

**ETUDE DE LA FONCTIONNALITE DES NOUVEAUX VARIANTS GENETIQUES A L'ORIGINE
DES PATHOLOGIES PLAQUETTAIRES CONSTITUTIONNELLES (EVGPP)**

Code promoteur : RCAPHM19_0161 - EVGPP

Recherche Interventionnelle avec Risques et Contraintes Minimales

Promoteur :

Assistance publique - Hôpitaux de Marseille (AP-HM)
264, Rue Saint-Pierre. 13385 Marseille Cedex 5

Investigatrice principale : Pr. Marie-Christine Alessi

Service d'Hématologie Biologique & Centre de Référence des Pathologies Plaquettaires (CRPP)
CHU de Marseille - Hôpital de la Timone. 264, Rue Saint-Pierre. 13385 Marseille Cedex 5

Et

Centre recherche en CardioVasculaire et Nutrition (C2VN) - INSERM 1062, Faculté de Médecine
de la Timone.

27, Boulevard Jean Moulin. 13005 Marseille
marie-christine.alessi@univ-amu.fr

SOMMAIRE

1	RESUME DE LA RECHERCHE	2
2	JUSTIFICATION SCIENTIFIQUE ET DESCRIPTION GENERALE.....	7
3	L’OBJECTIF DE L’ETUDE	8
4	CONCEPTION DE LA RECHERCHE	9
4.1	SCHEMA DE LA RECHERCHE.....	9
4.2	CRITERES D’ELIGIBILITE	9
4.3	DEROULEMENT DE L’ETUDE	10
4.4	VISITE DE FIN DE RECHERCHE.....	12
4.5	ABANDON ET RETRAIT DE CONSENTEMENT	12
4.6	REGLES D’ARRET DE LA RECHERCHE	13
4.7	DEVIATION AU PROTOCOLE.....	13
4.8	CIRCUIT DES ECHANTILLONS BIOLOGIQUES.....	13
4.9	DUREE ET MODALITE D’ORGANISATION DE LA RECHERCHE.....	15
5	TRAITEMENT DES DONNEES ET ASPECTS STATISTIQUES	15
5.1	NOMBRE DE SUJETS	15
5.2	RECUEIL DES DONNEES	15
5.3	ANALYSE DE L’EXPLORATION PLAQUETTAIRE.....	16
5.4	ANALYSE DU SEQUENÇAGE D’EXONS.....	16
6	CONTROLE QUALITE	16
6.1	AUDIT ET INSPECTION.....	17
7	SURVEILLANCE DE LA RECHERCHE	17
8	DROITS D’ACCES AUX DONNEES	18
8.1	DONNEES SOURCES.....	18
8.2	DONNEES D’EXPLORATION	18
8.3	ACCES AUX DONNEES	18
8.4	CONFIDENTIALITE DES DONNEES	18
9	CONSERVATION DES DOCUMENTS ET DES DONNEES RELATIVES A LA RECHERCHE	19
10	RAPPORT FINAL	19
11	REGLES RELATIVES A LA PUBLICATION	19
12	ASPECTS LEGAUX ET ETHIQUES	19
13	. VIGILANCE DE L’ESSAI CLINIQUE.....	21
13	CALENDRIER.....	22
14	BUDGET	22
15	RETOMBEE ATTENDUE	22
	ANNEXES	23

1 Résumé de la recherche

Promoteur	Assistance Publique - Hôpitaux de Marseille
Titre	Etude de la fonctionnalité des nouveaux variants génétiques à l'origine des pathologies plaquettaires constitutionnelles.
Acronyme	EVGPP
Investigateur Coordonnateur et Responsable scientifique	Pr. Marie-Christine ALESSI Service d'Hématologie Biologique & Centre de Référence des Pathologies Plaquettaires (CRPP) CHU de Marseille - Hôpital de la Timone. 264, Rue Saint-Pierre. 13385 Marseille Cedex 5 Centre recherche en CardioVasculaire et Nutrition (C2VN) - INSERM 1062, Faculté de Médecine de la Timone. 27, Boulevard Jean Moulin. 13005 Marseille marie-christine.alessi@univ-amu.fr
Nombre de centres	11 centres : Marseille, Toulouse, Bordeaux, Paris Debré, Paris Trousseau, Paris Necker, Paris Bicêtre, Tours, Strasbourg, Lille, Paris Bichat.
Nombre de sujet prévus	Nombre de patients à inclure : nous formulons l'hypothèse qu'au moins 50% des variations identifiées auront un impact sur le fonctionnement de la plaquette. Au risque alpha de 5% et pour une puissance de 80%, 150 patients seront à inclure sur la durée de l'étude. En pratique, il est usuel de répéter 3 fois chaque expérience pour s'assurer de la reproductibilité du résultat obtenu. Pour chaque patient inclus dans le protocole de recherche, nous recruterons 3 témoins soit une inclusion de 450 témoins.
Population concernée	Enfants et adultes ayant une pathologie plaquettaire constitutionnelle pour laquelle une variation génétique a été mise en évidence mais dont le caractère délétère reste à déterminer ou pour laquelle le diagnostic génétique n'a pas mis en évidence de variation potentiellement impliquée dans la pathologie.
Calendrier de la recherche	Durée de la période d'inclusion : 4 ans. Durée de participation : 1 an. Durée de l'étude : 5 ans.
	<u>Critères d'inclusion</u> ❖ Patient - Adulte ou mineur de plus de 7 ans. Le recours aux patients mineurs sera exceptionnel et devra se limiter au cas où une exploration familiale s'avère nécessaire et où il n'y a pas d'autres membres adultes atteints dans la famille. - Patient et apparentés, consultant dans les sites mentionnés en Annexe 1, ayant une pathologie plaquettaire constitutionnelle (thrombopénie familiale se traduisant par un compte plaquettaire < 150 G.L ⁻¹ chez plusieurs membres de la famille et/ou thrombopathie familiale se traduisant par un dysfonctionnement plaquettaire chez plusieurs membres d'une famille) pour laquelle une variation génétique a été mise en évidence mais dont le caractère délétère reste à déterminer. - Patient et apparentés, consultant dans les sites mentionnés en Annexe 1, ayant une pathologie plaquettaire constitutionnelle (thrombopénie familiale se traduisant par un compte plaquettaire < 150 G.L ⁻¹ chez

	<p>plusieurs membres de la famille et/ou thrombopathie familiale se traduisant par un dysfonctionnement plaquettaire chez plusieurs membres d'une famille) pour laquelle le diagnostic génétique n'a pas mis en évidence de variation potentiellement impliquée dans la pathologie.</p> <ul style="list-style-type: none">- Information et recueil du consentement du participant ou de ses parents. <p>❖ Témoin</p> <ul style="list-style-type: none">- Adulte.- Compte plaquettaire > 150 G.L⁻¹.- Pas de dysfonctionnement plaquettaire.- Sans traitement médical ou pas de traitement pris dans les dix jours précédant l'inclusion.- Information et recueil du consentement du témoin. <p>Critères de non inclusion</p> <p>❖ Patient</p> <ul style="list-style-type: none">- Incapacité ou refus de compliance aux exigences de la recherche.- Mineur de moins de 7 ans.- Patient ne présentant pas de pathologie plaquettaire.- Patient présentant une pathologie plaquettaire : non chronique, non familiale, ou bien manifestation acquise.- Patient présentant une pathologie plaquettaire familiale dont le caractère délétère de la mutation est connue.- Population dite vulnérable : personne sur tutelle ou curatelle ou personne privée de ses droits de liberté par décision judiciaire, patient en fin de vie, femme dont la grossesse est connue. <p>❖ Témoin</p> <ul style="list-style-type: none">- Incapacité ou refus de compliance aux exigences de la recherche.- Mineur.- Témoin présentant une numération plaquettaire anormale.- Témoin ayant pris dans les dix jours précédant l'inclusion un traitement médical affectant les plaquettes.- Témoins ayant une pathologie pouvant affecter le comportement des plaquettes (maladies inflammatoires).- Population dite vulnérable : mineur, personne sur tutelle ou curatelle ou personne privée de ses droits de liberté par décision judiciaire, sujet en fin de vie, femme dont la grossesse est connue.
--	--

Justification Contexte	<p>Les pathologies plaquettaires constitutionnelles sont des maladies rares dont le diagnostic est assuré par le Centre de Référence national des Pathologies Plaquettaires constitutionnelles (CRPP) composé de plusieurs sites et coordonné par le porteur de ce projet. Dans le cadre du CRPP, le diagnostic génétique des pathologies plaquettaires constitutionnelles est centralisé sur 3 sites (un site à Marseille et deux à Paris, cf Paragraphe 2). Les échantillons sont adressés à l'un des 3 sites, où est réalisé le séquençage d'un panel de gènes (80) à visée diagnostique. A l'heure actuelle, malgré cette stratégie, 40% des pathologies plaquettaires constitutionnelles restent sans cause génétique identifiée. Dans d'autres cas, une variation génétique délétère est identifiée sur un gène impliqué dans les pathologies plaquettaires mais cette variation génétique n'a jamais été rapportée dans la littérature et il est nécessaire de confirmer son implication dans la pathologie.</p> <p>Le CRPP rassemble tous les sites experts nationaux dans le domaine de l'exploration de ces pathologies. Certains de ces sites fortement impliqués dans la recherche (cf Annexe 1) sur les pathologies plaquettaires et se sont associés pour participer au projet EVGPP dans le but d'identifier et de caractériser de nouvelles causes génétiques aux pathologies plaquettaires héréditaires.</p>
Objectif	<p>Le projet consistera à :</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) prouver le caractère délétère des variations génétiques mises en évidence durant le diagnostic (panel de gènes) par des méthodes de biologie cellulaire et moléculaire ; 2) rechercher de nouvelles variations génétiques lorsque l'exploration diagnostique aura été non informative par un séquençage d'exons. Si de nouvelles variations génétiques sont identifiées, leur caractère délétère sera évalué.
Schéma de la recherche	<p>Etude physiopathologique, descriptive et multicentrique. Cette étude consiste principalement à prélever du sang chez les patients de façon à isoler <i>ex vivo</i> les plaquettes et les cellules précurseurs des plaquettes et à permettre leur étude comparative. Des échantillons de témoins seront utilisés comme contrôle positif des expérimentations mises en œuvre pour prouver le caractère délétère de la mutation. L'étude comporte aussi une cession d'ADN à partir des 3 CRB impliqués dans le projet en prévision d'un séquençage d'exons</p>
Méthodologie	<p>❖ Patient</p> <p>Les patients seront recrutés à l'occasion d'une consultation de suivi dans le cadre de leur prise en charge habituelle de leur pathologie plaquettaire. Dans le cadre où l'analyse génétique diagnostique est non informative, il sera proposé au patient la réalisation d'un séquençage d'exons de minimum 3 membres de sa famille (trio parents enfant ou si impossible trio incluant des membres atteints et non atteints de la famille) dont les ADN conservés dans l'un des CRB ont déjà été utilisés dans le cadre du diagnostic (panel de gènes) et seront cédés à l'équipe du C2VN (cf Annexe 1) qui sous traitera le séquençage d'exons à une société privée en respectant la réglementation en vigueur et en maintenant l'anonymat des échantillons.</p> <p>Dans le cas où une mutation a été identifiée (dans le cadre du diagnostic ou à la suite du séquençage d'exons) mais dont le caractère délétère est à évaluer, un prélèvement sanguin supplémentaire sera réalisé à l'occasion de</p>

	<p>trois visites espacées d'au moins trois mois, sur chacun des sites pour mettre en œuvre des explorations complémentaires (imagerie plaquettaire, étude de la production des plaquettes, ...). Les expériences seront adaptées en fonction du gène ciblé.</p> <p><u>Le recours aux mineurs sera exceptionnel</u> et devra se limiter au cas où il n'y a pas d'autres membres adultes atteints dans la famille.</p> <p>❖ Témoin</p> <p>Pour chaque patient inclus dans le protocole de recherche, des plaquettes et des cellules précurseurs issues de témoins sans pathologie plaquettaire s'avèrent nécessaires pour servir de contrôle positif pour les différentes méthodes qui seront utilisées. Ils devront avoir au préalable donné leur autorisation pour les prélèvements sanguins, ainsi que l'utilisation des prélèvements sanguins pour la recherche scientifique.</p> <p>Chaque inclusion de patient et de témoin sera déclarée au site coordonnateur avec une description des expériences menées et du volume de sang prélevé. Chaque inclusion sera présentée au Comité de Gouvernance du CRPP.</p> <p>Les prélèvements sanguins liés à l'étude seront réalisés dans les centres de prélèvement rattachés aux sites investigateurs impliqués dans le projet. Les prélèvements sanguins seront réalisés au pli du coude. La quantité maximale par prélèvement sera de 80 millilitres pour les adultes. Le nombre de prélèvements annuels sera limité à trois pour les patients (avec un intervalle minimum de trois mois entre chaque prélèvement) et de un pour les témoins. Pour les mineurs, la fréquence du prélèvement sera limitée à un par an, quant au volume on se référera à l'annexe 2 « volume de prélèvement sanguin en fonction du poids de la personne » de l'Arrêté du 12 avril 2018 fixant la liste des recherches mentionnées au 3° de l'article L. 1121-1 du code de la santé publique.</p>
Critères de jugement	Mise en évidence de défauts cellulaires, moléculaires et biochimiques liés à la variation génétique identifiée par comparaison à des échantillons contrôles.
Analyse statistique des données	<p>Les résultats des explorations des plaquettes de patients porteurs de la variation seront comparés à ceux obtenus avec les plaquettes de témoins. Les données consolidées seront traitées par un biologiste/chercheur de chaque site formé à la statistique à l'aide du logiciel Prism. L'analyse descriptive sera conduite sur l'ensemble des échantillons, portant sur les variables démographiques, cliniques et biologiques caractéristiques de la pathologie plaquettaire concernée. Les variables qualitatives seront présentées sous la forme de proportions et les variables quantitatives seront présentées à l'aide des caractéristiques des tendances centrales (moyennes et écart-type...). La comparaison des résultats phénotypiques (patients vs témoins) se fera à l'aide de tests non paramétriques appropriés (test de Mann-Whitney, test de Kruskal-Wallis). Dans le cadre d'un séquençage des exons, l'analyse bio-informative sera prise en charge par l'équipe du Dr Tregouët (cf Annexe 1).</p>
Retombée attendue	Ce travail vise à mieux comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires qui conduisent à l'apparition d'anomalies de la production et des fonctions plaquettaires. Les résultats de ces recherches seront diffusés à la communauté scientifique afin d'améliorer le diagnostic et la prise en charge des patients. Sur le plan individuel ce projet apportera une meilleure prise en charge des individus et de leur famille (prise en charge, enquête familiale, diagnostic prénatal si nécessaire ...).

2 Justification scientifique et description générale

Les plaquettes sont des cellules sanguines circulantes. Elles se lient entre elles et à la paroi du vaisseau endommagé afin d'éviter une perte excessive de sang.

Les plaquettes peuvent être :

- en nombre insuffisant dans le cas de thrombopénie ;
- ou non fonctionnelles lorsqu'il s'agit de thrombopathie.

Les thrombopathies et thrombopénies constitutionnelles sont des maladies rares. Les thrombopénies constitutionnelles sont à l'origine d'hémorragie d'intensité variable et sont parfois le signe révélateur de pathologies hématologiques plus graves. Le risque évolutif de certaines thrombopénies constitutionnelles est l'apparition de myélofibrose, dysmyélopoïèse ou prolifération maligne. Alors que l'enjeu évolutif de certaines thrombopénies et surtout les thrombopénies syndromiques sera plutôt à l'atteinte d'autres organes (rein, cœur, os, cerveau, ...), d'autres thrombopénies constitutionnelles n'auront que peu de conséquences. Leur diagnostic aura alors, pour enjeu majeur, de les distinguer des thrombopénies immunologiques et d'éviter la mise en œuvre de traitements inadaptés parfois lourds (corticoïdes, immunoglobulines IV, immunosuppresseurs, splénectomie). Des mutations sur plus d'une quarantaine de gènes ont été identifiées à ce jour et sont responsables des thrombopénies.

Les thrombopathies constitutionnelles sont hétérogènes et peuvent concerner différents constituants plaquettaires. En bref, lors de la stimulation des plaquettes sur un site lésionnel, différents agonistes solubles ou matriciels se lient à des récepteurs plaquettaires pour induire un flux de calcium, la sécrétion et l'agrégation plaquettaire au niveau d'une brèche vasculaire pour éviter une déperdition sanguine. Les thrombopathies constitutionnelles exposent essentiellement à un risque de saignement cutanéomuqueux spontané ou provoqué. Certaines thrombopathies font également partie de tableaux syndromiques plus complexes. Au cours des dernières décennies, des progrès considérables ont été réalisés dans la compréhension des thrombopathies permettant de mieux les identifier. Des précisions ont été apportées sur les dysfonctions plaquettaires liées à des anomalies des processus de biogenèse des granules et de leur sécrétion, à des défauts de signalisation (notamment déficit en récepteurs de surface). Actuellement, plus d'une trentaine de gènes sont le siège de mutations transmises sur le mode autosomique dominant, récessif ou liées à l'X et peuvent être séquencés.

Le Centre de Référence des Pathologies Plaquettaires constitutionnelles (CRPP) labellisé par le Ministère de la Santé et des Solidarités dans le cadre du plan « maladies rares » a pour mission d'améliorer le parcours de soin, d'assurer la formation et de promouvoir la recherche sur les pathologies plaquettaires héréditaires. Il correspond à un maillage de centres médicaux experts dans l'exploration des pathologies plaquettaires et leur prise en charge. Le site coordonateur de ce centre et porteur de ce projet est particulièrement investi dans la recherche sur les pathologies plaquettaires héréditaires et a déjà identifié de nouveaux gènes à l'origine de pathologies plaquettaires héréditaires.

Une organisation nationale a été mise en place pour le diagnostic moléculaire de ces pathologies. Les échantillons d'ADN de patients répondant à des critères stricts (caractère familial, pathologie chroniques, signes associés) sont adressés aux départements de biologie moléculaire du laboratoire d'hématologie du CHU Timone à Marseille (responsable biologiste Marie-Christine Alessi coordonnateur de ce projet), de l'Hôpital Robert Debré (responsable Anne Vincenot) et de l'Hôpital Armand Trousseau (responsable Rémi Favier). Un panel de 80 gènes est alors séquencé de façon à identifier des variations génétiques potentiellement responsables de la pathologie. Dans 40% des cas, un diagnostic de certitude sera apporté. Pour les 60% restants, l'analyse restera non informative pour plusieurs raisons :

- soit il s'agit de la mise en évidence d'une variation sur un gène connu mais non encore décrite dans la littérature dont il faut confirmer le caractère délétère ;
- soit aucun gène n'a été identifié et se posera l'indication d'un séquençage plus large impliquant tous les exons du génome. Cette stratégie a déjà permis au site coordonnateur d'identifier plusieurs nouveaux gènes particulièrement importants ;
- soit il s'agit d'individus pour lesquels le caractère constitutionnel n'était pas assez documenté, une réorientation diagnostique sera alors nécessaire.

A la suite du séquençage du panel de gènes, les ADN sont et seront conservés au sein des 3 centres de ressources biologiques suivants :

- le CRB de l'Assistance Publique des Hôpitaux de Marseille AP-HM, accrédité HemoVasc, (décision n° AC-2017-2986 modifiée sous le n° AC-2018-3105) ;
- le CRB du CHU Robert de l'Assistance Publique des Hôpitaux de Paris AP-HP (numéro de certification : 2017/78015.1) ;
- le CRB-GHUEP de l'Hôpital Armand Trousseau de l'Assistance Publique des Hôpitaux de Paris AP-HP (numéro de certification : DC 2009-965).

Cette conservation a plusieurs objectifs : permettre de tester à nouveau ces échantillons au regard des nouvelles découvertes publiées dans la littérature et permettre de réaliser un séquençage plus large (séquençage des exons) pour tenter d'identifier la variation en cause dans les cas restant inexplicés.

Le projet EVGPP consistera à prouver le caractère délétère des nouvelles variations génétiques par des méthodes de biologie cellulaire et moléculaire. Ces variations seront soit celles identifiées sur un gène connu dans le cadre du diagnostic (séquençage d'un panel de gènes) soit celles identifiées par le séquençage d'exons sur un gène non encore connu comme impliqué dans les pathologies plaquettaires constitutionnelles. La réalisation du séquençage d'exons fait partie intégrante du projet.

Références :

- G Arza Diana, Becan-Mcbride Kathleen. Phlebotomy Handbook Third Edition, Appleton & Lange, Connecticut, 1993, 419 p.
- Nurden AT, Nurden P. Congenital platelet disorders and understanding of platelet function. Br J Haematol.2014 ;165:165-78.
- Canault M, Ghalloussi D, Grosdidier C et al. Human CalDAG-GEFI gene (RASGRP2) mutation affects platelet function and causes severe bleeding. J Exp Med. 2014 Jun 30;211(7):1349-62.
- Poggi M, Canault M, Favier M, et al. Germline variants in ETV6 underlie reduced platelet formation, platelet dysfunction and increased levels of circulating CD34+ progenitors. Haematologica. 2017 Feb;102(2):282-294.
- Saultier P, Vidal L, Canault M et al. Macrothrombocytopenia and dense granule deficiency associated with FLI1 variants: ultrastructural and pathogenic features. Haematologica. 2017 Jun;102(6):1006-1016.

3 L'objectif de l'étude

Les objectifs spécifiques de cette recherche sont de :

- prouver le caractère délétère des variations génétiques mise en évidence durant le diagnostic (panel de gènes) par des méthodes de biologie cellulaire et moléculaire ;
- rechercher de nouvelles variations génétiques (lorsque l'exploration diagnostic aura été non informative) par un séquençage d'exons. Si de nouvelles variations génétiques sont identifiées, leur caractère délétère sera évalué.

L'objectif global de cette recherche scientifique est d'améliorer le diagnostic et la prise en charge des patients atteints de pathologies plaquettaires constitutionnelles (thrombopathies et thrombopénies) en identifiant de nouvelles causes génétiques à l'origine de ces pathologies.

4 Conception de la recherche

4.1 Schéma de la recherche

Il s'agit d'une étude physiopathologique et multicentrique (11 centres, cf Annexe 1). Cette étude consiste principalement à prélever du sang chez les patients et les témoins de façon à isoler *ex vivo* les plaquettes et les cellules précurseurs des plaquettes et à permettre leur étude comparative. Les unités de recherche et les centres hospitaliers qui participent à ce projet sont membres du Centre de Référence des Pathologies Plaquettaires (CRPP) et sont indiqués en Annexe 1. Ces sites sont référents dans le domaine des plaquettes et ont déjà fait preuve d'une activité de recherche dans ce domaine.

L'étude comporte aussi une cession d'ADN : les 3 CRB impliqués dans ce projet (cf Paragraphe 2 Justification scientifique et description générale) et stockant les ADN, les céderont gratuitement - si le séquençage d'exons s'avère nécessaire - à l'équipe du C2VN dirigée par le coordonnateur de ce projet (cf Annexe 1), qui sous traitera ce séquençage à une société privée en respectant la réglementation en vigueur et en maintenant l'anonymat des échantillons.

Les laboratoires de recherche impliqués dans ce projet devront financer les transports de leurs propres échantillons en respectant les normes (cf Paragraphe 4.8.4 Transport des échantillons).

4.2 Critères d'éligibilité

4.2.1 Critères d'inclusion

❖ Patient

- Adulte ou mineur de plus de 7 ans.
Le recours aux patients mineurs sera exceptionnel et devra se limiter au cas où une exploration familiale s'avère nécessaire (séquençage d'exons) et où il n'y a pas d'autres membres adultes atteints dans la famille.
- Patient et apparentés, consultant dans les sites mentionnés en Annexe 1, ayant une pathologie plaquettaire constitutionnelle (thrombopénie familiale se traduisant par un compte plaquettaire < 150 G.L⁻¹ chez plusieurs membres de la famille et/ou thrombopathie familiale se traduisant par un dysfonctionnement plaquettaire chez plusieurs membres d'une famille) pour laquelle une variation génétique a été mise en évidence mais dont le caractère délétère reste à confirmer.
- Patient et apparentés, consultant dans les sites mentionnés en Annexe 1, ayant une pathologie plaquettaire constitutionnelle (thrombopénie familiale se traduisant par un compte plaquettaire < 150 G.L⁻¹ chez plusieurs membres de la famille et/ou thrombopathie familiale se traduisant par un dysfonctionnement plaquettaire chez plusieurs membres d'une famille) pour laquelle le diagnostic génétique n'a pas mis en évidence de variation potentiellement impliquée dans la pathologie.
- Information et recueil du consentement du participant ou de ses parents.



❖ Témoin

- Adulte.
- Compte plaquettaire > 150 G.L⁻¹
- Pas de dysfonctionnement plaquettaire.
- Sans traitement médical (pris dans les dix jours précédents l'inclusion).
- Information et recueil du consentement du témoin.

4.2.2 Critères de non inclusion

❖ Patient

- Incapacité ou refus de compliance aux exigences de la recherche.
- Mineur âgé de moins de 7 ans.
- Patient ne présentant pas de pathologie plaquettaire.
- Patient présentant une pathologie plaquettaire : non chronique, non familiale, ou bien manifestement acquise.
- Patient présentant une pathologie plaquettaire familiale dont le caractère délétère de la mutation est connue.
- Population dite vulnérable : personne sur tutelle ou curatelle ou personne privée de ses droits de liberté par décision judiciaire, patients en fin de vie, femme dont la grossesse est connue.

❖ Témoin

- Incapacité ou refus de compliance aux exigences de la recherche.
- Mineur.
- Témoin présentant une numération plaquettaire anormale.
- Témoin ayant pris dans les dix jours précédant l'inclusion un traitement affectant les plaquettes.
- Témoins ayant une pathologie pouvant affecter le comportement des plaquettes (maladies inflammatoires).
- Population dite vulnérable : mineur, personne sur tutelle ou curatelle ou personne privée de ses droits de liberté par décision judiciaire, sujet en fin de vie, femme dont la grossesse est connue.

4.3 Déroulement de l'étude

4.3.1 Recrutement des sujets

❖ Patient

Il s'agit de patients suivis par un centre du CRPP impliqués dans l'étude pour une thrombopathie ou une thrombopénie constitutionnelle antérieurement identifiée à partir de critères définis par le CRPP mais dont le diagnostic génétique doit être conforté.

Ces patients ont accepté que des prélèvements sanguins (maximum 80 millilitres au total et maximum trois fois par an avec un minimum de trois mois entre deux prélèvements) soient effectués et utilisés à des fins de recherche scientifique, décrites dans la notice explicative (volume de prélèvement en accord avec l'annexe 2 de l'arrêté du 3 mai 2017 pour l'article L.1121-1).

Deux cas sont à envisager :

- 1) soit l'anomalie moléculaire a été identifiée dans le cadre du diagnostic lors du séquençage du panel de gènes mais cette variation n'a jamais été rapportée dans la littérature et une recherche doit être entreprise pour confirmer le caractère délétère de cette variation ;
- 2) soit aucune étiologie génétique n'a pu être identifiée dans le cadre du diagnostic par le séquençage d'un panel de gènes ; ce qui nécessite de proposer à plusieurs membres de la famille (en règle général un trio : parents + propositus) une analyse plus complète du génome par séquençage des exons. Dans ce cas et après accord des différents membres concernés, l'ADN conservé au sein d'un des 3 CRB sera cédé pour la réalisation du séquençage des exons à l'équipe du C2VN (cf Annexe 1) qui sous-traitera à une société privée en respectant la réglementation en vigueur et en maintenant l'anonymat des échantillons.

Par la suite et selon les possibilités, une ségrégation de l'anomalie avec le phénotype plaquettaire sera recherchée au sein de la famille élargie à d'autres membres. Les conséquences des nouvelles variations génétiques seront étudiées à partir de plaquettes ou de cellules précurseurs isolées *ex vivo* par comparaison aux mêmes cellules issues des témoins.

Le recours aux mineurs sera exceptionnel et devra se limiter au cas où une exploration familiale s'avère nécessaire et où il n'y a pas d'autres membres adultes atteints dans la famille. Dans le cas de patient mineur, la fréquence du prélèvement sera limitée à un par an, quant au volume on se référera à l'annexe 2 « volume de prélèvement sanguin en fonction du poids de la personne » de l'Arrêté du 12 avril 2018 fixant la liste des recherches mentionnées au 3° de l'article L. 1121-1 du code de la santé publique.

❖ **Témoïn**

Pour chaque patient inclus dans le protocole de recherche des explorations plaquettaires complémentaires, l'isolement de plaquettes et de cellules précurseurs à partir de témoins adultes est nécessaire de façon à valider la bonne réalisation des expérimentations mises en œuvre. Ces témoins seront recrutés par les centres de prélèvements rattachés aux sites investigateurs. Aucune recherche de mutations ne sera réalisée chez les témoins.

En pratique expérimentale il est usuel de répéter 3 fois chaque expérience pour s'assurer de la reproductibilité du résultat obtenu. Pour chaque patient inclus dans le protocole de recherche, nous recruterons 3 témoins soit une inclusion de 450 témoins sur la durée de l'étude.

Ces témoins ont accepté qu'un prélèvement sanguin (maximum 80 millilitres) soit effectué et utilisé à des fins de recherche scientifique, décrites dans la notice explicative (volume de prélèvement en accord avec l'annexe 2 de l'arrêté du 3 mai 2017 pour l'article L.1121-1).

4.3.2 Visite d'inclusion

❖ **Patient**

Au cours de la visite d'inclusion, le patient rencontrera l'un des médecins des sites du CRPP impliqués dans la recherche. Le médecin expliquera : le protocole et son déroulement, les obligations du participant, ainsi que les tenants et aboutissants de l'étude. Il recueillera le consentement libre, éclairé et exprès, et un consentement déjà approuvé par les Centres de Ressources Biologiques (CRB) (cf Paragraphe : 2 Justification scientifique et description générale). qui rassemblent les demandes de séquençage du CRPP en accord avec la loi n°2016-41 du 26 Janvier 2016 avec le décret n°2016-1537 du 16 novembre 2016 relatif aux recherches impliquant la personne humaine et les articles (L.1121-1, L.1211-2, L.1123-7, R.1123-24, R.1123-15 du CSP) et la détermination de caractéristiques génétiques.

Toute inclusion de patient doit être communiquée au coordonnateur, par le biais de la fiche de liaison « inclusion » (cf Annexe 2) envoyée par mail, de façon à pouvoir établir le suivi de la recherche. Le coordonnateur informe ensuite le Comité de Gouvernance du CRPP.

Dans le cas d'une analyse génétique diagnostique (séquençage du panel de gènes) non informative il sera proposé au participant et à plusieurs membres de sa famille, un séquençage des exons. L'ADN conservé au sein du CRB sera cédé pour la réalisation du séquençage des exons à l'équipe du C2VN (cf Annexe 1) qui sous traitera le séquençage. Les variations génétiques candidates seront vérifiées par technique de séquençage classique (Sanger). Les résultats du séquençage seront analysés par le Dr. Tregouët et son équipe de bio informaticiens (cf Annexe 1). Les résultats génétiques obtenus resteront dans le domaine de la recherche pure jusqu'à confirmation du caractère délétère des variations étudiées puis entreront dans le domaine du diagnostic. A l'issue de la recherche, en dehors de l'ADN conservé par les CRB (déclaration collection....), les autres éléments biologiques auront été totalement utilisés.

❖ **Témoïn**

Au cours de la visite d'inclusion, le témoin rencontrera l'un des médecins des sites du CRPP impliqués dans la recherche. Le médecin expliquera : le protocole et son déroulement, les obligations du participant, ainsi que les tenants et aboutissants de l'étude. Il recueillera le consentement libre, éclairé et exprès.

Toute inclusion de témoin doit être communiquée au coordonnateur, par le biais de la fiche de liaison « inclusion » (Annexe 2) envoyée par mail, de façon à pouvoir établir le suivi de la recherche. Le coordonnateur informe ensuite le Comité de Gouvernance.

4.3.3 Déroulement de la recherche

Les échantillons de sang seront pseudonymisés et traités localement sur les sites investigateurs en relation avec les unités de recherche associées. Chaque site investigateur sera responsable des expérimentations réalisées sur les échantillons.

4.4 Visite de fin de recherche

La fin de recherche correspond à la fin des expérimentations mises en œuvre pour prouver le caractère délétère de l'anomalie moléculaire ciblée. Toute fin de recherche doit être communiquée au coordonnateur par le biais de la fiche de liaison « fin de recherche » (Annexe 4) envoyée par mail, de façon à pouvoir établir le suivi de la recherche (volume total de sang prélevé, expérimentations mises en œuvre au cours de la recherche, principaux résultats). Le coordonnateur informe ensuite le comité de gouvernance. Les résultats de la recherche seront présentés au comité de gouvernance du CRPP à l'occasion d'une réunion dédiée.

Le rendu des résultats génétiques ne concernera que les variations génétiques retenues pour les pathologies plaquettaires et se fera sur demande expresse du patient au niveau de la feuille de consentement. Il est à noter que les autres variations identifiées au cours du séquençage des exons qui ne concernent pas les pathologies plaquettaires (variations incidentes) ne seront ni confirmées ni exploitées.

Chaque médecin investigateur aura la charge d'informer le patient des résultats des analyses effectuées et, si le caractère délétère de la variation a été mis en évidence, de mettre en œuvre une consultation de génétique. Cet aspect diagnostique sort du projet de recherche proprement dit.

4.5 Abandon et retrait de consentement

Un abandon est une décision d'un participant inclus de faire valoir son droit d'interrompre sa participation à une recherche, à tout moment, sans qu'elle n'encoure aucun préjudice de ce fait et sans avoir à se justifier. L'investigateur doit identifier la cause de l'abandon et évalue s'il est possible de recueillir la variable sur laquelle porte le critère de jugement principal au moment de l'abandon. Les abandons de recherche doivent être notifiés rapidement à l'investigateur coordonnateur, au promoteur et au gestionnaire des données. Les raisons et la date d'abandon doivent être documentées dans le cahier d'observation.

Un retrait de consentement est une décision d'un participant de revenir sur sa décision de participer à une recherche et de faire valoir son droit d'annuler son consentement éclairé, à tout moment durant la durée de la recherche et sans qu'il n'encoure aucun préjudice de ce fait et sans avoir à se justifier. Lorsqu'un participant retire son consentement de participation à la recherche, l'investigateur doit contacter l'investigateur coordonnateur, qui en informe le promoteur. Ce retrait n'a pas d'incidence sur les activités menées et sur l'utilisation des données obtenues sur la base du consentement éclairé exprimé avant que celui-ci n'ait été retiré (article L.1121-1-1). Après retrait, l'échantillon sera détruit aucune nouvelle donnée devra être obtenue.

Les résultats seront strictement utilisés pour la recherche en cours, et ne pourront être utilisés dans le cadre d'une autre recherche.

4.6 Règles d'arrêt de la recherche

Fin de la recherche ou arrêt prévu de la recherche : terme de la participation de la dernière personne qui se prête à la recherche (cf. Articles L.1123-11 ; R.1123-59 de la loi n°2016-41) aussi appelé dernière visite du dernier participant inclus dans la recherche. Cette définition est proposée par défaut dans le cadre de la Loi de Santé Publique. Lorsque la recherche a atteint son terme prévu (arrêt prévu), la fin de la recherche doit être déclarée au promoteur.

Toute décision du promoteur d'interrompre temporairement ou définitivement la recherche avant son terme doit faire l'objet d'une information au CPP concerné et dans un second temps et dans un délai maximum de 15 jours calendaires suivant la date de cette interruption, d'une demande d'avis au CPP concerné.

4.7 Déviation au protocole

Les déviations peuvent concerner tous les aspects d'un protocole de recherche : processus d'inclusion, suivi, mesure des critères de jugement. Toutes doivent être documentées par l'investigateur et discutées par le Comité de Gouvernance (cf. Paragraphe 7 Surveillance de la recherche).

Seuls les abandons entraînent un arrêt des investigations. Même en cas de déviation au protocole, les explorations doivent être menées jusqu'au terme prévu dans le protocole.

Un participant est considéré comme inclus à tort lorsqu'il a effectivement été inclus dans la recherche alors qu'il ne vérifiait pas tous les critères d'éligibilité. Les participants inclus à tort doivent faire l'objet d'une discussion du Comité de Gouvernance (cf. Paragraphe 7 Surveillance de la recherche) pour envisager un retrait du protocole.

4.8 Circuit des échantillons biologiques

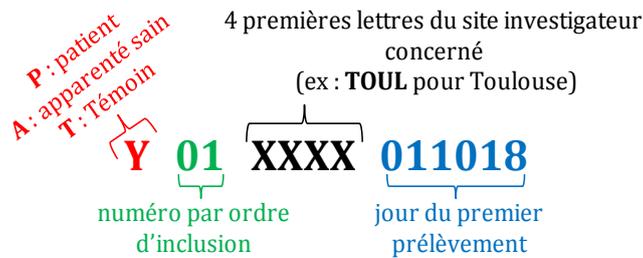
4.8.1 Prélèvements

Les prélèvements sanguins liés à l'étude seront réalisés le jour de l'inclusion dans les centres de prélèvement rattachés aux sites investigateurs impliqués dans le projet. Les prélèvements sanguins seront réalisés au pli du coude. La quantité maximale par prélèvement sera de 80 millilitres pour les adultes. Le nombre de prélèvements annuels sera limité à trois pour les patients (avec un intervalle minimum de trois mois entre chaque prélèvement) et de un pour les témoins.

Pour les mineurs, la fréquence du prélèvement sera limitée à un par an, quant au volume on se référera à l'annexe 2 « volume de prélèvement sanguin en fonction du poids de la personne » de l'Arrêté du 12 avril 2018 fixant la liste des recherches mentionnées au 3° de l'article L. 1121-1 du code de la santé publique.

4.8.2 Pseudonymisation des échantillons

L'identification des tubes se fera grâce à une étiquette codée. Le code sera produit par le site investigateur et sera sous la forme suivante :



Chaque individu aura un code d'identification différent. Chaque site investigateur disposera de sa table de concordance confidentielle entre l'identification du patient ou du témoin sain et le numéro. Cette table sera détenue uniquement par l'investigateur de chaque site. Seul l'investigateur coordonnateur pourra avoir accès à toutes tables de correspondance afin de vérifier le bon déroulement de l'étude.

4.8.3 Feuille de liaison « inclusion »

Cette fiche de liaison « inclusion » (cf paragraphe 4.8 Circuit des échantillons biologiques et Annexe 2) sera envoyée au coordonnateur lorsque tous les prélèvements nécessaires à la recherche auront été effectués.

Le site investigateur devra remplir pour chaque donneur une fiche de liaison « inclusion » comprenant (Annexe 2) :

- le site investigateur ;
- le nom du médecin investigateur du site ;
- les dates de prélèvements ;
- les données démographiques : année de naissance, sexe ;
- le code d'identification ;
- le nombre de tubes prélevés ;
- le volume de sang prélevé ;
- les analyses envisagées ;
- et si une anomalie génétique est connue.

Ce tableau sera conservé par l'investigateur et adressé au coordonnateur une fois tous les prélèvements sanguins effectués.

4.8.4 Transport des échantillons

Les échantillons de sang seront transportés du site de prélèvement au laboratoire de recherche en suivant les normes relatives au transport d'échantillons de sang (emballage P650 et transporteur agréé).

Le matériel génétique (ADN) n'est pas soumis aux dispositions de la réglementation sur le transport de matière dangereuse du fait de son caractère non infectieux.

4.8.5 Caractérisations biologiques, moléculaires et cellulaires

Différentes techniques pourront être utilisées pour caractériser la dysfonction plaquettaire et seront entreprises par les sites et unités de recherches indiquée en Annexe 1.

Citons par exemple :

- la technique d'adhésion sur différents supports en statique ou en flux ;
- la technique de microscopie électronique à différentes résolutions ;
- l'imagerie en immunofluorescence et l'imagerie confocale ;
- la culture de mégacaryocytes à partir de cellules isolées du sang périphérique;
- les techniques lipidomiques, protéomiques, etc.

Cette liste n'est pas exhaustive et s'adaptera en fonction de la protéine ciblée par la variation génétique par le patient.

Le transport des échantillons du site de prélèvement au laboratoire de recherche se fera dans un petit container hermétique avec triple protection évitant toutes contaminations.

4.8.6 Séquençage d'exons

Les ADN conservés au sein des 3 CRB seront cédés à l'équipe du C2VN (cf Annexe 1).

Le séquençage des exons sera sous-traité à une société privée selon la réglementation en vigueur et en maintenant l'anonymat des échantillons. L'analyse biostatistique sera prise en charge par le Dr. Tregouët et son équipe de bioinformaticiens (cf Annexe 1).

Si une variation d'intérêt est mise en évidence, cette information sera partagée avec le site investigateur pour mettre en œuvre les expérimentations nécessaires à la confirmation du caractère délétère de la variation avec la mise en œuvre des techniques adaptées aux fonctions du gène mis en évidence.

4.9 Durée et modalité d'organisation de la recherche

Durée de la période d'inclusion : 4 ans.

Durée de participation : 1 an.

Durée de l'étude : 5 ans.

Etapas du projet en Annexe 3.

5 Traitement des données et aspects statistiques

5.1 Nombre de sujets

Nous formulons l'hypothèse qu'au moins 50% des variations identifiées affecteront le fonctionnement de la plaquette. Au risque alpha de 5%, à la puissance de 80% avec une précision de 8%, 150 patients seront à inclure sur la durée de l'étude.

Formule utilisée (Daniel, 1999) :

$$n = \frac{Z^2 P(1 - P)}{d^2}$$

Avec n = taille de l'étude

Pour notre projet de recherche, nous envisageons un ratio de 3 témoins par patient et nous estimons donc l'inclusion de 450 témoins maximum.

5.2 Recueil des données

Le recueil des données à partir des échantillons rendus anonymes se fera par le centre investigateur qui suit le patient et par l'équipe de recherche Inserm ou universitaire qui réalise les investigations spécialisées, en respectant les règles de déontologie scientifiques (cahier de laboratoire, analyse concertée des données).

Les autres documents nécessaires à la recherche et non anonymes :

- les données anamnestiques : antécédentes personnelles et familiales ;
- le score hémorragique ;
- les feuilles de résultats biologiques antérieurs regroupant les résultats de l'exploration plaquettaire à visée diagnostique.

Ils seront conservés par le médecin investigateur. Ce dernier sera en charge de la mise en place d'une table de concordance lorsque ces données anonymisées devront être utilisées pour la recherche.

5.3 Analyse de l'exploration plaquettaire

Les données expérimentales obtenues seront saisies en double saisie, avec contrôle des cohérences pour effectuer les analyses statistiques adéquates. L'analyse des données sera réalisée sur chaque site à l'aide des logiciels mis en œuvre au sein de chaque site (majoritairement logiciel PRISM). L'ensemble des variables de l'étude sera analysé. Les données manquantes seront justifiées. L'analyse des données comprend deux volets : descriptif et analytique.

L'analyse descriptive permettra de décrire les caractéristiques des résultats obtenus chez les patients et témoins. Au minimum, trois réplicats devront être réalisés pour chaque type d'expérimentation. Les variables qualitatives seront présentées sous la forme de proportions et les variables quantitatives seront présentées à l'aide des caractéristiques des tendances centrales (moyennes et écart-type...). Les variables qualitatives seront comparées selon le test du Chi-2 ou le test exact de Fisher si ce premier ne s'appliquait pas. Les variables quantitatives seront comparées selon les tests de Mann-Whitney et Kruskal-Wallis.

5.4 Analyse du séquençage d'exons

Le séquençage des exons sera sous-traité à une société privée selon la réglementation en vigueur et en maintenant l'anonymat des échantillons.

L'analyse bio-informative sera prise en charge par l'équipe du Dr Tregouët (cf Annexe 1) avec laquelle le site coordonnateur collabore depuis de nombreuses années.

Le séquençage des exons sera réalisé sur plusieurs membres de la famille concernée porteurs et non porteurs de la maladie plaquettaire. Les séquences obtenues seront alignées sur la séquence de référence du génome humain en utilisant le logiciel "BWA software". Les données de séquençage ayant un taux de couverture inférieur à 20 seront exclues de l'analyse et les régions dupliquées seront supprimées grâce à l'outil "Picard". La détection de variants génétiques sera réalisée grâce au logiciel GATK. L'annotation des variants génétiques ainsi détectés sera réalisée en utilisant SNPEFF et SNPSift.

Les filtres utilisés pour l'analyse des variants génétiques seront : une fréquence du SNP (Polymorphisme nucléotidique) < 1% (en utilisant les données ExAC, 1000H et ESP6500), SNP situé dans des régions codantes ou dans des jonctions d'épissage et prédites comme étant délétères par divers algorithmes (UMD Predictor, PROVEAN, Polyphen, GNOM).

Les séquences des variants génétiques ciblées seront ensuite vérifiées par séquençage Sanger.

6 Contrôle qualité

L'assurance et le contrôle de la Qualité, sous la responsabilité du promoteur, seront conduits conformément aux Bonnes Pratiques Cliniques (décision du 24 novembre 2006) afin de garantir le respect de l'intégrité des données recueillies, la protection des patients, le respect du protocole et de la législation en vigueur pendant toute la période d'inclusion et de suivi des patients par un attaché de recherche clinique mandaté par le promoteur.

La nature et la fréquence de monitoring sont établies selon la définition du niveau de monitoring en fonction du risque patient et dépendra du nombre de patients inclus, du rythme des inclusions et des difficultés constatées lors de la réalisation de l'étude (procédures validées par le groupe de travail

qualité de la promotion de la FHF qui détermine le niveau de monitoring à effectuer en fonction du risque pour le sujet - OECD Recommendation on the Governance of Clinical Trials, décembre 2012). Lors de cet essai, le niveau de monitoring est classé « minimal » avec un risque patient de catégorie A d'une étude interventionnelle impliquant la personne humaine. Il s'agira de vérifier les consentements. Si un/plusieurs consentements ne sont pas conformes, des dossiers seront monitorés de manière aléatoire.

6.1 Audit et inspection

Un audit peut être réalisé à tout moment par des personnes mandatées par le promoteur et indépendantes des personnes menant la recherche. Il a pour objectif de vérifier la sécurité des participants et le respect de leurs droits, le respect de la réglementation applicable et la fiabilité des données. Une inspection peut également être diligentée par une autorité compétente.

L'audit, aussi bien que l'inspection, pourront s'appliquer à tous les stades de la recherche, du développement du protocole à la publication des résultats et au classement des données utilisées ou produites dans le cadre de la recherche.

Les investigateurs acceptent de se conformer aux exigences du promoteur en ce qui concerne un audit et à l'autorité compétente pour une inspection de la recherche.

7 Surveillance de la recherche

Comité de gouvernance :

- Composition :

Pr. Marie-Christine Alessi (AP-HM), Dr. Rémi Favier (APHP), Dr. Sophie Voisin (CHU Toulouse), Dr. Mathieu Fiore (CHU Bordeaux), Dr. Marie-Françoise Hurtaud (AP-HP), Dr. Dominique Desprez (CHU Strasbourg) et Dr. Cécile Lavenu-Bombled (AP-HP).

Enrichi du médecin investigateur et des chercheurs concernés par la recherche.

- Rythme des réunions :

Calqué sur les réunions du comité de gouvernance du CRPP (environ une réunion tous les deux mois).

- Rôle :

- recenser les numéros d'inclusion (fiche de liaison « inclusion », Annexe 2) et prendre toute décision importante à la demande de l'investigateur coordonnateur concernant la bonne marche de la recherche et le respect du protocole ;
- vérifier le respect de l'éthique ;
- s'il est proposé de réaliser de nouvelles recherches biologiques à partir du matériel de la recherche par les personnes y participant et lorsqu'elles n'ont pas été prévues par le protocole initial (fiche d'inclusion), le Comité de gouvernance les étudie et définit les conditions d'information des participants. Ces modifications sont ensuite soumises au CPP pour avis (articles L.1123-9 et R.1123-42) ;
- à l'issue de la réunion, le comité de gouvernance doit informer le promoteur des décisions arrêtées. Les décisions concernant une modification majeure doivent être approuvées par le promoteur ;
- prendre connaissance des principaux résultats de l'exploration des plaquettes.

Investigateur coordonnateur :

Le Professeur Marie Christine Alessi est l'investigateur coordonnateur de ce projet. Elle aura pour rôle de :

- d'analyser les fiches d'inclusion et de fin de recherche en relation avec le comité de gouvernance ;

- s'informer auprès des médecins investigateurs de l'état d'avancement de la recherche et des problèmes éventuels ;
- décider de toute modification pertinente du protocole nécessaire à la poursuite de la recherche ;
- de mettre en œuvre le séquençage d'exons en accord avec le Comité de Gouvernance.

8 Droits d'accès aux données

8.1 Données sources

Ensemble des informations figurant dans des documents originaux, ou dans des copies authentifiées de ces documents, relatif aux examens cliniques et biologiques, aux observations ou à d'autres activités menées dans le cadre d'une recherche impliquant la personne humaine et nécessaires à la reconstitution et à l'évaluation de la recherche. Les documents dans lesquels les données sources sont enregistrées sont appelés les documents sources et sont conservés par l'investigateur au sein de son service hospitalier.

Les laboratoires de recherche n'auront accès qu'aux données anonymisées. Une table de concordance sera réalisée et détenue uniquement par le médecin investigateur du site concerné (cf Paragraphe 4.8.2 Pseudonymisation des échantillons).

8.2 Données d'exploration

Les données d'exploration correspondent aux données produites lors de la recherche. Ces données sont conservées au sein de l'équipe qui a effectué la recherche (cahier de laboratoire, etc.).

8.3 Accès aux données

Les médecins investigateurs ou co-investigateurs impliqués dans l'inclusion des patients seront les seuls à avoir accès aux données sources. Chaque médecin investigateur doit mettre en place une table de correspondance. Cette table ne sera pas communiquée au Comité de Gouvernance et sera sous la responsabilité et conservée par le médecin investigateur au sein de chaque centre. Seul l'investigateur coordonnateur pourra avoir accès à toutes tables de correspondance afin de vérifier le bon déroulement de l'étude.

La fiche de liaison « inclusion » (Annexe 2), les échantillons anonymes et les résultats issus de leur étude (données d'exploration) seront accessibles à l'ensemble des personnes et chercheurs du site investigateur impliqués dans le projet.

L'acceptation de la participation au protocole implique que les investigateurs mettent à disposition les documents et données individuelles strictement nécessaires au suivi, au contrôle qualité et à l'audit de la recherche impliquant la personne humaine, à la disposition des personnes ayant un accès à ces documents conformément aux dispositions législatives et réglementaires en vigueur (articles L.1121-3 et R.5121-13 du Code de la Santé Publique).

8.4 Confidentialité des données

Conformément aux dispositions législatives en vigueur (articles L.1121-3 et R.5121-13 du Code de la Santé Publique), le personnel médical ayant un accès direct aux données sources prendra toutes les précautions nécessaires en vue d'assurer la confidentialité des informations relatives aux personnes qui s'y prêtent et notamment en ce qui concerne leur identité ainsi qu'aux résultats médicaux obtenus dans le cadre du diagnostic. Le personnel médical est soumis au secret professionnel.

Les données recueillies sur les échantillons destinées au laboratoire de recherche seront rendues anonymes (cf fiche de liaison « inclusion » (Annexe 2) et Table de concordance). Elles ne doivent en aucun cas faire apparaître en clair les noms des personnes concernées ni leur adresse, ni leur date de naissance entière. Les modalités de codification des participants sont décrites dans le paragraphe 4.8 Circuit des échantillons biologiques.

9 Conservation des documents et des données relatives à la recherche

Les documents suivants relatifs à cette recherche sont archivés conformément aux Bonnes Pratiques Cliniques et à la réglementation en vigueur :

Pour une durée d'au moins 30 ans suivant la fin de la recherche impliquant la personne humaine autre que celle portant sur les médicaments à usage humain (article R.1123-61) :

- l'exemplaire original des consentements éclairés signés des participants ;
- les documents relatifs aux événements indésirables graves ;
- le protocole et les modifications éventuelles au protocole ;
- les dossiers sources des participants ayant signé un consentement ;
- tous les autres documents et courriers relatifs à la recherche impliquant la personne humaine.

Tous ces documents sont sous la responsabilité de l'investigateur du site pendant la durée réglementaire d'archivage. Aucun déplacement ou destruction ne pourra être effectué sans l'accord du promoteur. Au terme de la durée réglementaire d'archivage, le promoteur sera consulté pour destruction. Toutes les données, tous les documents et rapports pourront faire l'objet d'audit ou d'inspection.

10 Rapport final

Dans un délai d'un an suivant la fin de la recherche ou son interruption, un rapport final sera établi et signé par le promoteur et l'investigateur. Ce rapport sera tenu à la disposition de l'autorité compétente. Le promoteur transmettra à un CPP les résultats de la recherche sous forme d'un résumé du rapport final dans un délai d'un an après la fin de la recherche.

11 Règles relatives à la publication

L'investigateur coordonnateur s'engage à mettre à disposition du public les résultats de la recherche aussi bien négatifs et non concluants que positifs.

La publication des résultats principaux doit mentionner le nom du promoteur, de tous les investigateurs ayant inclus ou suivi des participants dans la recherche, des chercheurs, des méthodologistes, etc. ayant participé à la recherche et doit être diffusé au Comité de Gouvernance. Il sera tenu compte des règles internationales d'écriture et de publication

Conformément à la loi n°2002-303 du 4 mars 2002, les patients sont informés, s'ils le demandent, des résultats globaux de la recherche.

12 Aspects légaux et éthiques

a) Aspects légaux

Le promoteur de ce projet est représenté par l'Assistance Publique des Hôpitaux de Marseille. Une veille réglementaire sera réalisée par le Promoteur. Il soumettra le projet aux autorités responsables pour approbation.

Ce projet s'inscrit dans le cadre d'une recherche interventionnelle, impliquant la personne humaine (catégorie 2), au sens de l'article L.1121-1 alinéa 2 du Code de la Santé Publique.

Il est soumis au dispositif réglementaire qui s'applique aux recherches « impliquant la personne humaine », à savoir La loi n° 2012-300 du 5 mars 2012 relative aux recherches impliquant la personne humaine (dite loi Jardé) telle que modifiée par l'ordonnance n° 2016-800 du 16 juin 2016, et ses décrets d'application.

A ce titre, il fera l'objet d'une demande d'avis favorable auprès d'un Comité de Protection des Personnes.

Une notice d'information sera distribuée aux patients et un consentement éclairé sera recueilli. Ils seront rédigés conformément aux recommandations réglementaires, rappelant notamment l'objectif de l'étude, les bénéfices et les risques liés à cette étude, le déroulement de l'étude et l'ensemble des dispositions légales auquel les patients ont droit.

Cette recherche sera conduite selon les bonnes pratiques cliniques constituant un ensemble d'exigences de qualité dans les domaines éthique et scientifique, qui doivent être respectées lors de la planification, la mise en œuvre, la conduite, le suivi, le contrôle de qualité, l'audit, le recueil des données, l'analyse et l'expression des résultats. Le respect de ces bonnes pratiques cliniques garantit la protection des droits, la sécurité et la protection des personnes qui se prêtent à ces recherches et la préservation de leur anonymat ainsi que la crédibilité (intégrité, authenticité, vérifiabilité) et la précision des données et des résultats de ces recherches.

b) Loi informatique et libertés

Les données recueillies lors de l'étude font l'objet d'un traitement informatisé.

Conformément à la loi "Informatique et Libertés" n°78-17 du 6 janvier 1978 modifiée, ainsi qu'au Règlement Général sur le Protection des données (RGPD) n°2016/679 du 27 avril 2016, relatif à la protection des personnes physiques à l'égard du traitement des données à caractère personnel et à la libre circulation de ces données, ces données ne seront transmises qu'au promoteur et le cas échéant aux autorités sanitaires habilitées, dans des conditions garantissant leur confidentialité.

Concernant le traitement informatisé des données relatives à ce projet, qui a pour finalité la recherche dans le domaine de la santé, il entre dans le cadre d'exigences législatives, en particulier la loi du 9 août 2004 relative à la politique de santé publique et portera uniquement sur des données ne permettant pas une identification directe ou indirecte des personnes concernées. Il sera réalisé conformément à la méthodologie de référence homologuée par la Commission nationale de l'informatique et des libertés (CNIL) et établie en concertation avec le Comité d'expertise pour les recherches, les études et les évaluations dans le domaine de la santé (CEREES), élaborée dans le but de simplifier les formalités (Délibération n° 2018-153 du 3 mai 2018 portant homologation d'une méthodologie de référence relative aux traitements de données à caractère personnel mis en œuvre dans le cadre des recherches dans le domaine de la santé avec recueil du consentement de la personne concernée (MR-001) et abrogeant la délibération n° 2016-262 du 21 juillet 2016).

Le personnel médical et non médical impliqué dans cette recherche est soumis au secret médical et professionnel vis-à-vis des données recueillies au cours de l'étude sur les patients. Les informations recueillies auprès des patients resteront strictement confidentielles. Elles seront conservées sous un format papier à l'intérieur d'un local fermant à clé. Elles seront saisies sur un support informatique et bénéficieront d'un traitement informatisé. Ce traitement informatisé ne permettra pas l'identification directe ni indirecte des sujets. L'ensemble de ces données ne pourra être consulté que par l'investigateur principal et les représentants du Promoteur, ou encore être communiqué aux Autorités Sanitaires Habilitées si nécessaire.

Les sujets pourront accéder à leur fiche informatique en faisant la demande auprès d'un médecin investigateur. Les résultats globaux de l'étude pourront être communiqués aux sujets et à leurs représentants à leur demande, directement ou par l'intermédiaire d'un médecin de leur choix.

Le sujet sera informé de la nature des informations traitées, de leur finalité, de l'identité des personnes physiques et morales destinataires de ces données. Il conservera un droit d'accès, de rectification et d'effacement de ces données par l'intermédiaire d'un médecin de son choix ou du délégué à la protection des données de l'établissement promoteur, ainsi que d'un droit d'opposition à leur traitement.

c) Justification du bénéfice/risque attendu

Le patient n'aura pas de bénéfice direct à participer à cette étude.

Cette étude offre aux patients un bénéfice dit « collectif » dans la mesure où elle a pour but de mieux comprendre la physiopathologie des maladies plaquettaires.

Cette étude offre aux patients chez qui une anomalie sera observée un bénéfice individuel direct avec la mise en évidence d'une étiologie génétique et une meilleure compréhension de l'anomalie plaquettaire dont il souffre. Le patient pourra bénéficier d'une prise en charge thérapeutique ou préventive multidisciplinaire.

Pour un individu, les risques liés à la participation à cette étude sont ceux liés à la réalisation d'un prélèvement sanguin correspondant à la survenue d'un hématome ou d'une inflammation locale.

Il n'y a pas de rémunération des patients ou des témoins lors de cette étude.

13 . Vigilance de l'essai clinique

a) Définitions

1. Evénement indésirable

Toute manifestation nocive survenant chez une personne qui se prête à une recherche impliquant la personne humaine que cette manifestation soit liée ou non à la recherche.

2. Evénement Indésirable Grave (EIG)

Un événement indésirable grave est un événement :

- dont l'évolution est fatale,
- ou qui met en danger la vie de la personne qui se prête à la recherche,
- ou qui entraîne une incapacité ou un handicap important ou durable,
- ou qui provoque une hospitalisation ou une prolongation d'hospitalisation
- ou qui a pour conséquence une anomalie ou une malformation congénitale
- ou tout autre événement ne répondant pas aux qualifications énumérées ci-dessus, mais pouvant être considéré comme « potentiellement grave »
- ou événement médicalement pertinent selon le jugement de l'investigateur
- ou encore un événement nécessitant une intervention médicale pour prévenir l'évolution vers un des états précités.

b) Déclaration

Cette recherche faisant partie des recherches impliquant la personne humaine à risque et contraintes minimales, et conformément à la réglementation en vigueur, il appartiendra à l'investigateur de déclarer tout événement indésirable grave survenu au cours des investigations selon la procédure interne de déclaration d'un événement indésirable grave associé aux soins de son établissement (ex : VIGERIS..).

Si cette procédure de déclaration n'est pas applicable dans l'établissement, l'investigateur doit déclarer les événements indésirables observés selon le circuit en vigueur dans le service ou l'établissement concerné (ex : déclaration via la Plateforme de déclaration de l'ANSM..).

L'investigateur devra également préciser que le patient est inclus dans un essai clinique et identifier précisément le nom de l'essai.

En effet, il n'existe plus, pour cette catégorie de recherche, de vigilance spécifique à l'étude pour le promoteur (art L1123-10 CSP, dernier alinéa).

13 Calendrier

Nous prévoyons une durée d'étude de 5 ans. La durée d'inclusion est fixée à 4 ans. Le calendrier prévisionnel de l'étude dans sa totalité est présenté ci-dessous.

Date	Action
Début 2020	Demande autorisations : CPP
	Réunion du Comité de Gouvernance et démarrage de l'étude et communication avec les différents investigateurs
	Début des inclusions
	Fin des inclusions

14 Budget

Le budget de la recherche ainsi que les frais de transport des échantillons seront à la charge des investigateurs concernés par la recherche (dotation INSERM, fonds associatifs ou fondations ...).

15 Retombée attendue

Ce travail vise à mieux comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires qui conduisent à l'apparition d'anomalies de la production et des fonctions plaquettaires. Les résultats de ces recherches seront diffusés à la communauté scientifique afin d'améliorer le diagnostic et la prise en charge des patients. Sur le plan individuel ce projet apportera une meilleure prise en charge des individus et de leur famille (prise en charge, enquête familiale, diagnostic prénatal si nécessaire ...).

ANNEXES

ANNEXE 1**Principaux Correspondants****◆ Responsable de la recherche au niveau du promoteur :****Assistance publique - Hôpitaux de Marseille****CHU Timone - Centre de référence sur les pathologies plaquettaires (CRPP)**

264, Rue Saint-Pierre. 13385 Marseille Cedex 5

◆ Investigateur coordonnateur :**Pr. Marie-Christine ALESSI**

Service d'Hématologie Biologique & Centre de Référence sur les Pathologies Plaquettaires (CRPP)

CHU de Marseille - Hôpital de la Timone. 264, Rue Saint-Pierre. 13385 Marseille Cedex 5

Nutrition Obésité et Risque Thrombotique - INSERM U1062

Faculté de Médecine de la Timone. 27, Boulevard Jean Moulin. 13005 MARSEILLE

33 (0)4 91 32 45 06

marie-christine.alessi@univ-amu.fr**◆ Centres impliqués dans le projet de recherche :****1. Centre Marseille (CHU et INSERM) (Site Coordonnateur CRPP)**Investigateur principal**Pr. Marie-Christine ALESSI**

Service d'Hématologie Biologique & Centre de Référence sur les Pathologies Plaquettaires (CRPP)

CHU de Marseille - Hôpital de la Timone. 264, Rue Saint-Pierre. 13385 Marseille Cedex 5

Nutrition Obésité et Risque Thrombotique - INSERM U1062

Faculté de Médecine de la Timone. 27, Boulevard Jean Moulin. 13005 MARSEILLE

33 (0)4 91 32 45 06

marie-christine.alessi@univ-amu.frCollaborateurs de l'investigateur**Médecins consultants CEHT/CRPP****Pr. Pierre MORANGE**

CHU de Marseille - Hôpital de la Timone. 264, Rue Saint-Pierre. 13385 Marseille Cedex 5

33 (0) 4 91 38 60 48

pierre.morange@ap-hm.fr**Dr. Céline FALAISE**

Service d'Hématologie Biologique & Centre de Référence sur les Pathologies Plaquettaires (CRPP)

CHU de Marseille - Hôpital de la Timone. 264, Rue Saint-Pierre. 13385 Marseille Cedex 5

33 (0)4 91 38 57 86

celine.falaise@ap-hm.fr**Dr. Catherine POUYMAYOU**

Service d'Hématologie Biologique & Centre de Référence sur les Pathologies Plaquettaires (CRPP)

CHU de Marseille - Hôpital de la Timone. 264, Rue Saint-Pierre. 13385 Marseille Cedex 5

33 (0)4 91 38 57 86

catherine.pouymayou@ap-hm.fr**Biologie moléculaire****Dr. Noémie SAUT** Service d'Hématologie Biologique & Centre de Référence sur les Pathologies Plaquettaires (CRPP)

CHU de Marseille - Hôpital de la Timone. 264, Rue Saint-Pierre. 13385 Marseille Cedex 5

33 (0)4 91 38 79 30

noemie.saut@ap-hm.fr

Phénotypage plaquettaire spécialisé**Dr. Matthias CANAULT & Dr. Marjorie POGGI**

C2VN (Centre recherche en CardioVasculaire et Nutrition - INSERM 1062 Faculté de Médecine Timone. 27, Boulevard Jean Moulin. 13385 Marseille
33 (0)4 91 32 45 07 matthias.canault@univ-amu.fr marjorie.poggi@univ-amu.fr

2. Centre Toulouse (CHU et INSERM) (Site Constitutif du CRPP)Investigateur**Dr. Sophie VOISIN**

Hôpital Rangueil – Laboratoire d'Hématologie. 1, Avenue du Professeur Jean Poulhès - TSA 50032. 31059 Toulouse cedex 9
33 (0)5 61 32 28 17 voisin.s@chu-toulouse.fr

Unité de Recherche associée**Pr. Bernard PAYRASTRE**

Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires (I2MC) – Inserm UMR 1048
Faculté Paul Sabatier 1 avenue Jean Poulhès – 31432 Toulouse Cedex 4
33 (0)5 61 77 75 25 bernard.payrastre@inserm.fr

3. Centre Bordeaux (CHU) (Site Constitutif du CRPP)Investigateur**Dr. Mathieu FIORE**

CHU de Bordeaux-GH Sud – Hôpital Haut-Lévêque – Laboratoire d'Hématologie. 1, Avenue Magellan. 33604 Pessac Cedex
33 (0)5 57 65 64 78 mathieu.fiore@chu-bordeaux.fr

4. Centre Robert Debré (CHU et INSERM) (Centre de Ressources et de Compétences)Investigateurs**Dr. Marie-Françoise HURTAUD et Dr. Anne VINCENOT**

Hôpital Robert Debré. 48, Boulevard Serrurier. 75019 Paris
33 (0)1 40 03 41 94 marie-francoise.hurtaud@aphp.fr anne.vincenot@aphp.fr

Unité de Recherche associée**Dr. Christilla BACHELOT-LOZA**

UMR_S1140. Faculté de Pharmacie de Paris. 4, avenue de l'Observatoire. 75006 Paris
33 (0)1 53 73 99 39 christilla.bachelot-loza@parisdescartes.fr

5. Centre Armand Trousseau (CHU et INSERM) (Site Constitutif du CRPP)Investigateur**Dr. Rémi FAVIER**

CHU Paris Est – Hôpital Armand-Trousseau – Hématologie Biologique. 26, Avenue du Dr Arnold Netter. 75571 Paris Cedex 12
33 (0)1 44 73 62 22 remi.favier@aphp.fr

Unité de Recherche associée**Dr. Hana RASLOVA**

Institut Gustave Roussel – Inserm UMR 1170
114, rue Édouard-Vaillant. 94805 Villejuif
33 (0)1 42 11 42 33 hana.raslova@inserm.fr

6. Centre de Necker (CHU) (Centre de Ressources et de Compétences)**Dr. Annie HARROCHE**

Service d'Hématologie Clinique. Centre de Traitement de l'Hémophilie. Hôpital Necker Enfants Malades. 149, Rue de Sèvres. 75015 Paris.

33 (0)1 44 49 52 75 annie.harroche@aphp.fr

7. Centre de Bicêtre (CHU et INSERM) (Centre de Ressources et de Compétences)Investigateur**Dr. Cécile LAVENU-BOMBLED**

Hôpital de Bicêtre. 78, Rue du Général Leclerc. 94275 Le Kremlin Bicêtre

33 (0)1 45 21 20 06 cecile.lavenu-bombled@aphp.fr

Unité de Recherche associée à Necker et Bicêtre**Dr. Cécile DENIS**

INSERM U1176, Hémostase Inflammation Thrombose

Hôpital de Bicêtre. 78, Rue du Général Leclerc. 94275 Le Kremlin Bicêtre

33 (0)1 49 59 56 00 cecile.denis@inserm.fr

8. Centre de Tours (CHU) (Centre de Ressources et de Compétences)Investigateur**Pr. Yves GRUEL et Pr. Claire POUPLARD**

CHRU de Tours – Hôpital Trousseau. Avenue de la République. 37044 Tours Cedex 9

33 (0)2 47 47 46 72 et 33 (0)2 18 37 06 31

gruel@med.univ-tours.fr claire.pouplard@univ-tours.fr

9. Centre de Strasbourg (CHU et INSERM) (Centre de Ressources et de Compétences)Investigateur**Dr. Dominique DESPREZ**

Hôpitaux Universitaires Strasbourg. 1 Place de l'Hôpital. 67000 Strasbourg

33 (0)3 88 12 83 71 dominique.desprez@chru-strasbourg.fr

Unité de Recherche associée**Pr. Christian GACHET et Dr. Arnaud DUPUIS**

INSERM UMR1255- Laboratoire d'hématologie biologique

EFS Alsace – 10 Rue Spielmann. 67065 Strasbourg

33 (0)3 88 21 25 25 christian.gachet@efs.sante.fr arnaud.dupuis@efs.sante.fr

10. Centre de Lille (Centre de Ressources et de Compétences)Investigateur**Pr. Sophie SUSEN**

CHRU de Lille. Boulevard du Pr Jules Leclercq. 59037 Lille

33 (0)3 20 44 59 62 sophie.susen@chru-lille.fr

11. Centre de Bichat (CHU et INSERM) (Centre de Ressources et de Compétences)Investigateur**Pr. Nadine AJZENBERG**

CHU Paris Nord-Val de Seine - Hôpital Xavier Bichat-Claude Bernard.

46 rue Henri Huchard 75018 Paris

33 (0)1 40 25 85 21 nadine.ajzenberg@aphp.fr

Unité de Recherche associée

Dr. Yacine BOULAFTALI

Laboratoire de recherche vasculaire translationnelle. Unité 1148 Inserm CHU Bichat.

46, rue Henri Huchard. 75018 Paris

33 (0)1 40 25 86 00

yacine.boulaftali@inserm.fr

◆ **INSERM Bordeaux**

Analyse des données génomiques

Investigateur

Dr. David Alexandre TREGOUËT

Inserm 1166 - Génomique et physiopathologie des maladies cardiovasculaires. 146, Rue Léo

Saignat. 33000 Bordeaux

33 (0)5 57 57 45 31

david-alexandre.tregouet@inserm.fr

◆ **Unité de sécurité et de vigilance de la recherche clinique :**

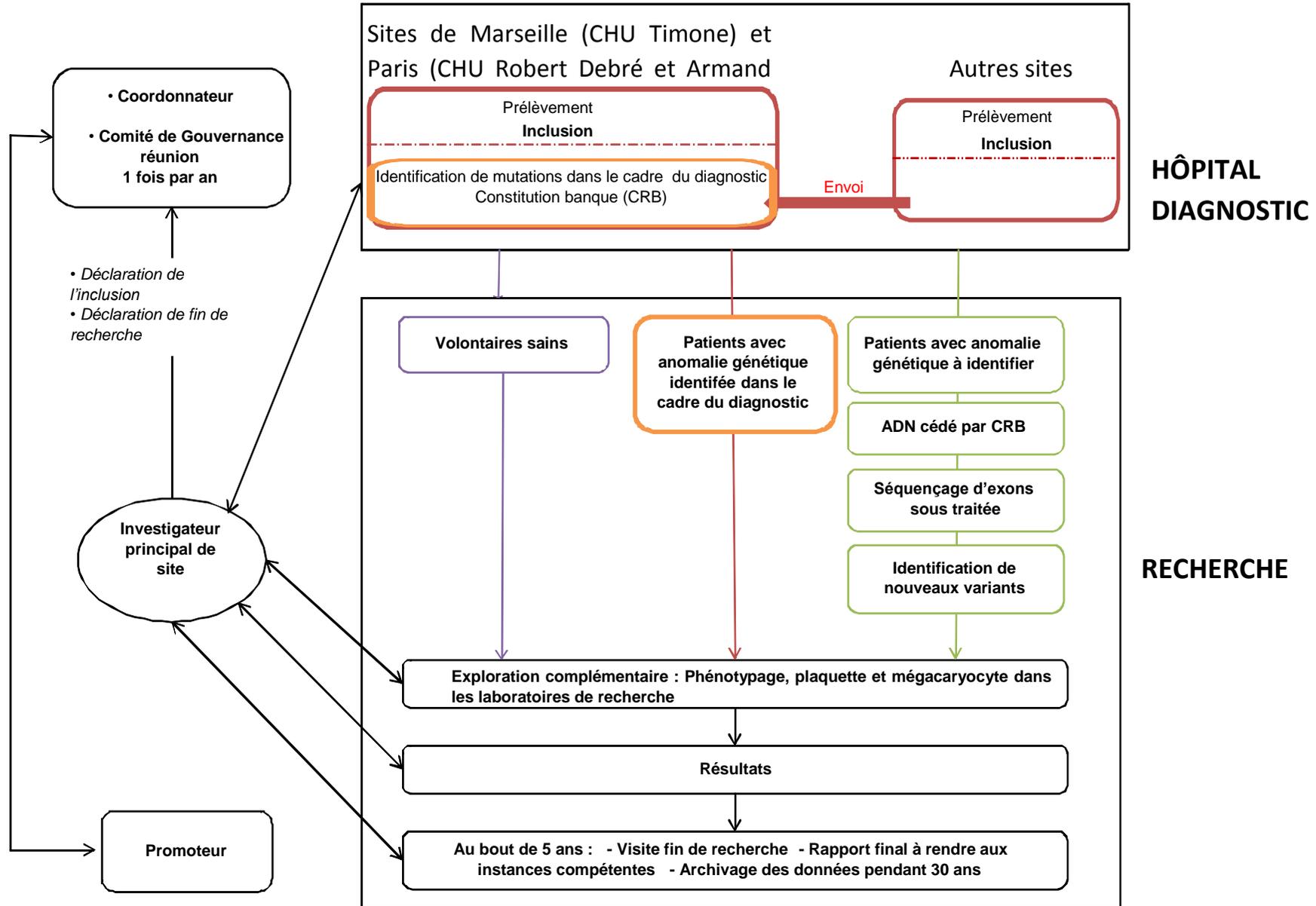
Assistance publique - Hôpitaux de Marseille

264, Rue Saint-Pierre. 13385 Marseille Cedex 5

ANNEXE 2**Fiche de liaison « INCLUSION »****Dates des prélèvements :**1) 2) 3)

<u>Site Investigateur :</u>	
<u>Nom du Médecin Investigateur :</u>	
<u>Données démographiques du participant :</u>	Année de naissance <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> Sexe F <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
<u>Code d'identification du patient:</u>	
<u>Nombre de tubes prélevés :</u>	1) 2) 3)
<u>Volume de sang prélevé :</u>	1) 2) 3)
<u>Analyses envisagées :</u>	1) 2) 3)
<u>Anomalie génétique connue :</u>	OUI <input type="checkbox"/> NON <input type="checkbox"/>

ANNEXE 3



ANNEXE 4**Fiche de liaison « FIN DE RECHERCHE »****Date :**

|_| |_| |_| |_| |_| |_| |_| |_| |_| |_|

<u>Site Investigateur :</u>	
<u>Nom du Médecin Investigateur :</u>	
<u>Code des patients :</u>	
<u>Code des témoins prélevés :</u>	
<u>Description brève des principaux résultats :</u>	