pathologies hématologiques. C'est un examen automatisé correspond à l'étude quantitative et qualitative du sang comprend parmi d'autres, les paramètres suivants :

- Numération des cellules sanguines ;
- Dosage de l'hémoglobine ;
- Mesure et calcul des constantes et indices érythrocytaires et plaquettaires ;
- Etablissement de la différentielle leucocytaire.

5.1.1. Méthode :

Il est réalisé à partir d'un échantillon de sang prélevé par ponction veineuse et recueilli dans un tube contenant un anticoagulant sec de type EDTA ; puis on le fait passer dans le Coulter qui mesure de façon électronique les différents composants du sang.

5.2. Frottis sanguin coloré au May-Grunwald-Giemsa:

Étaler une goutte de sang uniformément sur une lame de verre, de manière à obtenir une seule couche des cellules. Après la fixation par May-Grunwald pendant 5 min et la

coloration par Giemsa pendant 20 min, on pourra effectuer l'étude morphologique des éléments figurés du sang, et déterminer s'il y a anomalies de taille et de couleur des plaquettes par l'utilisation d'un microscope photonique (X100).

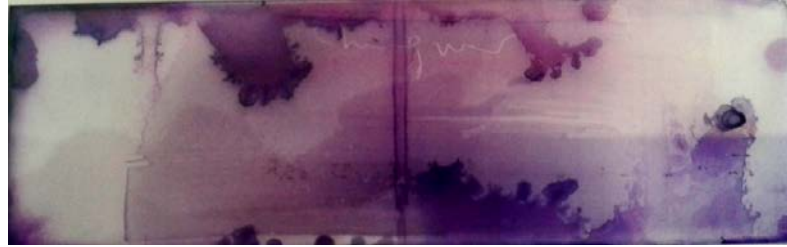


Figure : Un frottis sanguin après la coloration de May-Grunwald-Giemsa

5.3. L'immunophénotypage par la cytométrie en flux :

La cytométrie en flux (CMF) est la technique de choix pour la réalisation de l'immunophénotypage de la dystrophie thrombocytaire hémorragique. Grâce à l'utilisation d'un large panel d'anticorps monoclonaux, permet d'explorer les différentes fonctions liées à l'activation plaquettaire. Elle permet d'étudier les plaquettes dans des conditions dynamiques en déterminant leurs caractéristiques morphologiques à l'aide d'anticorps marqués par des fluorochromes dirigés spécifiquement contre des protéines plaquettaires d'origine membranaire et/ou granulaire. La CMF peut être réalisée en sang total, en PRP ou en plaquettes lavées

5.3.1. Les anticorps monoclonaux utilisés :

On a utilisé trois types des anticorps spécifique pour détecter les antigènes des glycoprotéines de la membrane plaquettaire qu'ils sont :

- CD61 : anticorps spécifique pour la glycoprotéine GPIIIa ;
- CD41a : anticorps spécifique pour la glycoprotéine GPIIb ;

Les glycoprotéines GPIIIa et GPIIb sont formés le complexe GPIIb-IIIa qui est le récepteur du fibrinogène.

- CD42b : anticorps spécifique pour le complexe GP Ib-IX-V et spécifiquement pour la sous-unité GPIb α .

5.3.2. Méthode :

Il est réalisé à partir d'un échantillon de sang prélevé par ponction veineuse et recueilli dans un tube citraté ; centrifugé les tubes à 1500 t/min pendant 10 min ; et à l'aide d'une micropipette prélever le plasma et le déposer dans un tube sec; puis faire passer le plasma au Coulter pour déterminer le nombre des plaquettes et si le nombre des plaquettes est supérieur à 25000/ mm³, il faut faire une dilution selon cette formule :

Après prendre 3 tubes sec et à l'aide d'une micropipette ajouter 20 µl de CD61 dans le 1^{er} tube et 20 µl de CD41a dans le 2^{eme} tube et 20 µl de CD42b dans le 3^{eme} tube ; puis Ajouter 100 µl de la dilution et incuber à une température ambiante (20-22°C) pendant 15 min ; Après l'incubation ajouter 1000 µl de PBS pour le lavage et l'élimination des anticorps non conjugués; Faire la centrifugation des tubes à 1500 t/min pendant 5 min ; puis enlever le surnageant avec la pipette et ajouter 500 µl de la PBS ; enfin mettre en marche l'appareil de cymomètre, qui nous indiquera les résultats.

Résultats et discussion

1. Résultats et discussions:

Le syndrome de Bernard Soulier est une dystrophie thrombocytaire hémorragique liée à un déficit quantitatif et qualitatif des glycoprotéines plaquettaires, ce syndrome a des effets secondaires qui ne peuvent pas touchés les autres cellules sanguines. Ces effets peuvent être détectés par les analyses telles que L'hémogramme, Frottis sanguin et L'immunophénotypage.

1.1. L'hémogramme ou Numération Formule Sanguine (NFS) :

1.1.1. Évaluation des taux de thrombocytes, leucocytes et des érythrocytes:

À partir de l'utilisation de l'hémogramme pour la détermination des taux de thrombocytes, leucocytes et des érythrocytes des échantillons on a obtenue des valeurs différents (**figure 14 et 15**).

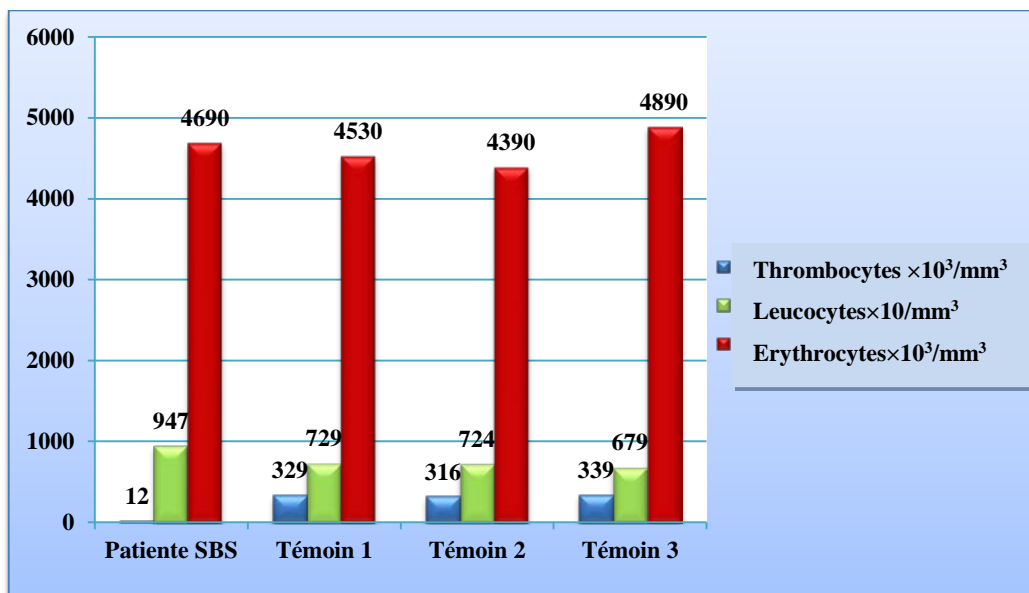


Figure 14 : évaluation des taux de thrombocytes, leucocytes et des érythrocytes chez les femmes.

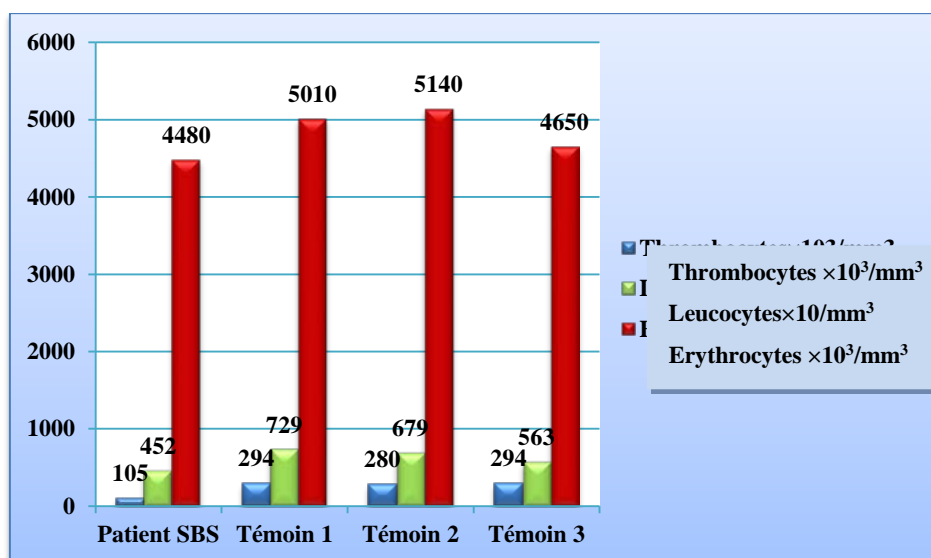


Figure 15: évaluation des taux de thrombocytes, leucocytes et des érythrocytes chez les hommes.

1.1.2. Évaluation des taux de l'hémoglobine:

Selon cette évaluation on a des résultats distincts des rapports d'hémoglobine chez les patients et les témoins de sexe féminin et masculin (**figure 16**).

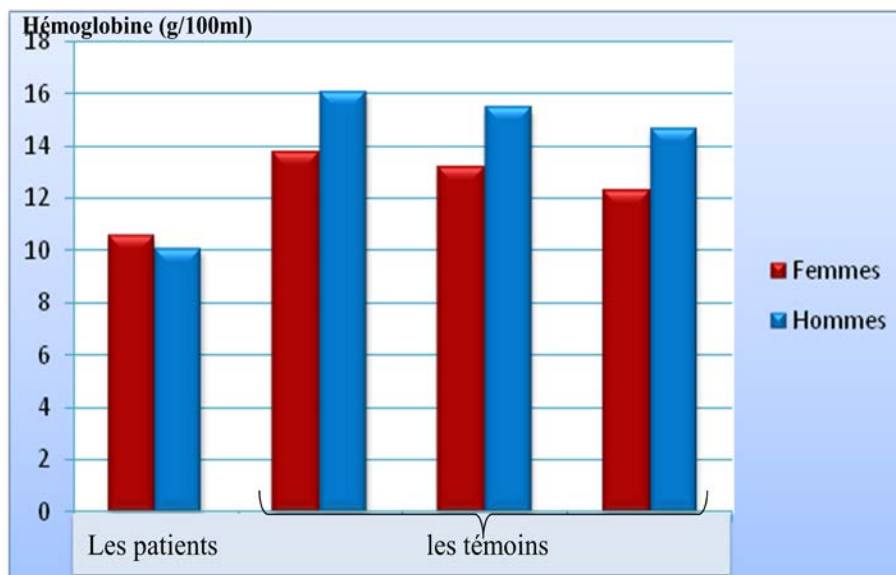


Figure 16 : évaluation des taux de l'hémoglobine chez les femmes et les hommes.

Après la comparaison entre les valeurs obtenus des témoins et des patients, j'ai remarqué un taux des leucocytes et des érythrocytes normal chez les patients malades et un taux de thrombocyte égale à $12 \times 10^3/\text{mm}^3$ chez la fille et $105 \times 10^3/\text{mm}^3$ chez le garçon

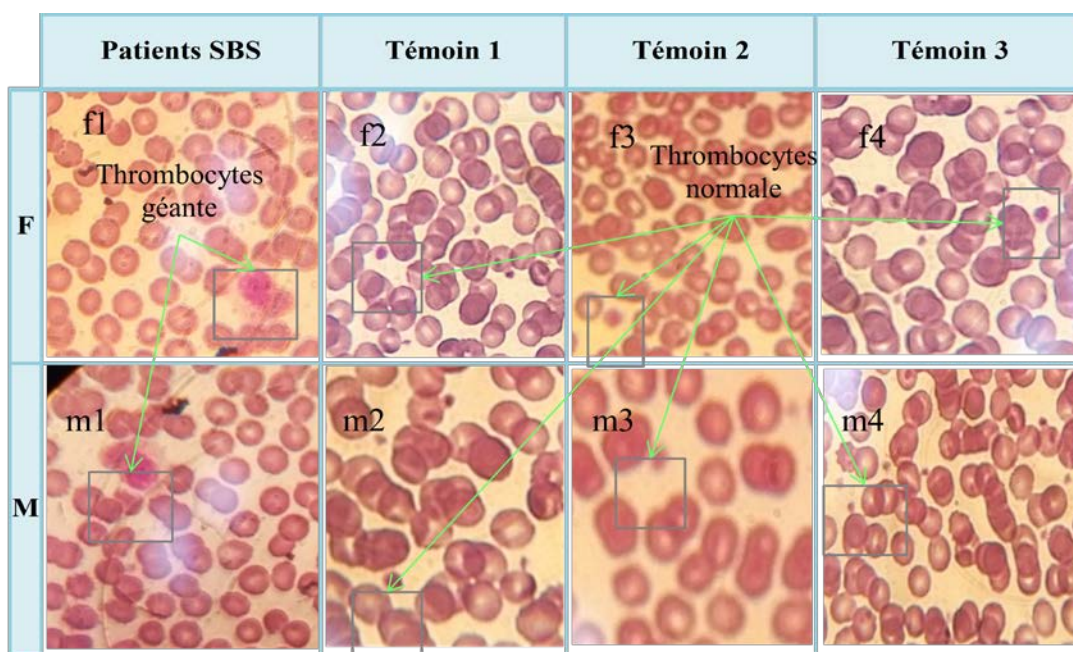
est inférieur aux normes ($150 \times 10^3/\text{mm}^3$ à $400 \times 10^3/\text{mm}^3$) (**Figure 14 et 15**); avec un taux d'hémoglobine inférieur aux normes (11.5 à 15 g/100ml pour les femmes et les enfants et 13 à 17 g/100ml pour les hommes), qui égale à 10.6 g/100ml pour la patiente et 10.1 g/100ml pour le patient (**figure 16**), pour les témoins j'ai noté des résultats normaux pour les taux des thrombocytes, leucocytes, érythrocytes et de l'hémoglobine.

Alors les patients présentent une thrombopénie avec une anémie peut être expliqué par les saignements de nez et de la gencive et les ménorragies provient chez les femmes réduisant le taux d'hémoglobine et des thrombocytes.

1.2.Frottis sanguin coloré au May-Grunwald-Giemsa:

D'après l'étude microscopique des éléments figurés du sang des différents échantillons on observe des thrombocytes morphologiquement différents (**Tableau 5**).

Tableau 5: résultats du frottis sanguin chez les femmes et les hommes.

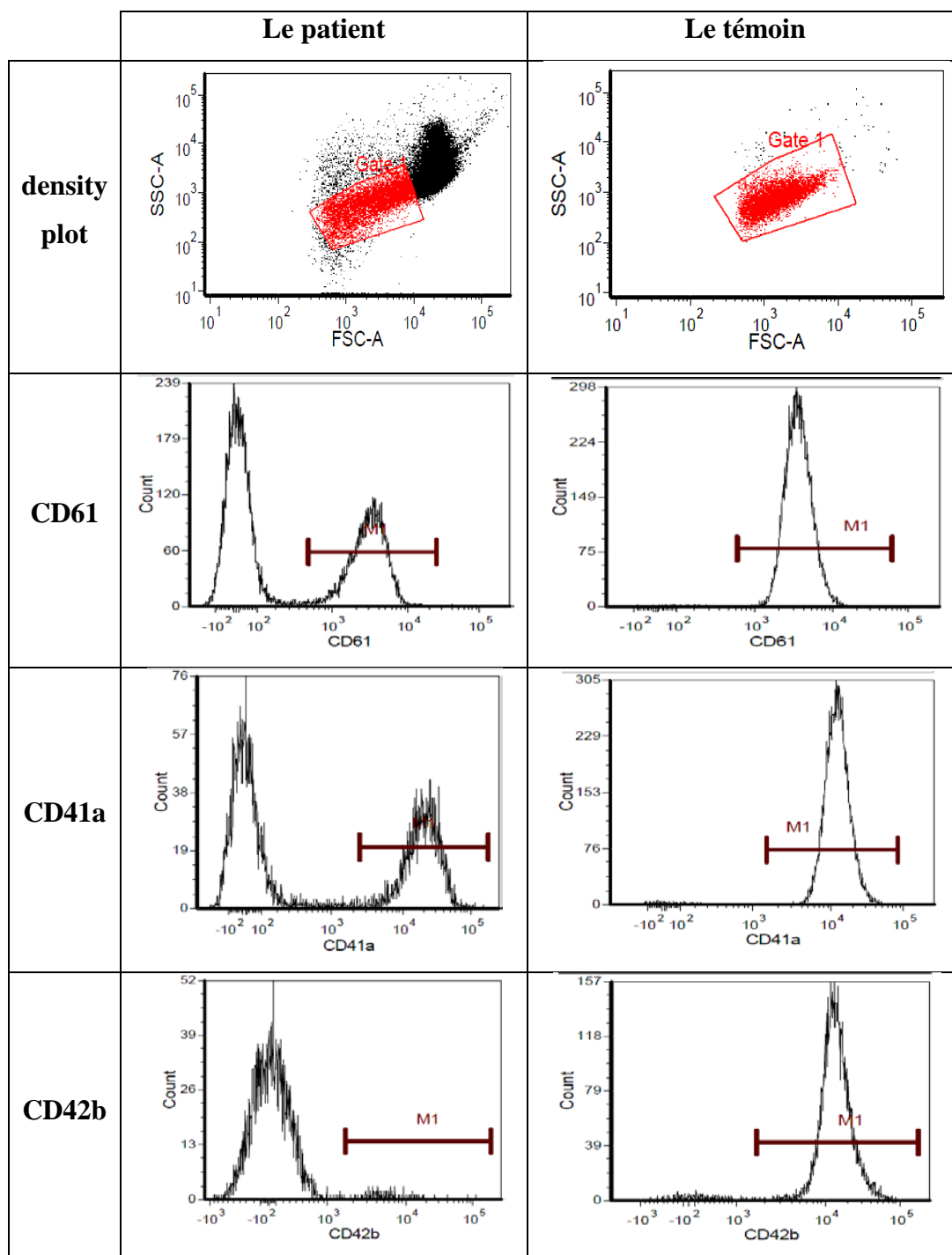


À partir des analyses de la morphologie plaquettaire effectuées par le microscope photonique (X 100) les deux patients présentent des thrombocytes géantes ou macrothrombocytes (taille $> 8 \mu\text{m}$) (**tableau 5** : f1 et m1) par rapport aux témoins qui ont des thrombocytes de tailles normales (entre 4 et $8 \mu\text{m}$) (**tableau 5** : f2, f3, f4, m1, m2 et m3), ces thrombocytes géantes due à des anomalies provient au cours de la formation des thrombocytes (mégacaryocyte).

1.3. L'immunophénotypage par la cytométrie en flux :

Les résultats sont représentés sous forme des histogrammes qui concerne l'intensité de la fluorescence émet par les anticorps au cours de la formation du complexe anticorps-antigène (le CD avec les antigènes des glycoprotéines de la membrane thrombocytaire) (**tableau 6**). Ces résultats graphiques obtenue par l'utilisation des représentations appelés « dot plot », « density plot » ou « contour plot » traité par le logiciel de FCS Express, et vont traduit sous forme des donnés par le médecin biologiste (**tableau 7 et 8**).

Tableau 6 : présentation des résultats de l'immunophénotypage.



1.3.1. Chez le sexe féminin :

Selon les résultats des taux des CD61, CD41a et CD42b chez le sexe féminin et le sexe masculin on estime des variations de taux de CD42b chez les deux groupes étudiés (tableau 7 et 8) (Figure 18 et 19)

Tableau 7: taux de CD61, CD41a et CD42b chez les femmes.

	Patiente SBS	Témoin 1	Témoin 2	Témoin 3
Âge (ans)	15	17	19	20
CD61	4844	1155	3150	1126
CD41a	15350	12598	10641	14473
CD42b	55	1184	1268	1147

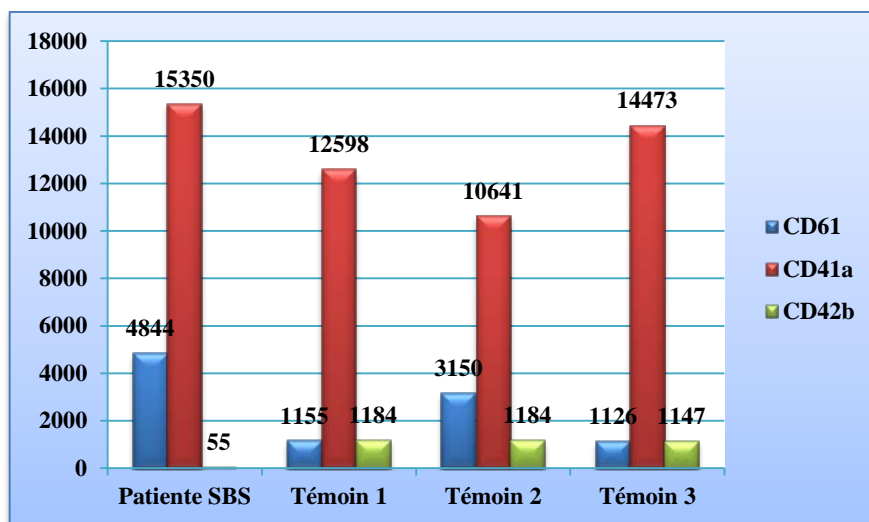


Figure 17: évaluation des taux de CD61, CD41a et CD42b chez les femmes.

1.3.2. Chez le sexe masculin:

Tableau 8: taux de CD61, CD41a et CD42b chez les hommes.

	Patient SBS	Témoin 1	Témoin 2	Témoin 3
Âge (ans)	10	12	14	15
CD61	1212	4167	2371	1241
CD41a	19335	12861	11842	13452
CD42b	34	1227	1314	1275

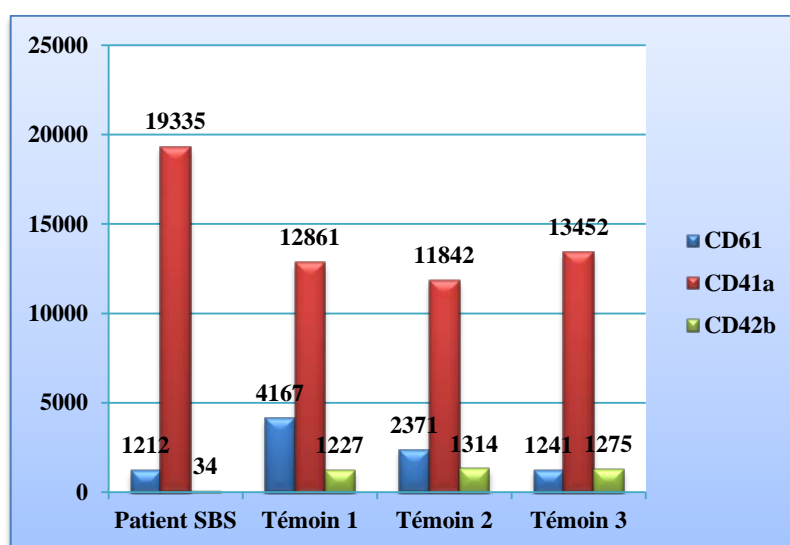


Figure 18: évaluation des taux de CD61, CD41a et CD42b chez les hommes.

Les résultats des tableaux et des histogrammes montrent des valeurs normales pour les taux de CD61 et CD41a (CD61 > 1000, CD41a > 1200), avec une différence significative pour le taux de CD42b, dont la patiente a un taux de CD42b égale à 55 et le patient avec un taux de CD42b égale à 34 ; en revanche les témoins ont un taux de CD42b égale aux normes usuelles (CD42b > 1100), ces résultats signifient que le syndrome de Bernard Soulier est causé par une mutation au niveau de la sous unité GPIb α qui est le premier responsable à la détermination de la liaison entre le complexe glycoprotéique GPIb-IX-V et le facteur de Von Willebrand.

2. La discussion générale :

En comparaison des résultats obtenus des témoins et des patients, on a constaté que:

A partir des résultats d’ NFS obtenus, les patients SBS présentent des résultats normaux pour les leucocytes et les hématies par contre ils ont un taux d’hémoglobine et de thrombocytes inférieur aux normes cela peut s’expliquer qui par une anémie consécutive de l’hémorragie due au syndrome de Bernard Soulier, avec une thrombopénie très grave chez les deux patients, cette diminution provient à cause des saignements sanguins du nez et de la gencive et au cours des blessures et par les ménorragies qui provient à l’âge de la puberté chez le sexe féminin.

Selon l’analyse de la morphologie plaquettaire on distingue que les deux patients possèdent des macrothrombocytes (taille $> 8 \mu\text{m}$) représentés dans les figures (f1 et m1) du tableau 5. Ces grosses plaquettes proviennent à cause des anomalies au cours de la formation des thrombocytes (mégacaryocyte).

Les valeurs obtenues de l’immunophénotypage montrent une diminution claire du taux de CD42b (anticorps spécifique de la sous unité GPIb α du complexe glycoprotéique GPIb-IX-V), cette diminution est causée par une mutation au niveau de cette sous unité qui provient du mariage consanguin des parents de ces patients.

Enfin, tous ces résultats montrent que ces patients présentent une thrombopathie constitutionnelle de type de syndrome de Bernard Soulier qui se caractérise par une macrothrombopénie avec une déficience qui touche la quantité de GPIb α qui est le premier responsable à la détermination de la liaison entre GPIb-IX-V et le facteur de Von Willebrand pour démarrer l’étape de l’adhésion plaquettaire.

Conclusion générale

Conclusion générale:

Ce travail avait pour objectif de vérifier le risque du syndrome de Bernard Soulier chez les patients par un suivi adéquat des paramètres hématologique représenté par le comptage des cellules sanguines et l'étude morphologique de ces cellules surtout les thrombocytes, aussi la quantification des glycoprotéines plaquettaires pour repérer les cellules anormales et déterminer les caractéristiques phénotypique.

A partir les résultats obtenus, on montrent que les patients présentent une syndrome de Bernard Soulier est caractérisée par une macrothrombopénie avec une défaillance qui touche la quantité de GPIb α qui est le premier responsable à la détermination de la liaison entre GPIb-IX-V et le facteur de Von Willebrand pour démarrer l'étape de l'adhésion plaquettaire.

Cette recherche permettra également, dans de futurs travaux, de compléter nos connaissances et de mieux appréhender le syndrome de Bernard Soulier. Ceci étant probablement une des raisons du récent intérêt porté à ces pathologies plaquettaires rares.

Références bibliographiques

Références bibliographiques:

A

Andrews, R. K., Gardiner, E. E., Shen, Y., Whisstock, J. C. and Berndt, M. C. (2003). Glycoprotein Ib-IX-V. *Int J Biochem Cell Biol*, **35**, 1170-4.

Andrews, R. K., Munday, A. D., Mitchell, C. A. and Berndt, M. C. (2001). Interaction of calmodulin with the cytoplasmic domain of the platelet membrane glycoprotein Ib-IX-V complex. *Blood*, **98**, 681-7.

Andrews, R. K., Shen, Y., Gardiner, E. E., Dong, J. F., Lopez, J. A. and Berndt, M. C. (1999). The glycoprotein Ib-IX-V complex in platelet adhesion and signaling. *Thromb Haemost*, **82**, 357-64.

B

Balduini Cl and Savoia A. (2012) Genetics of familial forms of thrombocytopenia. *Hum. Genet.*

Bearer E. L., Prakash J. M., and Li Z. (2002), Actin dynamics in platelets, *Int. Rev. Cytol.*, vol. 217, p. 137-182.

Berrébi, A. (2008). Maladies rares et grossesse de A à Z. Médecine Sciences Flammarion. Paris. 648p.

Bertozzi, C.C., Schmaier, A,a, Mericko, P., Hess, P. R., Zou, Z., Chen, M., Chen, C. Y., Xu, B., Lu, M. et Zhou, D., (2010). Platelets regulate lymphatic vascular development through CLEC-2-SLP-76 signaling. *Blood*, **116**, 661-327.

Best. D., Senis. Y. A., Jarvis. G. E., Eugleton. H. G., Robert. D. J., Saito. T., Jung. S. M., Moroi. M., Harrison. P., Green. F. R., and Watson. S. P. (2003). GPVI levels in platelets: relationship to platelet function at high shear. *Blood*, **102**, 2811-2818.

Bolton-Maggs PH, Chalmers EA, Collins PW, et al. (2006). A review of inherited platelet disorders with guidelines for their management on behalf of the UKHCDO. *Br J Haematol.* 135: 603 - 633.

Boneu. B., and J.P. Cazenave, (1997), Introduction à l'étude de l'hémostase et de la thrombose, 2^{ème} édition, éd. Alinéa, 281p, Reims.

Boudreaux, M. K., (2010). Platelet Structure *In: WEISS, D.J, WARDROP, K.J. Schalm's Veterinary Hematology 6th Ed.* Ames (USA), WILEY-BLACKWELL.

C

C. Strassel, A. Eckly, C. Leon, C. Petitjean, M. Freund, J.-P. Cazenave, C. Gachet, and F. Lanza. (Jun. 2009). Intrinsic impaired proplatelet formation and microtubule coil assembly of megakaryocytes in a mouse model of Bernard-Soulier syndrome. *Haematologica*, **94** (6), 800–810.

Carlo L. , Balduini A., Iolascon A. , Savoia A. (2002). Inherited thrombocytopenias: from genes to therapy, *haematologica*; 87:860-880. Disponible sur: http://www.haematologica.ws/2002_08/860.htm *Thrombopénies constitutionnelles*

Canobbio, I., Balduini, C. and Torti, M. (2004). Signalling through the platelet glycoprotein Ib-V-IX complex. *Cell Signal*, **16**, 1329-44.

Chi C, Pollard D, Tuddenham EG, Kadir RA. (2010). Menorrhagia in adolescents with inherited bleeding disorders. *J Pediatr Adolesc Gynecol*.23 : 215 - 222

Choi, E.S., Nichol, J.L., Hokom, M.M., Hornkohl, A.C. and Hunt, P. (1995) Platelets generated in vitro from proplatelet-displaying human megakaryocytes are functional. *Blood*, **85**, 402-413.

Cifuni S. M., Wagner D. D., and Bergmeier W. (sept. 2008), CalDAG-GEFI and protein kinase C represent alternative pathways leading to activation of integrin alphaIIb beta3 in platelets, *Blood*, **112** (5), 1696-1703.

Cines D.B., Pollak E.S., Buck C.A., Loscalzo J., Zimmerman G.A., Mcever R.P., Pober J.S., Wick T.M., Konkle B.A., Schwartz B.S., Barnathan E.S., McCrae K.R., Hug B.A., Schmidt A. M., and Stern D.M. (1998). Endothelial Cells in Physiology and in the Pathophysiology of Vascular Disorders [Internet]. *Blood*, **91** (10), 3527-3561.

Cognasse F, Hamzeh H, Chavarin P, Acquart S, Genin C, and Garraud O. (2005). Evidence of Toll-like receptor molecules on human platelets. *Immunology and cell biology*. **83** (2), 196-198.

Colvin B. T. (2004). ES04. 01 Physiology of hemostasis, *Vox Sanguinis*. **87**, 43–46.

Cramer, E.M., Norol, F., Guichard, J., Breton-Gorius, J., Vainchenker, W., Masse, J.M. and Debili, N. (1997) Ultrastructure of platelet formation by human megakaryocytes cultured with the Mpl ligand. *Blood*, **89**, 2336-2346.

Cranmer, S. L., Pikovski, I., Mangin, P., Thompson, P. E., Domagala, T., Frazzetto, M., Salem, H. H. and Jackson, S. P. (2005). Identification of a unique filamin a binding region within the cytoplasmic domain of glycoprotein Iba1. *Biochem J*, **387**, 849-58.

D

Dandachli, F. (2010). Régulation de la fonction plaquettaire par un aptamère dirigé contre le domaine A1 du facteur Von-Willebrand. Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures pour l'obtention du grade de maîtrise (M.Sc) en microbiologie et immunologie. Université de Montréal. 91p.

David, T. (2006). Cartographie fonctionnelle des domaines intracellulaires du complexe plaquettaire GPIb-V-IX et identification d'un nouveau partenaire cytoplasmique. Thèse de doctorat, Université de Louis Pasteur, Strasbourg I, 233p.

De Botton, S., Sabri, S., Daugas, E., Zermati, Y., Guidotti, J.E., Hermine, O., Kroemer, G., Vainchenker, W. and Debili, N. (2002). Platelet formation is the consequence of caspase activation within megakaryocytes. *Blood*, **100**, 1310-1317.

De Revel T., D. K. (2004). Physiologie de l'hémostase. *ECM-Dentisterie*, 1, 71-81.

Deutsch, V.R. and Tomer, A. (2006). Megakaryocyte development and platelet production. *Br J Haematol*, **134**, 453-466.

Doucet, F. X. (2016), Optimisation du diagnostic des thrombopénies constitutionnelles par l'utilisation des paramètres plaquettaires morphométriques, Thèse de doctorat, Université de Lorraine, 171p.

DU, X. (2007). Signaling and regulation of the platelet glycoprotein Ib-IX-V complex. *Curr Opin Hematol*, **14**, 262-9.

E

Elalamy I. (2006). Thrombopathies acquises et congénitales. *Encyclopédie Médico-Chirurgicale, Hématologie* (Elsevier SAS, Paris), Hématologie. 13-021-A-10.

F

FMH la Fédération mondiale de l'hémophilie, (2012) Que sont les dysfonctions plaquettaires héréditaires?

Franchini M. (2008). Inherited platelet disorders. *Clinica Chimica Acta*. 387(1-2): 1-8.

Franchini, M. (2006). Hemostasis and aging. *Crit Rev Oncol Hematol*, **60**, 144-51.

Fressinaud, E. and Meyer, D. (2005). Von Willebrand disease: from diagnosis to treatment. *Rev Prat*, **55**, 2209-18.

Frojmovic MM, and Milton JG. (1982 Jan). Human platelet size, shape, and related functions in health and disease. *Physiol Rev*. **62** (1), 185-261.

Furie, B. and Furie, B. C. (2008). Mechanisms of thrombus formation. *N Engl J Med*, **359**, 938-49.

G

Gaetano G. (2001). Historical overview of the role of platelets in haemostasis and thrombosis. *Haematological*, **86(4)**, 349-356.

Giesberts AN, van Willigen G, Lapetina EG, and Akkerman JW. (1995 Jul 15). Regulations of platelet glycoprotein IIb/IIIa (integrin alpha IIB beta 3) function via the thrombin receptor. *Biochem J.* **309 (2)**, 613-20.

Gnatenko, D.V., Dunn, J.J., McCorkle, S.R., Weissmann, D., Perrotta, P.L. and Bahou, W.F. (2003) Transcript profiling of human platelets using microarray and serial analysis of gene expression. *Blood*, **101**, 2285-2293.

Gohda F, Uchiumi H, Handa H, Matsushima T, Tsukamoto N and Morita K (2007) Identification of inherited macrothrombocytopenias based on mean platelet volume among patients diagnosed with idiopathic thrombocytopenia. *Thromb. Res.*, 119(6):741-746.

Guillot Nicolas M. (2008). Plaquettes sanguines et mégacaryocytes humains : impact de différentes concentrations d'acide docosahéxaénoïque sur leur activation et leur état redox. Thèse de doctorat, L'Université Claude Bernard - Lyon 1, 181p.

H

Hadj Kacem. B, Ben Amor. I, Smaoui. M, Maalej. L, Gargouri. J and Gargouri. A. (Juin / Déc 2010). étude moléculaire du syndrome de Bernard Soulier chez des familles tunisiennes non apparentées. *J.I. M. Sfax*, **19 / 20** :1 – 7

Hartwig, J. and Italiano, J., JR. (2003). The birth of the platelet. *J Thromb Haemost*, **1**, 1580-6.

I

Italiano, J.E., Jr., Lecine, P., Shivdasani, R.A. and Hartwig, J.H. (1999) Blood platelets are assembled principally at the ends of proplatelet processes produced by differentiated megakaryocytes. *J Cell Biol*, **147**, 1299-1312.

J

Jackson S. P. (juin. 2007), The growing complexity of platelet aggregation, *Blood*, **109 (12)**, 5087-5095.

Jackson S. P. and Schoenwaelder S. M. (2010), PI 3-Kinase p110 β regulation of platelet integrin α (IIb) β 3 », *Curr. Top. Microbiol. Immunol*, **346**, 203-224.

Jaffe, E. A., Hoyer, L. W. and Nachman, R. L. (1974). Synthesis of von Willebrand factor by cultured human endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **71**, 1906-9.

K

Kasirer-Friede A, Cozzi MR, Mazzucato M, De Marco L, Ruggeri ZM, and Shattil SJ. (2004). Signaling through GP Ib-IX-V activates alpha IIb beta 3 independently of other receptors. *Blood*; **103**, 3403-11.

Kisucka, J., Butterfield, C. E., Duda, D. G., Eichenberger, S. C., Saffaripour, S., Ware, J., Reggeri, Z.M., Jain, R. K., Folkman, J., and Wagner, D. D. (2006). Platelets and Platelet adhesion support angiogenesis while preventing excessive hemorrhage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**. 855-860.

Kobe. B., and Kajava. A. V. (2001). The leucine-rich repeat as a protein recognition motif. *Curr Opin Struct Biol.*, **11** (6), 725-732.

Kouakou MLKR. (2009). Les thrombopathies : étude bibliographique. Thèse de pharmacie de la faculté de médecine et de pharmacie de rabat, 134p.

Kunishima, S., Kamiya, T. and Saito, H. (2002a). Genetic abnormalities of Bernard-Soulier syndrome. *Int J Hematol*, **76**, 319-27.

Kunishima, S., Tomiyama, Y., Honda, S., Fukunishi, M., Hara, J., Inoue, C., Kamiya, T. and Saito, H. (2000). Homozygous Pro74 \rightarrow Arg mutation in the platelet glycoprotein Ibbeta gene associated with Bernard-Soulier syndrome. *Thromb Haemost*, **84**, 112-7.

Kunishima, S., Tomiyama, Y., Honda, S., Kurata, Y., Kamiya, T., Ozawa, K. and Saito, H. (1999). Cys97 \rightarrow Tyr mutation in the glycoprotein IX gene associated with Bernard-Soulier syndrome. *Br J Haematol*, **107**, 539-45.

Kupinski, J. M. and Miller, J. L. (1985). Multimeric analysis of von Willebrand factor in megakaryocytes. *Thromb Res*, **38**, 603-10.

L

Labelle, M., Begum, S., and Hynes, R. O. (2011). Direct signaling between platelets and cancer cells induces an epithelial-mesenchymal-like transition and promotes metastasis. *Cancer Cell*. **20**. 576-590.

Labrune. P. (2004). Urgences pédiatriques: Vol. 1 / Pathologies : clinique, examens, stratégies, gestes,; p112-113.

Lachenal, F. M. L. (2013). Présentation De Quelques Syndromes Hémorragiques Chez Les Bovins, thèse pour le doctorat vétérinaire, école nationale vétérinaire d'Alfort, Alfort, 127p.

Lanza F. (2006). Bernard-Soulier syndrome (Hemorrhagiparous thrombocytic dystrophy). *Orphanet Journal of Rare Diseases*, **1(1)**; 46.

Larson, M.K. and Watson, S. P. (2006a) A product of their environment: do megakaryocytes rely on extracellular cues for proplatelet formation? *Platelets*, **17**, 435-440.

Larson, M.K. and Watson, S. P. (2006b) Regulation of proplatelet formation and platelet release by integrin alpha IIb beta3. *Blood*, **108**, 1509-1514.

Latger-Cannard V, Fenneteau O and Lecompte T. (2011) le Centre de Référence des Pathologies Plaquettaires. *Morphologie plaquettaire et mégacaryocytaire : aide au diagnostic des thrombopénies constitutionnelles*. http://site.geht.org/site/Pratiques Professionnelles/Thrombopenies constitutionnelles/Morphologie-plaquettaire-et-diagnostic-des-thrombopenie sconstitutionnelles_92_.html /

Legru, S. (2009). Les troubles héréditaires de l'hémostase chez les carnivores domestiques, Thèse de Doctorat Vétérinaire (Alfort N°10), 253p.

Leslie, M. (2010). Cell biology. Beyond clotting: the powers of platelets. *Science*, **328**, 562- 4.

Li Z., Delaney M. K., O'Brien K. A., and Du X. (déc. 2010), Signaling during platelet adhesion and activation, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **30 (12)**, 2341-2349.

Luo. S. Z., and Li R. (2008). Specific heterometric association of four transmembrane peptides derived from platelet glycoprotein Ib-IX complex. *J Mol Biol.*, **382 (2)**, 448-457.

Luo. S. Z., Mo. X., Afshar-Kharghan. V., Srinivasan. S., Lopez. J. A. and Li R. (2007). glycoprotein Ibalpha forms disulfide bonds with 2 glycoprotein Ibbeta subunit in the resting platelet. *Blood*, **109 (2)**, 603-609.

M

Mackman, N. (2004). Role of tissue factor in hemostasis, thrombosis, and vascular developpement. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, **24**, 1015-1022.

Marmur J.D., Rossikhina M., Guha A., Fyfe B., Friedrich V., Mendlowitz M., Nemerson Y., and Taubman M.B. (1993). Tissue factor is rapidly induced in arterial smooth muscle after balloon injury. [Internet]. *J. Clin. Invest.* **91**, 2253-2259.

Mendolicchio, G. L. and Ruggeri, Z. M. (2005). New perspectives on von Willebrand factor functions in hemostasis and thrombosis. *Semin Hematol*, **42**, 5-14.

Michele P. Lambert. (2011). What To Do When You Suspect an Inherited Platelet Disorder. The Children's Hospital of Philadelphia and the Perelman School of Medicine at the University of Pennsylvania, Philadelphia, PA, *Hematology*.

Moog S, Mangin P, Lenain N, Strassel C, Ravanat C, Schuhler S, et al. (2001 Aug 15). Platelet glycoprotein V binds to collagen and participates in platelet adhesion and aggregation. *Blood*. **98(4)**, 1038-46.

N

Nieswandt B., Varga-Szabo D., and Elvers M. (juill. 2009), Integrins in platelet activation, *J. Thromb. Haemost.* **7 (1)**, 206-209.

Nizamaldin, Y., Abi Najm, S., El Hage, M., and Samson, J., (31 janvier 2012). Hémostase locale en chirurgie orale. 1ère partie : physiologie de l'hémostase. *Med Buccale Chir Buccale*; **18**, 119-127.

Nurden, A. T. (2007). Interesting variations on how a disease is defined: comparisons of von Willebrand disease and Glanzmann thrombasthenia. *J Thromb Haemost*, **5**, 647-9; author reply 649-51.

O

Ozaki, Y., Asazuma, N., Suzuki-Inoue, K. and Berndt, M. C. (2005). Platelet GPIb- IX-V-dependent signaling. *J Thromb Haemost*, **3**, 1745-51.

P

Patel, S.R., Hartwig, J.H. and Italiano, J.E., Jr. (2005) The biogenesis of platelets from megakaryocyte proplatelets. *J. Clin. Invest.*, **115**, 3348-3354.

Payrastré B, Alessi MC, and Sie P. (2014) Physiopathologie des thrombopathies constitutionnelles. *Hématologie* ; **20** : 20-35.

Pinedo, H. M., Verheul, H. M., D'Amato, R. J., and Folkman, J. (1998). Involvement of platelets in tumour angiogenesis? *Lancet*. **352**, 1775-1777.

Poujol, C., Tronik-Le Roux, D., Tropel, P., Roullot, V., Nurden, A., Marguerie, G. and Nurden, P. (1998) Ultrastructural analysis of bone marrow hematopoiesis in mice transgenic for the thymidine kinase gene driven by the alpha IIb promoter. *Blood*, **92**, 2012-2023.

R

Ramasamy I. (2004). inherited bleeding disorders: disorders of platelet adhesion and aggregation. *Crit Rev Oncol Hematol*. **49**: 1-35.

Reinders, J. H., De Groot, P. G., Sixma, J. J. and Van Mourik, J. A. (1988). Storage and secretion of von Willebrand factor by endothelial cells. *Haemostasis*, **18**, 246-61.

Renard, C. (2006). L'action des venins ophidiens sur l'hémostase. Thèse de doctorat, Université Henri Poincaré – Nancy 1, 174p.

Rondina, M. T., Weyrich, A. S., and Zimmerman, G. A. (2013). Platelets as cellular effectors of inflammation in vascular diseases. *Circ. Res.* **112**, 1506-1519.

Ross R. (1999). Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med*; **340** (2), 115-26.

Ruggeri, Z. M., Dent, J. A. and Saldivar, E. (1999). Contribution of distinct adhesive interactions to platelet aggregation in flowing blood. *Blood*, **94**, 172-8.

S

Sabri, S., Jandrot-Perrus, M., Bertoglio, J., Farndale, R.W., Mas, V.M., Debili, N. and Vainchenker, W. (2004) Differential regulation of actin stress fiber assembly and proplatelet formation by alpha2beta1 integrin and GPVI in human megakaryocytes. *Blood*, **104**, 3117-3125.

Salles I, Feys HB, Iserbyt BF, De Meyer SF, Vanhoorelbeke K and Deckmyn H. (2008) Inherited traits affecting platelet function. *Blood reviews*; 22(3): 155-72.

Sarratt. K. L., Chen. H., Zutter. M. M., Santoro. S. A., Hammer. D. A., and Kahn. M. L. (2005). GPVI and alpha 2 beta 1 play independent critical roles during platelet adhesion and aggregate formation to collagen under flow. *Blood*, **106**, 1268-1277.

Savage, B., Saldivar, E. and Ruggeri, Z. M. (1996). Initiation of platelet adhesion by arrest onto fibrinogen or translocation on von Willebrand factor. *Cell*, **84**, 289-97.

Savoia A, Pastore A, De Rocco D, Civaschi E, Di Stazio M and Bottega R (2011) Clinical and genetic aspects of Bernard-Soulier syndrome: searching for genotype/phenotype correlations. *Haematologica*, 96(3):417-423.

SCH la société canadienne d'hémophilie, (2008) Le Syndrome De Bernard-Soulier un trouble héréditaire de la coagulation du sang.

Schmugge, M., Rand, M. L. and Freedman, J. (2003). Platelets and von Willebrand factor. *Transfus Apher Sci*, **28**, 269-77.

Schneider DJ, Taatjes DJ, and Sobel BE. (14 Jan 2000). Paradoxical inhibition of fibrinogen binding and potentiation of alpha-granule release by specific types of inhibitors of glycoprotein IIb- IIIa. *Cardiovasc Res.* **45** (2), 437-46.

Schulze, H., Korpai, M., Bergmeier, W., Italiano, J.E., Jr., Wahl, S.M. and Shivdasani, R.A. (2004) Interactions between the megakaryocyte/platelet-specific beta1

tubulin and the secretory leukocyte protease inhibitor SLPI suggest a role for regulated proteolysis in platelet functions. *Blood*, **104**, 3949-3957.

Schwer, H.D., Lecine, P., Tiwari, S., Italiano, J.E., Jr., Hartwig, J.H. and Shivdasani, R.A. (2001) A lineage-restricted and divergent beta-tubulin isoform is essential for the biogenesis, structure and function of blood platelets. *Curr Biol*, **11**, 579-586.

Scott J.P., and Montgomery R.R. (1991). The rapid differentiation of type IIB von Willebrand disease (vWD) from platelet-type (pseudo-) vWD by the “neutral” monoclonal antibody binding assay. *Am J clin pathol.* **96** (6): 8-723.

Shattil S. J. and Newman P. J. (sept. 2004), Integrins: dynamic scaffolds for adhesion and signaling in platelets, *Blood*, **104** (6), 1606-1615.

T

Tablin, F., Castro, M. and Leven, R.M. (1990) Blood platelet formation in vitro. The role of the cytoskeleton in megakaryocyte fragmentation. *J Cell Sci*, **97** (1), 59-70.

Trevisan. M. (2011) Biofonctionnalisation, caractérisation et mise en œuvre de particules magnétique sur biocapteurs : Application au génotype plaquettaire. Thèse de doctorat, Ecole centrale de Lyon, 222p.

V

Vainchenker W, Debili N, Moushous M-A, and Wendling F. (1995). Megakaryocytopoiesis: cellular aspects and regulation. *Oncol Hematol*; **20**; 165-92.

Vainchenker, W. (2004) Differential regulation of actin stress fiber assembly and proplatelet formation by alpha2beta1 integrin and GPVI in human megakaryocytes. *Blood*, **104**, 3117-3125.

Van Der Loo B, and Martin JF. (Fév 1997). Megakaryocytes and platelets in vascular disease. *Baillieres Clin Haematol*; **10** (1), 109-23.

Versteeg, H. H., Heemeskerk, J. W. M., Levi, M and Reitsma, P. H. (2013). New Fundamentals in Hemostasis. *PhysiolRev*, **93** (1), 327-358.

W

Watson S. P., Asazuma N., Atkinson B., Berlanga O., Best D., Bobe R., Jarvis G., Marshall S., Snell D., Stafford M., Tulasne D., Wilde J., Wonerow P., and Frampton J. (juill. 2001), The role of ITAM- and ITIM-coupled receptors in platelet activation by collagen, *Thromb. Haemost.* **86** (1), 276-288.

Watson S. P., Auger J. M., McCarty O. J. T., and Pearce A. C. (août 2005), GPVI and integrin alphaIIb beta3 signaling in platelets, *J. Thromb. Haemost.* **3 (8)**, 1752-1762.

Wettschureck, N. and Offermanns, S. (2005) Mammalian G proteins and their cell type specific functions. *Physiol Rev*, **85**, 1159-1204.

Woulfe, D.S. (2005) Platelet G protein-coupled receptors in hemostasis and thrombosis. *J Thromb Haemost*, **3**, 2193-2200.

Z

Zauli, G., Vitale, M., Falcieri, E., Gibellini, D., Bassini, A., Celeghini, C., Columbaro, M. and Capitani, S. (1997) In vitro senescence and apoptotic cell death of human megakaryocytes. *Blood*, **90**, 2234-2243.

<http://www.maladies-plaquettes.org/administration/media/tiny-mce/images/rub1/flux-sanguin.jpg>

Annexes

Annexe 1



Microscope photonique

Annexe 2



Centrifugeuse

Annexe 3



Coulter

Annexe 4



Incubateur

Annexe 5



Cytomètre BD

Annexe 6

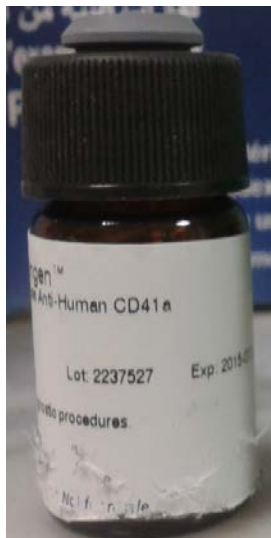


May Grunwald (MG)
(éosine – bleu de méthylène)

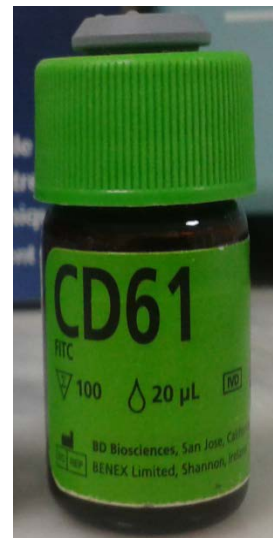


Colorant Giemsa
(éosine – azur de méthylène)

Annexe 7



Anticorps CD41a



Anticorps CD61

Résumé

Les thrombocytes sanguins (plaquettes) sont des cellules qui ont un rôle majeur au cours des processus de l'hémostase primaire, ce type cellulaire peut être une cible des déficits quantitatifs ou par des anomalies qualitatives. Ceci peut être un risque hémorragique plus ou moins grave voire même mortel. Le syndrome de Bernard Soulier est une thrombopathie hémorragique héréditaire rare (1 cas /1 million) qui se transmet selon le mode autosomique récessif. Ce type de maladie présente une difficulté pour le diagnostique et le traitement. Deux cas (un garçon et fille) ont fait l'objet de cette étude. Pour analyser les problèmes de diagnostic, on se base sur l'examen d'héмограмme des cellules sanguines, les analyses de la morphologie plaquettaire par frottis sanguin et des analyses plus spécifiques comme l'immunophénotypage par la cytométrie en flux pour la quantification des glycoprotéines thrombocytaires responsables de cette maladie tel que le GPIb α , GPIb β , GPIX et GPV.

Les résultats obtenus montrent que les malades de Bernard Soulier présentent une anémie avec une macrothrombopénie sévère et une défaillance au taux de GPIb α du complexe glycoprotéique GPIb-IX-V.

Mots clés : thrombocyte, l'hémostase primaire, syndrome de Bernard Soulier, glycoprotéines, l'immunophénotypage.

Abstract

Blood thrombocytes (platelets) are cells that play a major role in primary hemostasis processes, which can be a target of quantitative deficits or qualitative abnormalities. This can be a more or less serious or even fatal hemorrhagic risk. Bernard Soulier Syndrome (BSS) is a rare inherited haemorrhagic thrombopathy (1 case / 1 million) which is transmitted in the autosomal recessive mode.

This type of disease presents difficulties for diagnosis and treatment. Two cases (a boy and a girl) were the subject of this study. To analyze diagnostic problems, based on blood cell hemogram examination, blood smear platelet morphology analyzes and more specific analyzes such as flow cytometry immunophenotyping for the quantification of thrombocytic glycoproteins responsible for this disease such as GPIb α , GPIb β , GPIX and GPV.

The obtained results showed that Bernard Soulier's patients had anemia with severe macrothrombocytopenia and a GPIb α -deficiency of the GPIb-IX-V glycoprotein complex.

Key words: thrombocyte, primary hemostasis, Bernard Soulier syndrome, glycoproteins, immunophenotyping.