

« Diagnostic des Anomalies des GRANules Denses
plaquettaires dans les syndromes hémorragiques
inexpliqués »
AGRAD

PROCOLE DE RECHERCHE NON
INTERVENTIONNELLE IMPLIQUANT LA PERSONNE
HUMAINE

Version N°1.0 du 10/05/2019
Code projet AP-HP : APHP190393

Investigateur Coordonnateur : Delphine BORGEL
Hématologie Biologique
Hôpital Necker-Enfants malades - Paris

Responsable scientifique : Marie-Christine ALESSI
Hématologie Biologique
Hôpital La Timone - Marseille

Promoteur : Assistance Publique – Hôpitaux de Paris (AP-HP)
Délégation à la Recherche Clinique et à l'Innovation
(DRCI)
Hôpital Saint-Louis - Paris
Réfèrent projet : Sylvie Prieur
Courriel : sylvie.prieur@aphp.fr

Structure chargée du suivi de la recherche :
Unité de Recherche Clinique Paris Descartes Necker
Cochin
Hôpital Necker - Enfants Malades - Paris
Réfèrent projet DRCI-URC : Nelly BRIAND
Courriel : nelly.briand@aphp.fr

Page de SIGNATURE D'UN PROTOCOLE de recherche

Code de la Recherche :

Titre : Diagnostic des Anomalies des GRANules Denses plaquettaires dans les syndromes hémorragiques inexplicables - AGRAD

Version N° 1.0 du 26/03/2019

La recherche sera conduite conformément au protocole, aux bonnes pratiques en vigueur et aux dispositions législatives et réglementaires en vigueur.

L'investigateur coordonnateur :

Pr Delphine BORGEL
Service d'Hématologie Biologique
Hôpital Necker-Enfants Malades
75015 Paris

Date :/...../.....

Signature :

Le promoteur

Assistance Publique – Hôpitaux de Paris
Délégation à la Recherche Clinique et à
l'Innovation (DRCI)
Hôpital Saint Louis
1 avenue Claude Vellefaux
75010 PARIS

Date :/...../.....

Signature :

TABLE DES MATIÈRES

1.	RESUME.....	4
2.	JUSTIFICATION SCIENTIFIQUE DE LA RECHERCHE.....	7
2.1.	ETAT ACTUEL DES CONNAISSANCES RELATIVES AU DOMAINE CONCERNE	7
2.2.	DESCRIPTION DE LA POPULATION A ETUDIER ET JUSTIFICATION DE SON CHOIX	12
2.3.	JUSTIFICATION DE LA DUREE DE LA RECHERCHE.	12
3.	OBJECTIFS	14
3.1.	OBJECTIF PRINCIPAL.....	14
3.2.	OBJECTIFS SECONDAIRES	14
4.	METHODE ET POPULATION.....	15
4.1.	CRITERES D'EVALUATION.....	15
4.2.	POPULATION ETUDIEE.....	15
4.3.	DEROULEMENT DE LA RECHERCHE	16
	VISITE D'EXPLORATION (V0)	16
	VISITE DE CONFIRMATION/TYPAGE (V1)	18
4.4.	DUREE DE LA RECHERCHE.....	24
5.	RISQUES ET VIGILANCE	25
6.	ASPECTS STATISTIQUES	26
6.1.	JUSTIFICATION STATISTIQUE DE LA TAILLE DE L'ECHANTILLON	26
6.2.	DESCRIPTION DES METHODES STATISTIQUES	26
	REGLES D'ARRET	27
7.	GESTION DES DONNEES.....	28
7.1.	MODALITES DE RECUEIL DES DONNEES	28
7.2.	CIRCUIT DES DONNEES.....	28
7.3.	DROITS D'ACCES AUX DONNEES DES SUJETS ET DOCUMENTS SOURCES.....	28
7.4.	CONSERVATION DES DOCUMENTS ET DES DONNEES.....	28
8.	CONTROLE DE LA QUALITE.....	29
8.1.	QUALIFICATION DES INTERVENANTS.....	29
8.2.	QUALITE DES DONNEES	29
9.	ASPECTS ETHIQUES ET LEGAUX.....	30
9.1.	ROLE DU PROMOTEUR	30
9.2.	MODALITES D'INFORMATION DES SUJETS.....	30
9.3.	DEMANDE D'AVIS AU COMITE DE PROTECTION DES PERSONNES	30
9.4.	INFORMATION DE L'ANSM.....	30
9.5.	TRAITEMENT DES DONNEES A CARACTERE PERSONNEL.....	30
9.6.	MODIFICATION DE LA RECHERCHE.....	31
9.7.	RESPONSABILITES DE L'INVESTIGATEUR VIS-A-VIS DU PROMOTEUR	31
9.8.	RAPPORT FINAL DE LA RECHERCHE.....	31
9.9.	ARCHIVAGE	31
10.	REGLES RELATIVES A LA PUBLICATION	32
11.	BIBLIOGRAPHIE	33
12.	ADDENDA.....	34
12.1.	Liste des Investigateurs.....	34
12.1.	Liste des Annexes	35

1. RESUME

Promoteur	Assistance Publique – Hôpitaux de Paris
Titre	Diagnostic des Anomalies des GRANules Denses plaquettaires dans les syndromes hémorragiques inexpliqués
Titre abrégé	Anomalies des granules denses plaquettaires
Acronyme	AGRAD
Investigateur coordonnateur	Delphine BORGEL, Service d'Hématologie Biologique, Hôpital Necker-Enfants malades
Responsable scientifique	Marie-Christine ALESSI, Service d'Hématologie Biologique, Hôpital de la Timone, Marseille
Nombre de centres	9 centres
Nombre de sujets prévus	La prévalence de chaque type d'anomalies des granules denses n'étant pas connue et faisant l'objet de ce travail, il nous est impossible de définir statistiquement le nombre de patients à inclure. Sur la base du recrutement des différents centres, nous prévoyons d'inclure 480 patients
Population concernée	Enfants et Adultes ayant un syndrome hémorragique inexpliqué
Calendrier de la recherche	Période d'inclusion : 2 ans ; Durée de participation : 6 mois Durée de l'étude : 2,5 ans
Critères d'éligibilité de la population	<p>Critères d'inclusion</p> <ul style="list-style-type: none"> - Patient adulte ou enfant ≥ 2 ans - Ayant un score hémorragique ISTH >3 pour les hommes, >5 pour les femmes et >2 pour les enfants. - Ne présentant aucune anomalie de la coagulation ou du facteur willebrand (définie par une activité Cofacteur à la Ristocétine (VWF:RCo $<50\%$)) et/ou une thrombopénie/thrombopathie majeure connue liée à un déficit de l'un des principaux récepteurs plaquettaires - Information du patient et/ou de son représentant légal présent <p>Critères de non-inclusion</p> <ul style="list-style-type: none"> - Incapacité ou refus de compliance aux exigences de la recherche - Thrombopénie <100 G/L - Traitements interférant avec les fonctions plaquettaires dans les 10 jours précédents l'inclusion - Hémopathie maligne
Objectifs	<p>Objectif principal</p> <p>Connaitre la prévalence globale des déficits granulaires et leur répartition par type (anomalie de nombre, de contenu ou de sécrétion) dans une population de patients présentant une symptomatologie hémorragique après exclusion d'autres causes connues</p> <p>Objectifs secondaires</p> <ul style="list-style-type: none"> - Rechercher une association entre la présence d'un déficit en granules denses et (1) l'intensité du phénotype hémorragique (score hémorragique) (2) la nature des hémorragies (post-opératoire, spontané, atypique...) - Rechercher une association entre le type de déficit en granules denses et (1) l'intensité du phénotype hémorragique (score hémorragique) (2) la nature des hémorragies (post-opératoire, spontané, atypique...)

	<ul style="list-style-type: none"> - Rechercher une(des) anomalie(s) génétique(s) responsable(s) du défaut de granule dense lorsqu'une étude familiale sera possible (si cas familiaux) - Rechercher une association entre la présence d'un déficit en granules denses et le test de consommation de la prothrombine - Rechercher une association entre le type de déficit en granules denses et le test de consommation de la prothrombine
Critères d'évaluation	<p>Critère d'évaluation principal : Étude des granules denses plaquettaires par différentes méthodes explorant à la fois le nombre de grains, leur contenu et la capacité sécrétoire. La concordance entre les tests d'exploration plaquettaires mis en œuvre permettra de typer les déficits en (1) déficit quantitatif en granules denses (2) déficit qualitatif en granules denses (3) défaut de sécrétion des granules denses</p> <p>Critères d'évaluation secondaires</p> <ul style="list-style-type: none"> - Évaluation du risque hémorragique et de la nature des hémorragies (spontanées ou provoquées, typique ou atypique ...) à l'aide du questionnaire et du score ISTH - Résultats de l'étude moléculaire - Résultats du test de consommation de la prothrombine
Méthodologie	<p>Les patients seront recrutés à l'occasion d'une consultation en vue de la recherche d'une thrombopathie ou lors de consultations de suivi dans le cadre de leur prise en charge habituelle.</p> <p>Parmi les examens réalisés dans le cadre de la recherche d'anomalies delta granulaires prévue dans le soin, certains seront réalisés sur chacun des sites :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Consommation de la prothrombine - Agrégations plaquettaires - Test à la Mépacrine en Cytométrie de Flux (CMF) - CMF de marqueurs granulaires - Préparation pour ME 3D - Étude de la sécrétion d'ATP <p>D'autres examens seront réalisés de façon centralisée sur certains sites :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Microscopie Électronique des granules denses plaquettaires (Lyon/Toulouse/Strasbourg) - Microscopie Électronique des granules denses plaquettaires en FIB-SEM (Strasbourg) - Dosage de la sérotonine plaquettaire (Marseille) - Dosage du PAI1 sérique (Marseille) - Dosage ATP/ADP plaquettaire (EFS Strasbourg) <p>Préalablement à l'inclusion des patients, une phase de comparaison des méthodes entre les sites et d'harmonisation des procédures pour les méthodes qui seront effectuées sur chacun des sites est prévue.</p>

	<p>Les patients seront recrutés au cours de la visite d'exploration (V0) ou de la visite de confirmation/typage (V1) en fonction de leur suivi.</p> <p>Visite d'exploration (V0) : Inclusion des patients n'ayant pas eu d'exploration plaquettaire préalable, et étude de leurs granules denses plaquettaires.</p> <p>Visite de confirmation/typage (V1): Vérification de la persistance des anomalies détectées chez les patients chez lesquels une anomalie a été identifiée lors de la V0 (au plus tard 6 mois après la V0) et chez les patients pour lesquels une anomalie des granules denses a déjà été identifiée au cours de leur prise en charge préalablement au démarrage de l'étude. Réalisation d'examens complémentaires pour compléter le typage de l'anomalie granulaire et analyse moléculaire pour les cas familiaux</p>
Analyse statistique	L'analyse statistique sera réalisée par l'ingénieur Biostatisticien de l'équipe de Marseille
Source de financement	Centre de Référence des Pathologies Plaquettaires

2. JUSTIFICATION SCIENTIFIQUE DE LA RECHERCHE

2.1. Etat actuel des connaissances relatives au domaine concerné

2.1.1 Généralités

Les plaquettes sont les principaux acteurs cellulaires de l'hémostase primaire. Ce sont des cellules anucléées qui vont être activées lors de la survenue d'une brèche vasculaire pour former un clou plaquettaire. Cette activation se fait en plusieurs étapes, (i) une phase d'adhésion au sous endothélium mis à nu par l'intermédiaire du facteur de Willebrand, (ii) une phase d'activation et de sécrétion du contenu des granules alpha et des granules denses avec amplification de la réponse plaquettaire et enfin (iii) une phase d'agrégation consécutive à la trans-conformation du récepteur $\alpha_{IIb}\beta_3$ (GPIIb/IIIa) qui peut alors lier le fibrinogène.

Un défaut quantitatif ou qualitatif des plaquettes se traduit principalement par des manifestations hémorragiques cutané-muqueuses. Dans certains cas des hémorragies profondes peuvent survenir, pouvant mettre en jeu le pronostic vital ou fonctionnel du patient. Parmi ces défauts, certains déficits rares bien connus et caractérisés comme la maladie de Glanzmann ou la maladie de Bernard-Soulier qui touchent respectivement les récepteurs $\alpha_{IIb}\beta_3$ et GPIb-V-IX, sont classiquement recherchés lors de l'exploration de thrombopathies. D'autres anomalies, qui peuvent concerner la phase de sécrétion des granules denses ou granules alpha, sont largement moins explorées car l'absence de test simple et fiable pour leur diagnostic a été pendant longtemps un obstacle majeur. Ainsi, dans une étude menée par l'ISTH (1), moins de 50% des laboratoires explorant les fonctions plaquettaires dans le cadre de manifestations hémorragiques recherchent ce type d'anomalies alors qu'elles sont de loin les plus fréquentes. En effet, il a été rapporté qu'elles représenteraient plus de 90% des anomalies héréditaires des plaquettes, avec une prévalence des déficits en granules denses plus élevée que celle de la maladie de Willebrand (2).

Le type et l'intensité du syndrome hémorragique associé à un déficit en granules denses sont très variables d'un patient à l'autre. L'expression hémorragique la plus courante reste de type cutanéomuqueux (pétéchies, ecchymoses, épistaxis, ménorragies, saignements digestifs...) spontanés ou provoqués. Même si celle-ci est souvent modérée, elle peut parfois s'exprimer sous la forme de saignements importants. De nombreuses consultations en hémostase spécialisée sont notamment motivées par la survenue d'hémorragies post-opératoires inexpliquées. Dans ces contextes, l'établissement d'un diagnostic est important afin de proposer à ces patients une prévention en cas d'une nouvelle chirurgie. De ce fait, il est recommandé de rechercher un déficit en granules denses en cas de syndrome hémorragique inexpliqué (3,4).

2.1.2 Les granules des plaquettes

On distingue 3 types de granulations plaquettaires, les granules alpha (granules α), les granules delta (granules δ) aussi appelées granules denses et les lysosomes (5). Nous détaillerons plus particulièrement les granules alpha et surtout les granules denses qui sont directement impliquées dans les propriétés hémostatiques de plaquettes.

Granules alpha (α)

Ce sont les granules les plus nombreux de la plaquette (50-80/plaquette). Elles contiennent plus de 100 protéines, parmi lesquelles le PF4 et la β TG spécifiques de la lignée mégacaryocytaire, le facteur de Willebrand, le PAI1, le PDGF, la P-selectine (CD62) synthétisés par les mégacaryocytes mais également par d'autres types cellulaires et le fibrinogène, ou les IgG uniquement incorporés dans les plaquettes par endocytoses des protéines plasmatiques.

Le déficit en granule alpha ou syndrome des plaquettes grises est très rare et se manifeste par une macrothrombocytopénie et des manifestations hémorragiques de type cutanéomuqueux d'intensité variable (6). Encore plus rarement, un déficit en granule alpha peut être associé à un défaut en granules denses. Il s'agit alors d'anomalies touchant de façon globale la genèse ou la mobilisation des vésicules au sein des cellules de la lignée mégacaryocytaire (7).

Granules denses (δ)

Les granules denses (3-8/plaquette) contiennent principalement de l'ADP, de l'ATP, des pyrophosphates, de la sérotonine (5-HT) et du calcium. Parmi ces composants, l'ADP sécrété joue un rôle majeur dans l'amplification de l'activation plaquettaire en se fixant, une fois sécrété à partir des granules denses, à ses récepteurs P2Y₁ et P2Y₁₂ à la surface des plaquettes. Des inhibiteurs pharmacologiques du récepteur P2Y₁₂ sont d'ailleurs couramment utilisés en thérapeutique pour limiter les capacités d'activation plaquettaire

Au niveau membranaire, les granules denses expriment entre-autres la protéine LAMP3 (CD63) qui est également présente au niveau de la membrane lysosomale.

Contrairement aux déficits en granules alpha, les déficits en granules denses sont fréquents et de différentes étiologies. On distingue classiquement (7) :

- Les formes acquises, principalement associées à des hémopathies malignes comme des syndromes myélodysplasiques ou les syndromes myéloprolifératifs
- Les déficits congénitaux qui feront l'objet de ce projet. Ils peuvent être syndromiques (comme la maladie de Hermansky Pudlak ou la maladie de Chediak Higashi) ou non syndromiques

Une des difficultés de diagnostic des anomalies des granules denses réside dans l'hétérogénéité de ce groupe de thrombopathies dont les bases moléculaires sont encore très mal connues (7). En outre, les techniques permettant de les détecter ont pendant longtemps fait preuve d'un défaut de standardisation, d'une sensibilité médiocre, en plus d'être très lourdes à mettre en œuvre. Ces tests restent réservés à des laboratoires spécialisés, mais ont largement gagné en standardisation ces dernières années.

2.1.3 Prévalence des anomalies delta granulaires des plaquettes dans la maladie hémorragique

Les anomalies delta granulaires sont de loin les plus fréquentes des thrombopathies (8). Une étude prospective réalisée sur une population d'Amérique du Sud souffrant de

manifestations hémorragiques cutanéomuqueuses (2) rapporte une prévalence des anomalies de granules denses de 23,2%. Déjà 20 ans avant, une étude rétrospective Néerlandaise (9) avançait une prévalence estimée à 18%. Dans ces deux études, les techniques utilisées étaient cependant limitées à une étude des plaquettes en agrégation sachant que des profils anormaux sont inconstamment retrouvés dans les défauts delta granulaires (9,10) et à l'étude du contenu des plaquettes en sérotonine et en nucléotides (ADP seul ou évaluation du rapport ATP/ADP). L'analyse en microscopie électronique n'a pas été réalisée dans ces études alors même qu'elle fait partie des techniques actuellement reconnues pour le diagnostic de ces anomalies (8). Enfin, en 2009, Hayward et al (11) ont réalisé une étude prospective visant à évaluer la place de l'agrégation plaquettaire dans le diagnostic biologique de maladie hémorragique. Dans le cadre de cette étude, ils retrouvent, de façon cohérente avec les études précédentes, que la part des anomalies héréditaires des granules denses plaquettaires représentait 15% des cas.

Il semble donc que les déficits delta granulaires soient des anomalies fréquentes et sous diagnostiquées. Leur impact clinique reste difficile à évaluer (2,12) et pourrait-être comparable, en termes de sévérité, aux manifestations hémorragiques de la maladie de Willebrand.

On distingue classiquement plusieurs types de déficits delta granulaires :

A) Les déficits liés à une anomalie directe des granules denses :

- 1) **Soit quantitatifs (partiels ou totaux) :** liés à un défaut de genèse des granules. La membrane des granules et leur contenu font alors défaut. Ce déficit en granules denses peut être associé à un défaut en granules alpha également (déficits rares et généralement dus à des anomalies du trafic vésiculaire dans les cellules)
- 2) **Soit qualitatifs :** Dans ce cas les granules sont présents mais on observe une diminution de leur contenu

B) Les déficits indirects liés à des défauts de sécrétion des granules denses.

Les granules sont présents et leur contenu normal, mais lors de l'activation plaquettaire on observe un défaut de sécrétion, suggérant une anomalie des voies de signalisation nécessaires à cette sécrétion.

2.1.4 Techniques d'exploration des granules plaquettaires

La majorité des techniques décrites ci-dessous relèvent de laboratoires très spécialisés et ne sont pas réalisés en pratique courante (1). Très souvent, les seuls tests fonctionnels effectués pour rechercher et explorer des thrombopathies en pratique courante sont des tests d'agrégation plaquettaire associés à la quantification des principaux récepteurs plaquettaires par cytométrie en flux, avec comme conséquences un sous-diagnostic des anomalies des granules denses.

Exploration des granules δ des plaquettes

Protocole « AGRAD », version 1.0 du 10/05/2019

9/42

Plusieurs tests de laboratoire peuvent être utilisés pour explorer les granules denses plaquettaires (3). Cependant ils ne sont pas équivalents en termes de sensibilité et de spécificité, probablement en lien avec l'hétérogénéité de ce groupe de thrombopathies. Ces tests doivent donc être combinés pour diagnostiquer les anomalies delta granulaires. En effet, certains permettent de mettre en évidence un déficit quantitatif (diminution ou absence de granules) et/ou un qualitatif (anomalie de leur contenu) des granules denses. D'autres vont explorer un défaut de sécrétion.

Agrégations plaquettaires

Les tests d'agrégations plaquettaires sont réalisés sur le plasma riche en plaquette (PRP) préparé à partir du prélèvement sanguin du patient à explorer. La réponse des plaquettes à différents agonistes est évaluée par cette technique. Certains agonistes utilisés à faible dose comme l'ADP, l'épinéphrine ou le collagène sont particulièrement sensibles à des défauts granulaires et permettent de détecter ces anomalies (11) tant quantitatives que liées à un défaut de sécrétion. Il est cependant clairement établi que des anomalies d'agrégation plaquettaires ne sont pas systématiquement observées chez les patients présentant un défaut de sécrétion (9,10).

Analyse des granules denses en Microscopie Electronique (ME)

Whole Mount

Les granules denses contiennent du calcium, ce qui les rend naturellement opaques aux électrons et permet donc leur visualisation directe en microscopie électronique après une préparation simple (3,13). Cette technique ne permet cependant pas de faire la distinction entre absence de granule delta ou absence de calcium et plus largement de contenu dans ces granules delta, puisqu'elles sont rendues visibles grâce au calcium contenu dans ces granules.

Fib-SEM

Il s'agit là d'une technique de ME à balayage à faisceau d'ions focalisés qui permet une reconstitution en 3D des plaquettes et donc de visualiser d'éventuels granules vides. Cette technique est beaucoup plus fine et, confrontées aux autres tests, elle permettra, si des vacuoles vides sont observées, d'apporter un élément supplémentaire dans le typage d'une anomalie delta granulaire.

Évaluation du contenu delta granulaire par dosage de la sérotonine plaquettaire

Le contenu des granules delta peut être évalué en mesurant la sérotonine plaquettaire par HPLC. En effet, il s'agit d'un marqueur sélectif des granules delta des plaquettes, aucune autre cellule sanguine ne contenant de sérotonine. La sérotonine libérée après lyse des plaquettes *in vitro* reflète donc le contenu en sérotonine des plaquettes. Les anomalies delta granulaires quantitatives s'accompagneront donc d'un taux de sérotonine diminué.

Évaluation du contenu delta granulaire par dosage des nucléotides plaquettaires et évaluation du rapport ATP/ADP.

Les nucléotides plaquettaires sont divisés en deux pools : un pool métabolique cytoplasmique composé essentiellement d'ATP et un pool contenu dans les granules denses composé en majorité d'ADP (ATP/ADP = 0.65-0.78). Ainsi le rapport des quantités des nucléotides totaux plaquettaires ATP/ADP est normalement proche de 2 (5). En cas de déficit quantitatif en granules denses plaquettaires ou en cas de déficit sélectif en ADP dans les granules denses plaquettaires, ce rapport ATP/ADP augmente et est classiquement supérieur à 4. Par contre ce dosage ne permet pas de mettre en évidence les anomalies de la sécrétion des granules denses.

Le dosage des nucléotides plaquettaires totaux est réalisé en HPLC à partir d'une suspension plaquettaire (PRPc). Le dosage peut être réalisé à distance sur matériel congelé à -80°C, après précipitation des plaquettes en acide perchlorique.

Test à la mépacrine

La mépacrine est un fluorochrome qui est incorporé par les plaquettes et qui marque sélectivement les granules denses. Il est excitable par un laser argon. L'analyse se fait par cytométrie en flux (CMF), la lecture étant réalisée à l'aide d'un filtre optique à 525 nm. La technique apprécie l'incorporation de mépacrine et sa libération après activation des plaquettes (14). Ce test sera perturbé en cas d'un déficit quantitatif ou d'un défaut de sécrétion des granules delta.

Mesure de l'expression de CD63 après activation des plaquettes

Le CD63 est un récepteur transmembranaire présent à la fois dans la membrane des granules denses et des lysosomes. Il est peu détectable sur les plaquettes au repos et exprimé à la surface des plaquettes après activation et sécrétion du contenu des granules denses.

Même si ce marqueur n'est pas spécifique des granules denses plaquettaire, associé au test à la mépacrine il trouve sa place dans l'arsenal des examens utiles dans le diagnostic des anomalies delta granulaires des plaquettes (14). Il ne permet cependant pas de distinguer une absence de granules d'une anomalie de sécrétion delta granulaire.

Évaluation de la sécrétion des granules delta

L'étude de la sécrétion des granules delta peut se faire par lumiagrégométrie à partir de PRP. Elle peut se faire après une très forte activation des plaquettes pour induire la libération de la totalité du stock delta granulaire en ATP (ex : activation avec du TRAP 50 µM) ou après activation ménagée à l'aide de doses intermédiaires d'agonistes.

La mesure est basée sur le principe de bioluminescence avec une réaction en deux étapes de transformation de la luciférine en présence de luciférase, cette réaction nécessitant la présence d'ATP. Elle nécessite donc un équipement particulier qui permet de détecter cette bioluminescence (ex : agrégomètre de type Chrono-Log®).

Exploration des granules α des plaquettes

Étant donné l'existence de déficits plaquettaires combinés en granules alpha et delta, il est indispensable d'explorer en parallèle les 2 types granulaires.

L'exploration des granules alpha peut être abordée de différentes façons. A l'aide de techniques de cytométrie en flux en quantifiant, après activation plaquettaire, des récepteurs présents dans la membrane des granules alpha et exposés lors de l'activation des

plaquettes (CD62P, augmentation de CD41) ou encore en mesurant le contenu des granules alpha très riche en protéines telles que le PAI1, le PF4 ou encore la β thromboglobuline (β TG). Le taux de PAI1 sérique est un bon moyen d'évaluer le contenu des granules alpha, car, 95% du PAI1 est d'origine plaquettaire. Une diminution du PAI1 sérique va donc évoquer un déficit plaquettaire en granules alpha.

Il existe donc plusieurs techniques pour diagnostiquer un défaut delta granulaire. Cependant, un des problèmes rencontrés est la mauvaise sensibilité de chacun des tests pris individuellement. Ces tests évaluent également des éléments différents (contenu, contenant ou encore sécrétion des granules denses). La combinaison de plusieurs tests est donc indispensable au diagnostic de défaut delta granulaire et à son typage (Fiore, 243, 2017).

Exploration de l'hémostase primaire à l'aide de tests globaux

Certains tests d'exploration globale de l'hémostase sont réalisés en présence de plaquettes et sont donc potentiellement sensibles à l'hémostase primaire. C'est le cas du temps d'occlusion plaquettaire (PFA®) qui a été développé pour étudier spécifiquement l'hémostase primaire. La sensibilité du PFA® aux anomalies plaquettaires delta granulaires a d'ores et déjà été évaluée, montrant une mauvaise sensibilité à ce type de déficit (15).

La mesure de la consommation de prothrombine (encore appelé mesure de la prothrombine résiduelle) est un autre test global sensible, entre autres, à l'exposition des phospholipides anioniques consécutifs à l'activation plaquettaire (16). Cependant, aucune étude n'a évalué la sensibilité de ce test à un défaut plaquettaire d'origine granulaire.

2.2. Description de la population à étudier et justification de son choix

Les patients concernés par cette étude sont des patients présentant des manifestations hémorragiques spontanées ou provoquées. En raison de ces manifestations, ils sont adressés en consultation d'hémostase spécialisée pour une exploration approfondie. Au cours de la première consultation, un examen clinique et un interrogatoire permettant l'établissement du score hémorragique (Score ISTH) sont réalisés (Score accessible via le lien https://cdn.ymaws.com/www.isth.org/resource/resmgr/ssc/isth-ssc_bleeding_assessment.pdf). Ce score permet de collecter des informations diverses comme la nature des saignements, leur fréquence, leur intensité ou encore le contexte de leur survenue. A l'occasion de cette première visite, un bilan biologique de première intention est réalisé et inclut un bilan d'hémostase de base (TP, TCA, fibrinogène, NFS plaquettes) et la recherche d'une maladie de Willebrand. Si ces résultats sont normaux et que la clinique est évocatrice d'une anomalie de l'hémostase primaire, des tests de seconde intention sont alors envisagés afin de rechercher une éventuelle thrombopathie. C'est dans le cadre de cette exploration de seconde intention que les patients seront inclus dans le protocole AGRAD.

2.3. Justification de la durée de la recherche.

La fréquence des anomalies des granules denses a été estimée comme étant comprise entre 18 à 23% des patients adressés en consultation pour exploration de l'hémostase (2,9). Par ailleurs, la recherche d'anomalie des granules denses plaquettaire est, en pratique, déjà

réalisée par plusieurs laboratoires du CRPP sur le territoire national. Ainsi, le CRPP a d'ores et déjà délivré plus de 100 cartes à des patients identifiés comme porteurs d'anomalies des granules denses sur le territoire national.

Au niveau de l'hôpital Necker-Enfants malades, au cours de l'année 2017, une analyse des granules denses en microscopie électronique a été demandée en 2^{ème} intention chez les patients avec score hémorragique ISTH ≥ 4 et/ou hémorragie(s) atypique(s) (correspondant à la case « autres » dans le score ISTH) et un bilan Willebrand normal, indépendamment de la présence ou non d'anomalies d'agrégation plaquettaire. Cette stratégie a entraîné l'envoi d'échantillons pour 36 patients et parmi ceux-ci, 20 déficits delta granulaires ont été diagnostiqués, soit chez 55% de ces patients. Dans le cadre de la prise en charge de ces patients, ces déficits doivent maintenant être confirmés et typés.

Ainsi, pour avoir environ 100 patients avec défaut des granules denses, il faut envisager le recrutement de 480 patients. Une durée du recrutement de 2 ans a été calculée en fonction du recrutement des différents services et de la capacité d'exploration des fonctions plaquettaires de ces malades, sachant que les tests réalisés nécessitent des techniciens spécialisés et sont très chronophages (techniques manuelles).

	Nombre de sujets
Nombre total de sujets sélectionnés	480
Nombre de centres	8
Période d'inclusion (mois)	24
Nombre de sujets / centre	60
Nombre de sujets / centre / mois	2 à 3 par mois

Durée de la période d'inclusion : 2 ans

Durée de participation de chaque patient : la participation des patients consiste en 1 ou 2 visites à une fréquence identique à celle du suivi pour le syndrome hémorragique (soin courant) : (1) visite d'exploration (V0) lors de l'étude, en seconde intention, de l'hémostase primaire, (2) visite de confirmation/typage (V1) pour les sujets chez lesquels une anomalie serait détectée par l'un des tests faisant l'objet de la recherche lors de la V0 (et dans ce cas cette visite V1 sera faite dans un délai maximum de 6 mois après la V0) ou dans le cadre d'un diagnostic d'anomalie des granules denses non confirmé/typé préalable à la présente étude.

Durée totale de la recherche : 2,5 ans

3. OBJECTIFS

3.1. Objectif principal

Connaitre la prévalence globale des déficits granulaires et leur répartition par type (anomalie de nombre, de contenu ou de sécrétion) dans une population de patients présentant une symptomatologie hémorragique après exclusion d'autres causes connues.

3.2. Objectifs secondaires

Les objectifs secondaires consisteront à :

- a. Rechercher une association entre la présence d'un déficit en granules denses et (1) l'intensité du phénotype hémorragique (score hémorragique) (2) la nature des hémorragies (post-opératoire, spontané, atypique...)
- b. Rechercher une association entre le type d'anomalie des granules denses et (1) l'intensité (2) le type d'hémorragie (post-opératoire, spontané, atypique...)
- c. Rechercher une(des) anomalie(s) génétique(s) responsable(s) du défaut de granule dense lorsqu'une étude familiale sera possible (si cas familiaux)
- d. Rechercher une association entre la présence d'un déficit en granules denses et le test de consommation de la prothrombine
- e. Rechercher une association entre le type de déficit en granules denses et le test de consommation de la prothrombine

4. METHODE ET POPULATION

4.1. Critères d'évaluation

Critère d'évaluation principal

Étude des granules denses plaquettaires par différentes méthodes explorant à la fois leur nombre, leur contenu et la capacité de sécrétion de ces granules.

La concordance entre les tests d'exploration plaquettaires mis en œuvre (Agrégation plaquettaire, ME, test à la mépacrine, dosage de composés intragranulaires, mesure de marqueurs granulaires par cytométrie en flux) nous permettra de typer les déficits delta granulaires diagnostiqués et de les classer en (1) déficits quantitatifs en granules denses, (2) déficits qualitatifs en granules denses, (3) défaut de sécrétion des granules denses.

Le calcul de prévalence sera réalisé uniquement sur les patients nouvellement diagnostiqués (inclus en Visite V0).

Critères d'évaluation secondaires

- Rechercher une association avec l'importance (score hémorragique) et la nature des hémorragies (post-opératoire, spontané, atypique...) évalués à l'aide du questionnaire et du score ISTH
- Résultats de l'étude moléculaire (mutations identifiées)
- Rechercher une association avec le test de consommation de la prothrombine (évalué par le % de thrombine résiduelle après coagulation du plasma)

La recherche des associations précitées sera réalisée sur l'ensemble des patients inclus dans l'étude (Inclus en V0 ou en V1).

4.2. Population étudiée

Recrutement de la population

Nous recruterons les patients adressés aux consultations d'hémostase spécialisée des différents services associés au projet, pour exploration d'une symptomatologie hémorragique évoquant une anomalie de l'hémostase primaire. Les patients seront recrutés à l'occasion d'une consultation en vue de la recherche d'une thrombopathie ou lors de consultations de suivi dans le cadre de leur prise en charge habituelle.

Critères d'éligibilité (critères d'inclusion et de non inclusion)

Critères d'inclusion

- Patient adulte ou enfant ≥ 2 ans
- Ayant un score hémorragique ISTH >3 pour les hommes, >5 pour les femmes et >2 pour les enfants au moment de la Visite d'exploration (V0) ou au moment du diagnostic pour les patients chez lesquels une anomalie des granules denses aura été diagnostiquée lors d'une consultation préalable à cette étude.

Protocole « AGRAD », version 1.0 du 10/05/2019

- Ne présentant aucune anomalie de la coagulation ou du facteur willebrand (définie par une activité Cofacteur à la Ristocétine (VWF:RCo <50%)), de thrombopénie ou de thrombopathie majeure connue liée à un déficit de l'un des principaux récepteurs plaquettaires
- Information du patient et/ou de son représentant légal présent

Critères de non-inclusion

- Incapacité ou refus de compliance aux exigences de la recherche
- Thrombopénie <100 G/L
- Traitements interférant avec les fonctions plaquettaires dans les 10 jours précédents l'inclusion (Annexe 1)
- Hémopathie maligne

4.3. Déroulement de la recherche

Avant d'inclure les premiers patients dans l'étude, une **étape de comparaison des méthodes et d'harmonisation des procédures** entre les 9 laboratoires impliqués dans l'étude sera réalisée.

Les patients pourront être inclus :

- Lors de la visite d'exploration (V0) pour les patients consultant pour une recherche d'éventuelle thrombopathie
- Lors de la visite de confirmation/typage (V1) pour les patients chez lesquels une anomalie des granules denses aura été diagnostiquée mais non confirmée/typée lors d'une consultation préalable à cette étude, dans le cadre de la prise en charge de leurs manifestations hémorragiques.

Visite d'exploration (V0)

Cette visite correspond à la consultation d'hémostase spécialisée des patients visant à rechercher une éventuelle thrombopathie (après avoir exclu une éventuelle maladie de Willebrand ou un déficit en l'un des facteurs de la coagulation lors d'une consultation précédente).

La visite d'exploration est menée par l'un des médecins investigateurs listé en annexe du protocole (« Liste des investigateurs »). Au cours de cette visite, l'information sur la mise en place et les objectifs de la recherche sera donnée au patient ou à son représentant légal s'il s'agit d'un mineur (lecture et remise de la note d'information). Les critères d'éligibilité seront vérifiés.

Les patients et le cas échéant le(s) parent(s) (ou représentant légal) de l'enfant seront libres de refuser de participer au protocole de recherche ou d'interrompre leur participation en cours de protocole comme il est stipulé sur la note d'information, sans que cela ne leur porte préjudice. Les patients bénéficieront de leur prise en charge habituelle par leur médecin référent.

Si les patients ou les parents ne s'opposent pas à la recherche, les données recueillies dans le cadre de leur prise en charge habituelle seront utilisées pour la

recherche.

Examen clinique

L'examen clinique réalisé à cette consultation est **l'examen clinique habituel, il n'y a pas d'examen clinique ni d'examens d'imagerie supplémentaire prévus.**

Prélèvements réalisés au cours de la visite d'inclusion

L'ensemble des examens réalisés lors de la visite d'inclusion sont des **examens réalisés dans la prise en charge normale des patients suspects de thrombopathie. Aucun prélèvement supplémentaire ne sera fait. Cinq tubes citrate (3,5 ml) sont nécessaires à l'exploration des patients. Un tube EDTA sera également prélevé pour réaliser une NFS-plaquettes (2 ml) et un tube Z pour la consommation de la prothrombine (3,5ml). Volume total 23 ml.**

NB : Le volume maximal d'un prélèvement sanguin pour un enfant de 10kg (poids moyen à 2 ans) est de 20 ml. Dans tous les cas, le volume prélevé sera adapté au poids de l'enfant pour respecter l'arrêté du 17 Avril 2018 (JORFn°0089), et que le prélèvement n'excède pas 2,5% du volume sanguin total.

Acheminement et prise en charge des échantillons

Les échantillons collectés seront acheminés **selon les procédures habituelles** vers les laboratoires d'hématologie biologique des différents hôpitaux impliqués dans le projet :

- Hôpital Necker-Enfants Malades : UF d'Hématologie Biologique Générale (Pr D Borgel)
- Hôpital Rangueil: Laboratoire d'Hématologie, secteur d'Hémostase cardiovasculaire (Pr P Sié)
- Hôpital de la Timone : Laboratoire d'hématologie (Pr PE Morange)
- CHU de Bordeaux : Laboratoire d'hématologie de l'Hôpital Cardiologique du Haut-Lévêque (Pr C James)
- Hôpital Trousseau : Service d'Hématologie Biologique : unité d'hémostase (Dr R Favier)
- Hôpital Robert Debré : Service d'Hématologie Biologique, secteur hémostase (Dr MF Hurtaud)
- Hôpital Cardiologique Louis Pradel à Lyon : Service d'Hématologie Biologique, secteur hémostase, (Dr S Le Quellec)
- Laboratoire d'hémostase, Centre de Biologie Pathologie, CHU de Lille (Pr. S Susen)
- Établissement Français du Sang Grand Est, laboratoire d'hémostase spécialisée de l'EFS Grand EST (Dr A Dupuis, Dr C Gachet)

Ces laboratoires assureront le bilan biologique réalisé dans le cadre de la recherche étiologique de maladie hémorragique. Ils prépareront également les échantillons nécessaires à l'étude des granules denses en ME (envoi à Lyon pour les centres qui ne réalisent pas

localement la ME) et conserveront du plasma citraté congelé comme c'est fait normalement dans le cadre de la prise en charge de ces patients.

Paramètres de l'étude concernant la visite d'exploration (V0)

Agrégations plaquettaires en PRP

Agrégation plaquettaire sur PRP non ajusté (sauf si numération plaquettaire du PRP > 600 G/L) avec les agonistes suivants : ADP 5 µM puis 10 µM si anomalie ; AA 1mM ; TRAP14 10µM puis 25 µM si anomalie ; Epinéphrine 5 µM puis 25 µM si anomalie ; Collagène 0,8 à 2 µg/ml (en fonction de la source de collagène utilisée) puis 10 µg/mL si anomalie ; Ristocétine faible (0,5 à 0,7 mg/mL) et forte (1,2 à 1,5 mg/mL) concentration. Enregistrement 6 min.

CMF plaquettaires pour étudier les principaux récepteurs plaquettaires

Quantification de CD41a, CD42b (kit Biocytex), CD63 et CD62P avant et après activation au TRAP 50µM

Test à la mépacrine par cytométrie en flux et microscopie à fluorescence

Évaluation de l'incorporation de mépacrine par les granules denses plaquettaires et de sa libération après stimulation par de fortes doses de TRAP

Etude des granules denses plaquettaires par microscopie électronique Whole Mount

5 grilles seront préparées à partir du PRP du patient selon le protocole en annexe. Ces grilles seront envoyées à Lyon pour quantification des granules denses. Les centres de Toulouse et de Strasbourg qui ont localement accès à un microscope électronique réaliseront localement la lecture des grilles pour leurs patients.

Consommation de la prothrombine

Etude de la consommation de la prothrombine au cours de cette visite d'inclusion par mesure de la prothrombine résiduelle du sérum après prélèvement du sang dans un tube sec sans activateurs de l'hémostase (Tubes Z BD Vacutainer®).

Une anomalie des granules denses sera évoquée en cas de :

- Anomalie des profils d'agrégations plaquettaires avec l'un des agonistes suivants : TRAP et/ou ADP et/ou Collagène faible doses et/ou épinéphrine et/ou AA. Avec agrégation normale à la ristocétine 1,2 mg/mL
- et/ou diminution du nombre de granules denses en ME
- et/ou diminution de l'expression du CD63 après activation des plaquettes en CMF
- et/ou anomalie du test à la mépacrine

Visite de confirmation/typage (V1)

Cette seconde visite concerne :

- Les patients chez lesquels une anomalie des granules denses aura été diagnostiquée lors de la visite d'exploration (V0). Elle devra avoir lieu au plus tard 6 mois après la visite d'inclusion.
- Des patients chez lesquels une anomalie des granules denses aura été diagnostiquée mais non confirmée/typée lors d'une consultation préalable à cette étude, dans le cadre de la prise en charge de leurs manifestations hémorragiques. Ces patients seront alors inclus au cours de cette visite qui sera menée par l'un des médecins investigateurs. Au cours de cette visite, l'information sur la mise en place et les objectifs de la recherche sera donnée au patient ou à son représentant légal s'il s'agit d'un mineur (lecture et remise de la note d'information). Les critères d'éligibilité seront vérifiés. Les patients et le cas échéant le(s) parent(s) (ou représentant légal) de l'enfant seront libres de refuser de participer au protocole de recherche ou d'interrompre leur participation en cours de protocole comme il est stipulé sur la note d'information, sans que cela ne leur porte préjudice. Les patients bénéficieront de leur prise en charge habituelle par leur médecin référent. **Si les patients ou les parents ne s'opposent pas à la recherche, les données recueillies dans le cadre de leur prise en charge habituelle seront utilisées pour la recherche.**

Pour les 2 types de patients, les examens anormaux seront répétés pour confirmation au cours de cette nouvelle visite. D'autres, dont la variabilité est importante, seront réalisés une seconde fois au cours de cette visite, même en cas de résultat normal lors de la visite d'exploration. Dans tous les cas (confirmation ou non des anomalies ayant motivé la visite de confirmation), des examens complémentaires seront réalisés pour compléter le typage du déficit delta granulaire :

- Dosage de la sérotonine plaquettaire
- Dosage sérique du PAI1
- Agrégation avec quantification d'ATP en temps réel (Chrono-Log®) dans les centres équipés
- Dosage des nucléotides plaquettares totaux
- ME à balayage et faisceaux d'ions (FIB-SEM) pour quantification précise et reconstruction 3D des granules denses et des granules alpha. Cependant, compte tenu du temps nécessaire et de la complexité de réalisation de cette analyse, elle ne pourra être proposée que ponctuellement. Une évaluation est proposée par famille étudiée uniquement si le déficit quantitatif en granules denses est confirmé par Whole-mount

Si des formes familiales sont suspectées au cours de l'interrogatoire lors de l'une des 2 visites, une enquête familiale sera réalisée et de l'ADN conservé pour recherche d'anomalies moléculaires. Dans ce cas, les membres de la famille explorés dans le cadre de l'enquête familiale, seront inclus dans l'étude.

Prélèvements réalisés au cours de la 2ème visite

Les examens réalisés lors de cette seconde visite sont des **examens réalisés dans la prise en charge normale des patients suspects d'un déficit granulaire. Aucun prélèvement**

supplémentaire ne sera réalisé. Cinq tubes citrate (3,5 ml) et 1 tube sec (3,5 ml) sont nécessaires à l'exploration des patients. En cas de formes familiales, **un tube EDTA (2 ml)** sera également prélevé pour extraction d'ADN et **un tube ACD (7,5 ml)** pour l'étude des granules par la technique Fib-SEM.

NB : Dans tous les cas, le volume prélevé sera adapté au poids de l'enfant pour respecter l'arrêté du 17 Avril 2018 (JORFn°0089) et que le prélèvement n'excède pas 2,5% du volume sanguin total

Acheminement et prise en charge des échantillons

Les échantillons collectés seront acheminés vers les Hôpitaux impliqués dans le projet (cf ci-dessus) pour réalisation des examens faits sur chacun des sites. Ces mêmes laboratoires prépareront et conserveront le matériel nécessaire aux examens faits de façon centralisée avant envoi vers Marseille pour les dosages de PAI-1 et de sérotonine, vers Lyon pour la lecture des grilles de ME Fib-SEM et vers Strasbourg pour le Fib-SEM et pour la quantification des nucléotides totaux plaquettaires et évaluation du rapport ATP/ADP.

Le tube EDTA prélevé dans le cadre d'une enquête familiale sera congelé et envoyé, avec le consentement recueilli dans le cadre de la prise en charge normale du patient, à Marseille pour extraction de l'ADN et analyse moléculaire.

Paramètres d'étude concernant les analyses réalisées lors de la seconde visite

Certains examens dont la variabilité est importante ou inconnue et réalisés au cours de la visite d'inclusion seront systématiquement répétés lors de cette seconde visite, quelque soient les premiers résultats obtenus :

- Les agrégations plaquettaires en PRP (cf ci-dessus)
- L'étude en Microscopie électronique Whole Mount
- Le test à la mépacrine

D'autres seront répétés uniquement en cas d'anomalie :

- Quantification de CD41a, CD42b (kit Biocytex), CD63 et CD62P avant et après activation au TRAP 50µM
- Consommation de la prothrombine

Enfin des examens complémentaires seront réalisés :

Etude des granules denses plaquettaires par microscopie électronique Fib-SEM.

En cas de déficit en granules denses plaquettaires confirmé en whole-mount, une étude en FIB-SEM sera proposée chez un seul patient par famille étudiée. Pour cela 1 mL de plaquettes lavées ($3 \cdot 10^5$ plaquettes/µL), préparé à partir de sang prélevé sur tube ACD sera envoyé à l'EFS-Grand Est de Strasbourg

Dosage du PAI-1 sérique

Le dosage sera réalisé par technique ELISA (Asserachrom PAI-1, Stago) sur du sérum congelé après 1 heure d'incubation à 37°C

Dosage de la sérotonine plaquettaire

Le dosage est effectué à partir d'échantillons de PRP préalablement numérisés et congelés en aliquotes de 500 µl. Les échantillons seront centralisés au laboratoire d'hématologie de la TIMONE et adressés à la fédération de pharmacologie du CHU Timone (Pr O Blin) pour dosage par HPLC.

Quantification de la sécrétion d'ATP

Une quantification de la sécrétion d'ATP sur PRP par bioluminescence à l'aide d'un agrégomètre de type Chrono-Log® sera effectuée après activation des plaquettes par le TRAP à 10 et 50 µM dans les laboratoires équipés avec ce type d'appareil.

Dosages des nucléotides plaquettaires totaux.

1 mL de PRPc préalablement numérisé est précipité en présence d'acide perchlorique concentré puis congelé à -80°C. Les échantillons seront acheminés au laboratoire d'hémostase spécialisée de l'EFS Grand Est ou ils seront dosés en HPLC après extraction des nucléotides.

Étude d'un panel de gènes responsables d'anomalies des granules denses

Un criblage mutationnel par séquençage à haut débit sera réalisé sur un large ensemble de gènes impliqués dans le fonctionnement plaquettaire. La technologie utilisée correspond à un enrichissement par capture de séquence SeqCapEZ NimbleGen (Roche Diagnostics) suivi d'un séquençage sur plateforme Illumina NextSeq500.

L'analyse bioinformatique est réalisée à l'aide des logiciels BWA-MEM (Alignement sur la version du génome HG19); GATK v3.3.0: Variant calling; VarAFT (www.varaft.eu): annotation ANNOVAR (Wang et al. 2010) et UMD-Predictor ; filtrage des données sur gènes d'intérêt ; établissement du rapport de couverture de séquençage ; nomenclature mutationnelle : nomenclature HGVS (www.hgvs.org/mutnomen).

L'interprétation des données mutationnelles est effectuée après application de filtres d'analyse permettant de sélectionner les variants de séquence identifiés selon les critères suivants :

- Localisation des variants en région codante ou au niveau des jonctions exons/introns ;
- Variants de séquence dont la fréquence est $\leq 0.01\%$ dans les bases de données ExAC, (Exome Aggregation Consortium (ExAC), Cambridge, MA, <http://exac.broadinstitute.org>; 1000G : <http://browser.1000genomes.org>; KAVIAR: <http://db.systemsbio.net/kaviar>; gnomAD : [<http://gnomad.broadinstitute.org/>]<http://gnomad.broadinstitute.org/>). Ce filtre permet de ne sélectionner que les variants rares, pouvant donc être responsables de pathologies rares.
- Variants n'étant pas prédits comme des polymorphismes ou des variations bénignes par UMD Predictor (algorithme implémenté dans VarAFT) ;
- Le promoteur du gène ANKRD26 est analysé à part en filtrant sur le nom du gène et la région 5'UTR.

La recherche de délétion/duplication est réalisée à partir des données de couverture des exons codants, par comparaison des ratios de couverture de chaque exon à la moyenne de tous les exons au sein de chaque pool de séquence. Le seuil de suspicion de délétion est fixé à un ratio $<0,7$; le seuil pour les duplications est fixé à un ratio $> 1,3$. Une délétion ou une duplication sont avérées si elles ne sont pas retrouvées chez plusieurs patients isolés au sein d'un même pool, et qu'elles impliquent plusieurs exons d'un même gène. Dans le cas d'un seul exon impliqué, une seconde méthode de détection est nécessaire.

Tableau récapitulatif des visites

	Visite d'exploration (V0)	Visite confirmation/typage (V1)
Information du patient et recueil de la non opposition	X (patients inclus en V0)	X (patients inclus en V1)
Examen clinique et Score hémorragique	X	
Consommation de la prothrombine	X	X (si anormal au diagnostic)
Agrégations plaquettaires	X	X
CMF CD41a, CD42b \pm TRAP	X	X (si anormal au diagnostic)
CD62P et CD63 \pm TRAP	X	X (si anormal au diagnostic)
Mépacrine	X	X
ME Whole Mount	X	X
ME Fib-SEM (si Whole Mount anormal)		X (cas familiaux)
PAI-1 sérique		X
Sérotonine plaquettaire		X
Sécrétion d'ATP sur PRP Chrono-Log®		X
Nucléotides plaquettaires totaux et rapport ATP/ADP		X
Étude Panel Gène		X (cas familiaux)

Tableau distinction soin - recherche pour tous les examens, procédures, traitements réalisés pendant le temps de la recherche

Interventions réalisées dans le cadre de la recherche	Actes, procédures et traitements liés aux <u>soins</u>	Actes, procédures ajoutés par <u>la recherche</u>
Consultations	consultation d'hémostase spécialisée des patients visant à rechercher une éventuelle thrombopathie puis visite de confirmation à 6 mois	

Prises de sang	prise en charge normale des patients suspects de thrombopathie	
Recueil des données		Recueil des données pour la recherche

4.4. Durée de la recherche

Durée de la période d'inclusion : 2 ans

Durée de participation de chaque patient : la participation des patients consiste en 1 ou 2 visites à une fréquence identique à celle du suivi pour le syndrome hémorragique (soin courant) : (1) visite d'exploration (V0) lors de l'étude, en seconde intention, de l'hémostase primaire, (2) visite de confirmation/typage (V1) pour les sujets chez lesquels une anomalie serait détectée par l'un des tests faisant l'objet de la recherche lors de la V0 (et dans ce cas cette visite V1 sera faite dans un délai maximum de 6 mois après la V0) ou dans le cadre d'un diagnostic d'anomalie des granules denses non confirmé/typé préalable à la présente étude.

Durée totale de la recherche : 2,5 ans

5. RISQUES ET VIGILANCE

Les recherches non interventionnelles impliquant la personne humaine ne présentent aucun risque pour les patients.

Les effets indésirables constatés chez les patients participants à la recherche sont notifiés par les investigateurs selon les plans locaux de vigilance mis en place dans le cadre des activités de soin.

6. ASPECTS STATISTIQUES

6.1. Justification statistique de la taille de l'échantillon

La prévalence de chaque type d'anomalies des granules denses n'étant pas connue et faisant l'objet de ce travail, il nous est impossible de définir statistiquement le nombre de patients à inclure.

Sur la base du recrutement des différents centres, nous prévoyons d'inclure 400 patients.

6.2. Description des méthodes statistiques

L'analyse statistique sera réalisée sous la responsabilité de Louisa GOUMIDI (Ingénieur de Recherche INSERM, louisa.goumidi@ap-hm.fr), dans l'unité INSERM 1263 dirigée par le Pr MC Alessi responsable scientifique de l'étude.

L'analyse des données sera réalisée à l'aide du logiciel SAS. L'ensemble des variables du questionnaire de l'étude sera analysé. Les données manquantes seront signalées.

Concernant l'objectif principal de l'étude

Le calcul de prévalence sera réalisé uniquement sur les patients nouvellement diagnostiqués (inclus en Visite V0). Nous calculerons la prévalence des patients ayant un déficit en granules denses par rapport à l'ensemble des patients ayant une symptomatologie hémorragique inclus en V0 dans l'étude. La prévalence de chaque type d'anomalie des granules denses sera calculée de la même manière.

Concernant les objectifs secondaires

La recherche des associations faisant l'objet des objectifs secondaires sera réalisée sur l'ensemble des patients inclus dans l'étude (Inclus en V0 ou en V1).

1- Comparaison des patients avec ou sans anomalies des granules denses.

Il s'agira de comparer les patients ayant des granules denses versus les patients sans granules denses dans le cadre d'une analyse bivariée et multivariée.

Les distributions du score hémorragique, de la nature des saignements, des fréquences des saignements entre ces deux groupes seront comparés selon le test du Chi-2 ou le test exact de Fisher si ce premier ne s'appliquait pas.

Les taux de prothrombine résiduelle (test de consommation de la prothrombine) entre ces 2 groupes seront comparés selon le t de student.

De même, les agrégations plaquettaires ; les dosages des nucléotides plaquettaires totaux et les tests de microscopies électroniques seront comparés entre les deux groupes.

Un modèle multivarié sera utilisé pour tenir compte des facteurs de confusion (centre..) et aussi pour chercher à expliquer l'apparition d'un déficit en granules denses chez les patients hémorragiques.

2- Comparaison des différents types de granules denses chez les patients présentant des granules denses.

Une comparaison du score hémorragique, de la nature des saignements, des fréquences des saignements sera testée entre les trois types de granules denses selon le test du Chi-2 ou le test exact de Fisher si ce premier ne s'appliquait pas.

Les taux de prothrombine résiduelle (=test de consommation de la prothrombine) entre les 3 types de déficit seront comparés par analyse de variance ou par tests de Kruskal-Wallis si ce dernier ne s'appliquait pas.

Les comparaisons inter types des agrégations plaquettaires; des dosages des nucléotides plaquettaires totaux et des tests de microscopies électroniques seront également réalisées.

REGLES D'ARRET

Critères et modalités d'arrêt prématuré de la participation à la recherche d'un sujet

- Conformément à l'information faite au patient ou à ses parents, à tout moment tout sujet peut arrêter sa participation à la recherche, à n'importe quel moment et quelle qu'en soit la raison, sans aucune conséquence sur sa prise en charge
- En cas d'arrêt prématuré de la participation du sujet à la recherche, les données le concernant et recueillies avant la date de sortie de l'étude pourront être utilisées.

Modalités de remplacement de ces personnes, le cas échéant

Les sujets ayant arrêté prématurément leur participation à la recherche seront remplacés si nous avons la possibilité de le faire, en revanche ils ne seront pas exclus de l'analyse.

Arrêt d'une partie ou de la totalité de la recherche :

Le promoteur AP-HP se réserve le droit de suspendre définitivement les inclusions, à tout moment, s'il s'avère que les objectifs d'inclusion ne sont pas atteints.

En cas d'arrêt de la recherche, aucun suivi de patient n'est prévu car la recherche n'aura eu aucun impact sur la santé ou la prise en charge médicale du patient.

7. GESTION DES DONNEES

7.1. Modalités de recueil des données

Un cahier d'observation électronique (eCRF) sera complété par l'investigateur pour recueillir les résultats des analyses réalisées sur les granules denses.

7.2. Circuit des données

L'investigateur complète le eCRF avec les données imprimées si besoin, anonymise les données du patient et les saisit sur la base de données informatique.

7.3. Droits d'accès aux données des sujets et documents sources

Conformément aux BPC :

- le promoteur est chargé d'obtenir l'accord de l'ensemble des parties impliquées dans la recherche afin de garantir l'accès direct à tous les lieux de déroulement de la recherche, aux données source, aux documents source et aux rapports dans un but de contrôle de qualité et d'audit par le promoteur,
- les investigateurs mettront à disposition des personnes chargées du suivi, du contrôle de qualité, en cas d'audit de la recherche impliquant la personne humaine, les documents et données individuelles strictement nécessaires à ce contrôle, conformément aux dispositions législatives et réglementaires en vigueur

Documents source :

Les documents source étant définis comme tout document ou objet original permettant de prouver l'existence ou l'exactitude d'une donnée ou d'un fait enregistré au cours de la recherche seront conservés pendant 15 ans par l'investigateur ou par l'hôpital s'il s'agit d'un dossier médical hospitalier.

7.4. Conservation des documents et des données

Les documents et données de la recherche seront conservés pendant 15 ans après la publication.

8. CONTROLE DE LA QUALITE

8.1. Qualification des intervenants

L'investigateur coordonnateur, la personne qualifiée ou le responsable scientifique s'assure que les intervenants de la recherche sont qualifiés pour les tâches qui leur incombent.

8.2. Qualité des données

Le contrôle de la qualité des données dans les cahiers d'observation lors des analyses statistiques consiste à vérifier que les données sont complètes, cohérentes et plausibles. En cas d'anomalie, il sera demandé à l'investigateur de corriger. Si une vérification est nécessaire dans un document-source, elle ne pourra être effectuée que par un membre de l'équipe médicale encadrant le sujet.

Seules les initiales du nom et du prénom seront enregistrées, accompagnées d'un numéro codé propre à la recherche.

Par ailleurs, la vérification des données source par une personne indépendante de l'équipe médicale encadrant le sujet, est soumise à une information préalable des sujets et au recueil de leur non-opposition. Les notes d'information correspondantes seront conservées par le responsable de l'équipe médicale encadrant les sujets pour une durée de 15 ans.

Les personnes chargées du contrôle de qualité d'une recherche impliquant la personne humaine (article L.1121-3 du code de la santé publique), prendront toutes les précautions nécessaires en vue d'assurer la confidentialité des informations relatives à la recherche, aux personnes qui s'y prêtent et notamment en ce qui concerne leur identité ainsi qu'aux résultats obtenus.

Ces personnes, au même titre que les investigateurs eux-mêmes, sont soumises au secret professionnel (selon les conditions définies par les articles 226-13 et 226-14 du code pénal). Pendant la recherche impliquant la personne humaine ou à son issue, les données recueillies sur les personnes qui s'y prêtent et transmises au promoteur par les investigateurs (ou tous autres intervenants spécialisés) seront rendues non identifiantes. Elles ne doivent en aucun cas faire apparaître en clair les noms des personnes concernées ni leur adresse.

9. ASPECTS ETHIQUES ET LEGAUX

9.1. Rôle du promoteur

L'Assistance Publique des Hôpitaux de Paris est le promoteur de cette recherche et par délégation le Délégation à la Recherche Clinique et à l'Innovation (DRCI) en assure les missions, conformément à l'article L.1121-1 du code de la santé publique. L'Assistance Publique - Hôpitaux de Paris se réserve le droit d'interrompre la recherche à tout moment pour des raisons administratives.

9.2. Modalités d'information des sujets

Conformément à l'article L1121-1-1 du Code de la Santé Publique, aucune recherche non interventionnelle ne peut être pratiquée sur une personne lorsqu'elle s'y est opposée après que lui a été délivré une information prévue à l'article L11222-1 du même code.

L'information donnée au sujet ou à un des deux titulaires de l'autorité parentale sera notifiée dans son dossier médical.

Une copie du document d'information est remise à la personne préalablement à sa participation à la recherche.

Le recueil de la non-opposition du sujet sera notifié dans son dossier médical par l'investigateur ou la personne qualifiée qui la recueille.

9.3. Demande d'avis au Comité de Protection des Personnes

L'AP-HP en tant que promoteur obtient pour la recherche répondant à la définition du 3° de l'article L.1121-1 du Code de la Santé Publique, préalablement à sa mise en œuvre l'avis favorable du CPP concerné, dans le cadre de ses compétences et conformément aux dispositions législatives et réglementaires en vigueur.

9.4. Information de l'ANSM

Le promoteur AP-HP transmettra, pour information à l'ANSM, l'avis favorable du CPP et le résumé du protocole.

9.5. Traitement des données à caractère personnel

Le fichier informatique utilisé pour cette recherche est mis en œuvre conformément à la réglementation française (loi Informatique et Libertés modifiée) et européenne (Règlement Général sur la Protection des Données –RGPD).

Engagement de conformité à la méthodologie de référence MR-003

Cette recherche entre dans le cadre de la « Méthodologie de Référence pour les traitements de données à caractère personnel mis en œuvre dans le cadre des recherches dans le domaine de la santé ne nécessitant pas le recueil du consentement de la personne concernée » (MR-003). L'AP-HP, promoteur de la recherche, a signé un engagement de conformité à cette « Méthodologie de Référence ».

9.6. Modification de la recherche

Toute modification substantielle apportée au protocole, devra être transmise au promoteur pour approbation. Après cet accord, le promoteur devra obtenir préalablement à sa mise en œuvre un avis favorable du CPP

La note d'information et les modalités de recueil de la non-opposition pourront être révisés si nécessaire, notamment en cas de modification substantielle.

9.7. Responsabilités de l'investigateur vis-à-vis du promoteur

L'investigateur coordonnateur ou la personne qualifiée s'engage à fournir au promoteur les informations relatives aux inclusions des sujets dans la recherche.

L'Assistance Publique - Hôpitaux de Paris se réserve le droit d'interrompre la recherche à tout moment pour des raisons administratives.

9.8. Rapport final de la recherche

Le rapport final de la recherche impliquant la personne humaine mentionné à l'article R1123-67 du CSP est établi et signé par le promoteur et l'investigateur

9.9. Archivage

Les documents spécifiques d'une recherche non interventionnelle impliquant la personne humaine seront archivés par l'investigateur et le promoteur pour une durée de 15 ans après la fin de la recherche.

Cet archivage indexé comporte notamment :

- Les classeurs « recherche » pour l'Investigateur et le promoteur comprenant (liste non exhaustive):
 - les versions successives du protocole (identifiées par le n° et la date de version), ses annexes
 - les avis du CPP
 - les courriers de correspondance,
 - la liste ou registre d'inclusion,
 - les annexes spécifiques à la recherche
 - le rapport final de la recherche.
- Les documents de recueil des données.

Une enveloppe scellée pour l'investigateur contenant un exemplaire des notes d'information comprenant le recueil de la non-opposition

10. REGLES RELATIVES A LA PUBLICATION

L'AP-HP, en tant que promoteur, est propriétaire des données et aucune utilisation ou transmission à un tiers ne peut être effectuée sans son accord préalable.

Seront premiers signataires des publications, les personnes ayant réellement participé à l'élaboration du protocole et son déroulement ainsi qu'à la rédaction des résultats.

L'Assistance Publique- Hôpitaux de Paris doit être mentionnée comme étant le promoteur de la recherche et les termes « Assistance Publique- Hôpitaux de Paris » doivent apparaître dans l'adresse des auteurs.

11. BIBLIOGRAPHIE

1. Gresele P, Harrison P, Bury L, et al. Diagnosis of suspected inherited platelet function disorders: results of a worldwide survey. *J Thromb Haemost JTH* 2014; 12: 1562–9.
2. Quiroga T, Goycoolea M, Panes O, et al. High prevalence of bleeders of unknown cause among patients with inherited mucocutaneous bleeding. A prospective study of 280 patients and 299 controls. *Haematologica* 2007; 92: 357–65.
3. Fiore M, Garcia C, Sié P, et al. δ -storage pool disease: an underestimated cause of unexplained bleeding. *Hématologie* 2017-8; 243–254.
4. Gresele P, the Subcommittee on Platelet Physiology. Diagnosis of inherited platelet function disorders: guidance from the SSC of the ISTH. *J Thromb Haemost* 2015; 13: 314–22.
5. Mumford AD, Frelinger AL, Gachet C, et al. A review of platelet secretion assays for the diagnosis of inherited platelet secretion disorders. *Thromb Haemost* 2015; 114: 14–25.
6. Rosa J-P. The gray platelet syndrome. *Hématologie* 2013-4; 123–135.
7. Bolton-Maggs PHB, Chalmers EA, Collins PW, et al. A review of inherited platelet disorders with guidelines for their management on behalf of the UKHCDO. *Br J Haematol* 2006; 135: 603–33.
8. Simon D, Kunicki T, Nugent D. Platelet function defects. *Haemoph Off J World Fed Hemoph* 2008; 14: 1240–9.
9. Nieuwenhuis HK, Akkerman JW, Sixma JJ. Patients with a prolonged bleeding time and normal aggregation tests may have storage pool deficiency: studies on one hundred six patients. *Blood* 1987; 70: 620–3.
10. Stockley J, Morgan NV, Bem D, et al. Enrichment of FLI1 and RUNX1 mutations in families with excessive bleeding and platelet dense granule secretion defects. *Blood* 2013; 122: 4090–3.
11. Hayward CPM, Pai M, Liu Y, et al. Diagnostic utility of light transmission platelet aggregometry: results from a prospective study of individuals referred for bleeding disorder assessments. *J Thromb Haemost JTH* 2009; 7: 676–84.
12. Selle F, James C, Tuffigo M, et al. Clinical and Laboratory Findings in Patients with δ -Storage Pool Disease: A Case Series. *Semin Thromb Hemost* 2017; 43: 48–58.
13. White JG. Electron-dense chains and clusters in platelets from patients with storage pool-deficiency disorders. *J Thromb Haemost JTH* 2003; 1: 74–9.
14. Cai H, Mullier F, Frotscher B, et al. Usefulness of Flow Cytometric Mepacrine Uptake/Release Combined with CD63 Assay in Diagnosis of Patients with Suspected Platelet Dense Granule Disorder. *Semin Thromb Hemost* 2016; 42: 282–91.
15. Hayward CPM, Harrison P, Cattaneo M, et al. Platelet function analyzer (PFA)-100 closure time in the evaluation of platelet disorders and platelet function. *J Thromb Haemost JTH* 2006; 4: 312–9.
16. Satta N, Toti F, Fressinaud E, et al. Scott syndrome: an inherited defect of the procoagulant activity of platelets. *Platelets* 1997; 8: 117–24.

12. ADDENDA

12.1. Liste des Investigateurs

Coordonnées du lieu de recherche	Titre	Prénom Nom	Téléphone / e-mail / Fax
UF d'Hématologie Biologique Générale, Hôpital Necker-Enfants Malades, Paris	Pr	Delphine Borgel	0171196091 delphine.borgel@aphp.fr /0144495120
Service d'Hématologie clinique, Hôpital Necker-Enfants Malades, Paris	Dr	Annie Harroche	0144495275 annie.harroche@aphp.fr 0144495756
Service d'Hématologie clinique, Hôpital de la Timone, Marseille	Pr	Marie Christine Alessi	0491324506 marie-christine.alessi@univ-amu.fr
Service d'Hématologie clinique, Hôpital de Bordeaux, Bordeaux	Pr	Mathieu Fiore	0557656778 mathieu.fiore@chu-bordeaux.fr 0557656845
Service d'Hématologie clinique, Hôpital de Rangueil, Toulouse	Dr	Sophie Voisin	0561323093 voison.s@chu-toulouse.fr 0561322233
Services d'Hématologie clinique et d'Anesthésie, Hôpital Trousseau, Paris	Dr	Rémi Favier	0144736723 remi.favier@aphp.fr 0144736333
Service d'Hématologie clinique, Hôpital Robert Debré, Paris	Dr	Marie-Françoise Hurtaud	0140035786 marie-francoise.hurtaud@aphp.fr 0140034795
Service d'Hématologie clinique, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg	Dr	Arnaud Dupuis	0388212506 arnaud.dupuis@efs.sante.fr 0388212514
Service d'Hémostase et transfusion, CHU de Lille	Pr	Annabelle Dupont	0320446989 annabelle.dupont@chru-lille.fr 0320444783

12.2. Liste des Annexes

Liste des Annexes

Annexe 1 : Liste des médicaments interférant sur les fonctions plaquettaires

Annexe 2 : Protocole de préparation des grilles pour la microscopie électronique Whole Mount

Annexe 3 : Protocole de préparation des échantillons plaquettaire pour la quantification du contenu en ADP/ATP plaquettaire

Annexe 3 : Protocole de préparation des échantillons plaquettaire pour la quantification du contenu en ADP/ATP plaquettaire

Annexe 4 : Test de consommation de la prothrombine ou Mesure de la prothrombine résiduelle

Liste des médicaments interférant avec les fonctions plaquettaires (Annexe 1)

Classe pharmacologique	DCI	Nom de spécialité
AINS et dérivés	Acide méfanique	PONSTYL [®]
	Acide tiaprofénique	AC.TIAPROFENIQUE [®] FLANID [®] SURGAM [®]
	Alminoprofène	MINALFENE [®]
	Diclofenac	ARTOTEC [®] FLECTOR [®] VOLTARENE [®]
	Etodolac	LODINE [®]
	Fénamates	NIFLURIL [®]
	Fénoprofène	NALGESIC [®]
	Flurbiprofène	ANTADYS [®] CEBUTID [®] STREFEN [®]
	Ibuprofène	ADVIL [®] ANTARENE [®] BRUFEN [®] HEMAGENE [®] IBUPROFENE [®] INTRALGIS [®] NUREFLEX [®] NUROFEN [®] PEDEA [®] SPEDIFEN [®] SPIFEN [®] UPFEN [®]
	Indométacine	CHRONO-INDOCID [®] INDOCID [®] INDO-PAED [®]
	Ketoprofène	BI-PROFENID [®] ENANTYUM [®] KETESSE [®] KETOPROFENE [®] KETUM [®] PROFEMIGR [®] PROFENID [®] TOPREC [®]
	Meloxicam	MELOXICAM [®] MOBIC [®]
	Naproxène	ALVETABS [®] ANTALNOX [®] APRANAX [®] NAPROSYNE [®]
	Piroxicam	BREXIN [®] CYCLADOL [®] FELDENE [®] PIROXICAM [®] ZOFORA [®]
Tenoxicam	TILCOTIL [®]	
Classe pharmacologique	DCI	Nom de spécialité

Antiagrégants plaquettaires	Ticlopidine	TICLID [®]
	Dipyridamole	CLERIDIUM [®] PERSANTINE [®]
	Clopidogrel+ac acétylsalicylique	DUOPLAVIN [®]
	Prasugrel	EFIENT [®]
	Ticagrelor	BRILIQUE [®]
	Clopidogrel	PLAVIX [®]
	Dipyridamole+ac acétylsalicylique	ASASANTINE [®]
	Abciximab	REOPRO [®]
	Iloprost	ILOMEDINE [®]
	Eptifibatide	INTEGRILIN [®]
	Tirofiban	AGRASTAT [®]
Salicylés	Acide acétylsalicylique	ACTRON [®] ALKA-SELTZER [®] ASPEGIC [®] ASPIRINE [®] ASPIRINE pH 8 [®] ASPRO [®] CEPHYL [®] EXCEDRINIL [®] HUVANOF [®] KARDEGIC [®] METASPIRINE [®] MIGPRIV [®] MOXIDIS [®] NOVACETOL [®] SEDASPIR [®]
IRSS	Escitalopram	SEROPLEX [®]
	Citalopram	SEROPRAM [®]
	Fluoxétine	PROZAC [®]
	Fluvoxamine	FLOXYFRAL [®]
	Paroxétine	DEROXAT [®] DIVARIUS [®]
	Sertraline	ZOLOFT [®]

Protocole de préparation des grilles pour la microscopie électronique Whole Mount (Annexe 2)

Matériel:

- Parafilm
- Kimwipes
- Pince à pointes ultra fines (droite ou courbée)
- Grilles Formvar FF 200 ou 300 Cuivre (Cu) (Electron Microscopy Sciences, fournisseur Euromedex)

Méthode:

Préparer du PRP à partir du tube citrate (ou CTAD)

Puis laisser le PRP reposer 20 min à 37°C (pour que les plaquettes reprennent leur forme initiale)

Prévoir de faire 3 grilles FF-200-Cu et 3 grilles FF-300-Cu par patient

Déposer 10 gouttes de 50µl sur un parafilm, et 10 gouttes d'eau stérile juste en dessous.

Déposer alors les grilles (5 FF-200-Cu et 5 FF-300-Cu) sur chacune des gouttes de PRP, **côté brillant sur la goutte de PRP**

Laisser flotter sur la goutte de PRP 1 à 5 minutes

Les rincer brièvement dans une goutte d'eau (1 ou 3 sec),

Et éliminer très rapidement l'eau en excès sur la tranche (à 90° de la tranche) sur un kimwipe (ou kleenex fin)

Sécher à l'air 1 minute en agitant doucement

Attention de ne pas tordre les grilles

Envoi des échantillons : envoyer les grilles dans un délai de 1 à 5 jours si possible, dans une boîte semblable à celle d'origine (alvéoles en losange) en ayant scotché le couvercle, l'ensemble en sachet hermétique, à température ambiante, par envoi postal simple à l'adresse suivante :

Jean Claude Bordet – Sandra Le Quellec

Hospices civils de Lyon
Groupement Hospitalier Est
Laboratoire d'Hématologie
CBE Bâtiment A3 Etage 4-005
59 Bd Pinel
69677 BRON cedex
Tel: 04 27 85 65 84

Procédure technique de fixation des plaquettes pour Microscopie Électronique FIB - SEM (Annexe 3)

Réactifs nécessaires

- Tampon phosphate pH 7,2 (=PBS, à garder, aliquoté à -20°C)
- **Glutaraldéhyde à 25 %** (Réf16220 Electron Microscopy Sciences), à garder au réfrigérateur 4°C

Mode opératoire

- Préparer le PRP à partir du tube CTAD. Avant de fixer, **laisser la préparation de PRP 20 min à 37°C**
- Préparation du mélange fixateur : Glutaraldéhyde 1,25% en tampon phosphate 9.5 mL PBS + 0.5 ml de glutaraldéhyde 25%, à **pré-incuber à 37°C** au BM avant l'ajout du PRP
- Fixation des plaquettes :

Prélever 1 ml de PRP (même au plus proche de la couche du buffy coat)

Ajouter 9 ml de mélange fixateur

Laisser fixer 1 heure à température ambiante

Puis centrifuger 8 min à 1900 g 20°C

Enlever le surnageant

Laver les plaquettes dans 4 mL de PBS en petit tube polystyrène fond conique 4 mL (attention, les plaquettes adhèrent aux parois de la partie conique...à bien récupérer)

Puis centrifuger 8 min à 1900 g 20°C

Enlever le surnageant

Préparation pour transport des échantillons

- Reprendre le culot dans 1.4 mL PBS contenant 0.2% de glutaraldéhyde (2mL PBS + 16 µL de glutaraldéhyde 25%)

Transférer dans un tube type Eppendorf 1.5 (pour éviter que les paquettes ne se collent sur une surface importante des parois de tubes grand volume ; bien sceller le couvercle avec du parafilm)

Envoyer les **échantillons** à :

MICHEL Anita

EFS-Grand Est

Laboratoire d'hémostase spécialisée

10, rue Spielmann

67065 STRASBOURG Cedex

Tel : 03.88.21.25.26 (poste 6464 ou 6313)

Protocole de préparation des échantillons pour la quantification du contenu en ADP/ATP plaquettaire (Annexe 4)

Matériel : Tubes eppendorf 1.5mL (Ref 72.690.001, Sarstedt)

Tubes 2mL (Ref 0030 120.094, Eppendorf)

Micro pipettes P1000 et P200 et pointes

Vortex

Centrifugeuse pour microtubes

Acide perchlorique 6N

Mode opératoire :

Faire une Numération sur le PRPc.

Répartir 2*450µL en tube Eppendorf de 1.5mL (pour chaque exploration).

Ajouter 50µL d'Acide perchlorique 6N sur chaque échantillon.

Vortexer et incuber 10min sur glace.

Centrifuger 5min à 13 000trs/min à +4°C.

Pipeter le surnageant et le transvaser dans un tube de 2mL (annoté avec la date du jour, NOM et prénom).

Congeler les échantillons à -80°C.

Envoyer les **échantillons congelés** et la **numération plaquettaire** à :

DUPUIS Arnaud

EFS-Grand Est

Laboratoire d'hémostase spécialisée

10, rue Spielmann

67065 STRASBOURG Cedex

Tel : 03.88.21.25.26 (poste 6464 ou 6313)

Test de Consommation de la Prothrombine (FII) ou mesure de la prothrombine résiduelle sérique (Annexe 4)

Prélèvement de l'échantillon

Prélèvement sur **tube Z** (BD Vacutainer®)

Préparation du sérum à tester

Placer le tube pendant 4 heures à 37 °C au bain-marie

Centrifuger les tubes (mêmes conditions que pour les tubes citrate en hémostase)

Recueillir le sérum du patient

Recitrater le sérum à raison d'un volume de citrate trisodique pour 4 volumes de sérum

0,1 ml de citrate trisodique (Citrates Trisodiques 0,109 M des tubes BD)

0,4 ml de sérum

Dosage

Doser le FII résiduel dans le sérum recitraté

Valeur usuelle

Facteur II résiduel sérique < 10 %