

ÉCOLE DOCTORALE VIE ET SANTE (ED 414)

Thèse présentée par **Arnaud DUPUIS**

Unité INSERM UMR S949

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Soutenue le : **14 Décembre 2015**

Discipline/S spécialité : Hématologie et physiopathologie vasculaire

**DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE, CARACTERISATION
MOLECULAIRE ET IDENTIFICATION DE NOUVEAUX
GENES IMPLIQUES DANS DES THROMBOPATHIES
CONGENITALES NON ETIQUETTES**

Thèse dirigée par :

M. GACHET Christian, Professeur conventionné, université de Strasbourg

Membres du Jury :

Mme GOUDEMAND Jenny, Professeur, université de Lille II (Rapporteur)

Mme ALESSI Marie-Christine, Professeur, université d'Aix-Marseille (Rapporteur)

Mme DOLLFUS Hélène, Professeur, université de Strasbourg

Remerciements

Je remercie en premier lieu M. Christian Gachet pour m'avoir permis d'intégrer l'Etablissement Français du Sang Alsace à la fin de l'année 2012 immédiatement après la fin de mon internat. Bien qu'étant déjà biologiste spécialisé en hématologie, l'EFS Alsace et l'unité INSERM UMR S949 m'ont réellement fait redécouvrir l'univers passionnant des plaquettes sanguines. M. Gachet m'a très rapidement fait confiance dans l'exercice de ma profession de biologiste et il m'a donné les moyens nécessaires à la réalisation de ce travail. Cette thèse d'université n'aurait jamais pu être menée à son terme sans son soutien aussi bien durant ces trois années de doctorat que durant la rédaction de ce manuscrit. Je vous adresse M. Gachet un très grand merci.

Je voudrais également rendre hommage aux trois techniciennes du laboratoire d'exploration des fonctions plaquettaires : Véronique Heim, Dominique Cassel et Patricia Laeuffer. C'est grâce aux explorations que nous avons réalisées ensemble que cette thèse d'université a pu aboutir. J'ai une pensée particulière pour Véronique qui m'a aidé quotidiennement lors de la rédaction de ce manuscrit. Merci Véro pour les nombreuses relectures et toute l'aide que tu m'as apportée lors de la mise en page et l'impression de ce document.

Un grand merci également à Amandine Baron pour son efficacité redoutable pour traquer les coquilles au sein de ce manuscrit. Quel plaisir de pouvoir travailler avec une personne aussi efficace !

Merci également à tout le personnel de l'EFS Alsace et aux membres de l'équipe INSERM UMR S949 pour les discussions que nous avons eu ensemble et pour tous les conseils que vous avez pu me donner.

Enfin, je voudrais remercier ma femme Amélie, qui, malgré son travail très prenant m'a écouté au quotidien (ou devrais-je plutôt dire supporté...) et qui m'a apporté toute son expertise dans la maîtrise des logiciels de bureautique. Merci de t'être occupée seule de notre fils Valentin durant ces dernières semaines malgré ta grossesse bien avancée. Je n'aurais jamais pu réaliser ce travail sans ton soutien indéfectible.

Liste des abréviations

2MeSADP :	2-(Methylthio)adenosine5'-diphosphate
AA	Acide Arachidonique
AC :	Adénylate Cyclase
ADN :	Acide Désoxyribonucléique
ADP :	Adénosine Diphosphate
Afssaps :	Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé
AMPC :	Adénosine Monophosphate cyclique
ANAES	Agence Nationale d'Accréditation et d'Evaluation en Santé
ANSM :	Agence Nationale de Sécurité du médicament et des produits de santé
ARNm :	Acide Ribonucléique messager
ATP :	Adénosine Triphosphate
BLOCs :	Biogenesis of Lysosome Related Organelle Complexes
BSS :	Syndrome de Bernard Soulier
CCPP :	Centre de Compétences pour l'étude des pathologies Plaquettaires
CRPP :	Centre de Référence des Pathologies Plaquettaires
CSH :	Cellule souche Hématopoïétique
DAG :	Diacide Glycérol
DTT :	Dithiothréitol
ELISA :	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ENTPD2 :	Ecto-Nucléotide Triphosphate Diphosphohydrolase 2
FSK :	Forskolin
FT :	Facteur de Transcription
GAPDH :	Glyceraldéhyde-3-Phosphate Déshydrogénase
GDP :	Guanine Diphosphate
GTP :	Guanine Triphosphate
GZ :	Glanzmann
HA :	Héماغglutinine
HPLC :	Chromatographie Liquide Haute Performance
IBMX :	3-Isobutyl-1-Methylxanthine
INSERM :	Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale
IP3 :	Inositol 1,4,5 diphosphate
IPD :	Inherited Platelet disorder
IPF :	Immature Platelet Fraction
ISTH :	International Society of Thrombosis and Haemostasis
KO	Knockout
MET :	Microscopie Electronique à Transmission
MGG :	May Grünwald Giemsa
NGS :	Next Generation Sequencing
OMS :	Organisation Mondiale de la Santé
PCR :	Polymerase Chain Reaction
PGE1 :	Prostaglandine E1
PGI2 :	Prostacycline

PI3K :	Phosphoinositide3-Kinase
PIP2 :	Phosphatidyl Inisitol 4,5-diphosphate
PLC :	Phospholipase C
PRPc :	Plasma citraté Riche en Plaquettes
RCPG :	Récepteur couplé aux Protéines G
SDS :	Sodium Dodecyl Sulfate
SEM :	Scanning Electron Microscopy
SNARE	Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein REceptor
SPD :	Storage Pool Disease
TXA ₂ :	Thromboxane A ₂
VASP :	Vasodilator Stimulated Phosphoprotein
VNUT :	Vesicular Nucleotides Transporter
VPM :	Volume Plaquettaire Moyen
VWF :	Facteur Willebrand

Table des matières

Table des illustrations.....	3
1 Introduction	6
1.1 Un peu d'histoire	7
1.1.1 Observations cliniques et microscopie optique	7
1.1.2 Agrégométrie et microscopie électronique.....	8
1.1.3 L'essor de la biochimie des protéines	9
1.1.4 Le développement des anticorps monoclonaux.....	10
1.1.5 L'ère de la biologie moléculaire.....	11
1.2 Les plaquettes sanguines : origine, structure et fonctions dans l'hémostase primaire	14
1.2.1 Origine des plaquettes sanguines.....	14
1.2.2 Structure des plaquettes sanguines	15
1.2.3 Physiologie plaquettaire au cours de l'hémostase primaire.....	20
1.3 Diagnostic et classification des thrombopathies.....	28
1.3.1 Stratégie diagnostique des thrombopathies	28
1.3.2 Présentation des principales thrombopathies.....	40
1.4 Problématique de la thèse.....	52
2 Diagnostic des thrombopathies liées à des anomalies du récepteur P2Y ₁₂ et caractérisation des variants du récepteur identifiés au laboratoire.....	53
2.1 Le récepteur P2Y ₁₂	53
2.2 Le récepteur P2Y ₁₂ au cours de l'activation des plaquettes.....	55
2.3 Diagnostic des anomalies du récepteur P2Y ₁₂	56
2.4 Les différents mutations décrites pour le récepteur P2Y ₁₂	58
2.5 Les variants du récepteur P2Y ₁₂ identifiés et caractérisés au laboratoire.....	59
2.5.1 Mutation p.His187Gln du récepteur P2Y ₁₂	59
2.5.2 Mutation p.Tyr259Cys du récepteur P2Y ₁₂	69
2.5.3 Mutation p.Phe95Ser du récepteur P2Y ₁₂	73
2.6 Diagnostic et caractérisation des anomalies du récepteur P2Y ₁₂ : discussion.....	77

3	Recherche des gènes impliqués dans les maladies du pool vide non syndromiques (δ -SPD).....	79
3.1	Définition des δ -SPD et stratégie diagnostique.....	79
3.2	La découverte des δ -SPD	80
3.3	Biogénèse et sécrétion des granules denses plaquettaires	80
3.3.1	Biogénèse des granules denses.....	80
3.3.2	Sécrétion des granules denses au cours de l'agrégation plaquettaire	81
3.4	Les différents types de maladies du pool vide.....	82
3.4.1	Les δ -SPD syndromiques	82
3.4.2	Les formes non syndromiques.....	83
3.5	Recherche des gènes impliqués dans les maladies du pool vide non syndromiques avec déficit isolé en ADP	84
3.5.1	Exploration de la famille S et du propositus SJ.....	84
3.5.2	Recherche des gènes impliqués dans la maladie du pool vide non syndromique diagnostiquée chez certains membres de la famille S	88
3.6	Recherche des gènes impliqués dans la maladie du pool vide non syndromique : conclusion/discussion	95
4	Diagnostic et caractérisation des thrombopathies : discussion et perspectives	96
5	Annexes.....	105
5.1	Annexe 1.....	105
5.2	Annexe 2.....	124
5.3	Annexe 3.....	144
5.4	Annexe 4.....	154
6	Bibliographie.....	161

Table des illustrations

Figure 1 : <i>Différenciation mégacaryocytaire et production des plaquettes sanguines dans la moelle osseuse</i>	15
Figure 2 : <i>Schéma d'une plaquette sanguine</i>	17
Figure 3 <i>Principaux constituants des organelles plaquettaires</i>	19
Figure 4: <i>représentation des différents domaines du facteur Willebrand et de leurs rôles physiologiques respectifs</i>	21
Figure 5 : <i>Structure générale du complexe GPIb-V-IX et principales voies de signalisation en aval du complexe</i>	22
Figure 6 : <i>Structure générale de la GPVI et principales voies de signalisation associées</i>	23
Figure 7 : <i>Principales voies de signalisation au cours de l'activation plaquettaire</i>	25
Figure 8 : <i>Activation de l'intégrine $\alpha IIb\beta 3$</i>	27
Figure 9 : <i>Immunofluorescence indirecte réalisée sur des frottis sanguins fixés</i>	30
Figure 10 : <i>Plaquettes sanguines en microscopie électronique à transmission</i>	31
Figure 11 : <i>Courbe typique d'agrégation des plaquettes humaines en PRPc après stimulation par le collagène</i>	33
Figure 12 : <i>Courbes normales d'agrégaions plaquettaires</i>	35
Figure 13 : <i>Stratégie diagnostique préconisée par un groupe de travail du comité de standardisation de l'ISTH et applicable au laboratoire de l'EFS Alsace</i>	39
Figure 14 : <i>Fréquences observées des différentes thrombopathies et thrombopénies constitutionnelles étiquetées et non étiquetées en 2012</i>	40
Figure 15 : <i>Arbre généalogique des patients BSS de l'île de la Réunion</i>	48
Figure 16 : <i>Structure linéaire du récepteur $P2Y_{12}$</i>	53
Figure 17 : <i>Représentation en trois dimensions du récepteur $P2Y_{12}$ cristallisé</i>	54
Figure 18 : <i>Voies d'activation en aval des récepteurs $P2Y_1$ et $P2Y_{12}$</i>	55
Figure 19 : <i>Régulation de la quantité d'AMPc intracellulaire et de l'état de phosphorylation de la protéine VASP après stimulation des plaquettes par l'ADP ou la PGE_1 (ou PGI_2)</i>	57
Figure 20 : <i>Structure linéaire (à gauche) et tridimensionnelle du récepteur $P2Y_{12}$ et localisation des trois mutations identifiées au laboratoire</i>	60
Figure 21 : <i>Agrégations plaquettaires réalisées chez le patient III-1 et chez un témoin du jour</i>	61
Figure 22 : <i>Dosage de l'AMPc en radio-immunologie chez les plaquettes témoins (bleues) et les plaquettes du patient III-1 (rouge)</i>	62
Figure 23: <i>Expérience de saturation effectuée sur des plaquettes témoin (à gauche) et sur des plaquettes du patient III-1 (à droite)</i>	63

Figure 24 : <i>Expérience de compétition entre une concentration fixe de [³H]PSB-0413 (20 nM) et des concentrations croissantes d'ADP (à gauche) ou de 2MeSADP (à droite)</i>	64
Figure 25 : <i>Méthode de transfection permettant l'obtention de cellules 1321N1 ayant incorporé le plasmide pcDNA3 portant le cDNA du récepteur P2Y₁₂ sauvage (cellules WTD12) ou muté (cellules CATC3)</i>	65
Figure 26 : <i>Expérience de saturation effectuée sur des cellules 1321N1 transfectées avec le récepteur P2Y₁₂ sauvage (à gauche) et sur des cellules 1321N1 transfectées avec le récepteur muté (à droite)</i>	66
Figure 27 : <i>Expérience de compétition entre une concentration fixe de [³H]PSB-0413 (20 nM) et des concentrations croissantes d'ADP (à gauche) ou de 2MeSADP (à droite) (N=3)</i>	67
Figure 28 : <i>Quantification de l'AMPc en radioimmunologie sur des cellules 1321N1 WTD12 transfectées avec le récepteur P2Y₁₂ sauvage (noir) et sur des cellules 1321N1 CATC3 transfectées avec le récepteur P2Y₁₂ muté (blanc)</i>	68
Figure 29 : <i>Agrégations plaquettaires réalisées chez le patient CJP et chez un témoin du jour</i>	70
Figure 30 : <i>Expérience de saturation effectuée sur des plaquettes témoin (à gauche) et sur des plaquettes de CJP (à droite)</i>	71
Figure 31 : <i>Quantification de l'AMPc dans les plaquettes du patient (en rouge) et dans les plaquettes témoins (en bleu)</i>	72
Figure 32 : <i>Agrégations plaquettaires réalisées chez la patiente KC et chez un témoin du jour</i>	74
Figure 33 : <i>Evaluation de l'affinité [³H]PSB-0413 pour le récepteur P2Y₁₂ du quantification des récepteurs plaquettaires chez la patiente KC, son père KM et sa mère KT</i>	75
Figure 34 : <i>Agrégations plaquettaires réalisées en PRPc chez le propistus (SJ) et chez un témoin du jour (CTRL)</i>	85
Figure 35 : <i>Agrégations plaquettaires réalisées en plaquettes lavées chez le propositus (SJ, courbes rouges) et chez un témoin du jour (courbes bleues)</i>	86
Figure 36 : <i>Dosage des nucléotides plaquettaires</i>	87
Figure 37 : <i>Plaquettes du propositus (SJ) observées en microscopie électronique à transmission</i>	87
Figure 38 : <i>Arbre généalogique de la famille S</i>	88
Figure 39 : <i>Schéma résumé de la stratégie d'analyse bio-informatique et des scénarios de transmission appliqués à la suite du séquençage d'exome de la famille S</i>	91
Figure 40 : <i>Le transporteur de nucléotides VNUT</i>	92
Figure 41 : <i>Immuno-empreintes (Western blot) réalisées sur un lysat de plaquettes témoin ou de plaquettes du patients SJ</i>	93
Figure 42 : <i>Liste des gènes candidats qui présentent des mutations chez le père du propositus (SF) ainsi que chez les trois enfants atteints (SJ, SCH et SM)</i>	94
Figure 43 : <i>Observation en microscopie électronique des plaquettes d'une patiente atteinte d'une maladie du pool vide non syndromique avec rapport ATP/ADP > 10</i>	99
Figure 44 : <i>Immunomarquages réalisés sur des lysats de plaquettes d'un témoin ou d'un patient atteint d'un syndrome des plaquettes grises associé à un déficit en GPVI</i>	100

Figure 45 : <i>Arbre décisionnel dédié au diagnostic des anomalies des voies de l'ADP au cours de l'activation des plaquettes.</i>	103
--	-----

1 Introduction

La première description morphologique et fonctionnelle des plaquettes sanguines réalisée il y a environ 130 ans par Giulio Bizzozzero, fut la première étape d'une longue suite de découvertes qui permit la caractérisation de la physiologie plaquettaire au cours de l'hémostase primaire. Nous savons aujourd'hui que les plaquettes sanguines sont, avec le facteur Willebrand et la matrice sous-endothéliale riche en collagène, les acteurs essentiels de la formation du clou plaquettaire nécessaire à l'arrêt des saignements. Ce mécanisme fait intervenir de nombreux récepteurs plaquettaires qui participent aux étapes d'adhésion, d'activation et d'agrégation plaquettaire. Les anomalies des récepteurs plaquettaires ou des voies de signalisation en aval de ceux-ci entraînent alors des pathologies plaquettaires au potentiel hémorragique hétérogène. Grâce à la mise au point des techniques d'agrégation plaquettaire en turbidimétrie, à l'observation des plaquettes en microscopie électronique, aux différentes techniques de biochimie des protéines et à l'expansion de la biologie moléculaire, nous connaissons dorénavant les mécanismes moléculaires et les anomalies génétiques qui conduisent à certaines thrombopathies comme la maladie de Glanzmann ou le syndrome de Bernard-Soulier. Une dizaine de pathologies plaquettaires liées à des anomalies des principaux récepteurs (GZ, BSS, GPVI, P2Y12, TP α), à des anomalies de facteurs de transcription (RUNX1, GATA-1, FLI1) ou à des anomalies du cytosquelette plaquettaire (MYH9, WAS) sont ainsi bien caractérisées. Cependant, de nouvelles mutations sont régulièrement mises en évidence et nécessitent toujours une étude approfondie afin de confirmer la relation entre la mutation détectée et le phénotype observé chez les patients. En complément, les études génétiques essentiellement réalisées chez des familles porteuses de thrombopathies congénitales ont plus récemment permis d'identifier les gènes responsables de maladies plaquettaires parfois étudiées depuis des d'années. C'est le cas notamment du syndrome des plaquettes grises rapporté dès les années 70 et dont nous savons dorénavant qu'il est dû à des mutations de deux gènes : *NBEAL2* ou *GFI1B*. Les grandes études génétiques récentes ont par ailleurs permis l'identification de nombreux gènes impliqués dans des thrombopathies non étiquetées touchant l'ultrastructure plaquettaire (*TUBB1*, *FLNA*, *ACTN1*), ainsi que certaines voies de signalisation (*ANKRD26*, *FERMT3*, *RASGRP2*, *PRKACG*, *TMEM16F*). Malgré la mise en évidence de toutes ces nouvelles entités syndromiques ou non syndromiques, la plupart des auteurs considèrent qu'à ce jour, au moins 50% des thrombopathies ne sont pas encore étiquetées et par conséquent non diagnostiquées. Cette situation peut s'expliquer en partie par la faible fréquence de ces pathologies dans la population générale et par le faible nombre de laboratoires spécialisés dans l'étude des plaquettes sanguines. Les progrès de la génétique et des techniques de séquençage à haut débit sont une opportunité pour accélérer l'identification des gènes responsables de ces maladies. Néanmoins, un effort collectif s'avère nécessaire pour tenter de combler les lacunes dans nos connaissances. Ainsi, c'est dans le cadre du réseau national d'étude des pathologies plaquettaire, que le laboratoire d'hémostase de l'EFS Alsace et l'unité INSERM UMR S949 travaillent de concert à l'étude et à la caractérisation des maladies plaquettaires diagnostiquées dans la partie Nord-Est de la France. En collaboration avec les CHU du Grand-Est, la centralisation des explorations

plaquettaires complexes permet de disposer de moyens suffisants pour la réalisation des explorations et de développer une expertise adaptée à l'identification de ces pathologies encore peu connues. Les échanges permanents entre cliniciens, biologistes et chercheurs de cette grande région permettent le recrutement d'un grand nombre de cas impossibles à réunir de manière isolée. Grâce à cette démarche coopérative, nous avons eu la possibilité d'étudier à l'EFS Alsace de nombreux types de thrombopathies (syndrome des plaquettes grises, déficit en GPVI, variant du récepteur P2Y₁₂, syndromes de Bernard-Soulier, maladie de Glanzmann, maladies du pool vide). Afin de limiter ce manuscrit aux explorations les plus abouties réalisées depuis 2013, nous avons choisi de présenter l'étude et la caractérisation de trois nouvelles mutations du récepteur P2Y₁₂ identifiées dans trois familles différentes ainsi que l'étude d'une famille porteuse d'une maladie du pool vide.

1.1 Un peu d'histoire

1.1.1 Observations cliniques et microscopie optique

La première description des plaquettes sanguines répertoriée remonte à la fin du XVII^{ème} siècle et est attribuée à Antoni van Leeuwenhoek qui présenta ses observations sur le sang à la « Royal society of London » en 1675. Le siècle suivant Hewson donna en 1780 la première description morphologique des plaquettes en parlant de « very small undefined particle in blood ». Mais c'est le Français George Hayem qui, entre 1878 et 1879 (Hayem, 1879) (Hayem, 1878) établit une description précise des plaquettes en parlant de corpuscules ayant l'apparence de petites hématies pâles et « très délicates ». Il évoqua déjà à l'époque la capacité de ces éléments à adhérer aux autres composants du sang et à former des agrégats. Cependant, George Hayem émit l'hypothèse d'une origine érythroïde de ces cellules. Les plaquettes sanguines furent finalement considérées comme un troisième type cellulaire sanguin suite aux travaux de Giulio Bizzozzero qui en 1882 évoqua également les propriétés hémostatiques de ces éléments figurés du sang. Il décrivit alors les plaquettes comme étant des cellules de forme biconvexe de 2 à 3 µm de diamètre circulant à la fois dans les veines et les artères. Il démontra également à l'époque que ces cellules étaient capables d'adhérer sur une surface de verre ou sur un endothélium lésé, de changer rapidement de forme, d'émettre de longues protrusions et de former des agrégats composés de plaquettes, de quelques leucocytes, d'hématies ainsi que de fibrine. Il en conclut alors que « le thrombus est constitué de quelques leucocytes inclus dans une grosse masse plaquettaire » et que « ce thrombus devait être d'une importance capitale pour l'arrêt des hémorragies grâce à sa capacité à boucher les brèches vasculaires (Bizzozzero, 1881, Bizzozzero, 1882). L'hypothèse de l'implication des plaquettes sanguines dans l'arrêt du saignement fut confirmée en 1890 par George Hayem. Ce dernier fit le lien entre la présence d'une thrombopénie chez les patients et l'observation d'une tendance hémorragique. Par la suite Duke montra en 1910 que le test clinique du temps de saignement par incision du lobe de l'oreille était prolongé en cas de thrombopénie (Coller and Shattil, 2008). Quarante ans plus tard, le pédiatre suisse Eduard Glanzmann évoqua les premiers cas de maladie plaquettaire (Glanzmann, 1918). Il décrivit une série de patients non

thrombopéniques qui présentaient un syndrome hémorragique cutanéomuqueux. Ce phénotype hémorragique était associé à une anomalie fonctionnelle plaquettaire mise en évidence par l'étude de la rétraction du caillot. Il nomma alors cette thrombopathie héréditaire : hémorragie thrombasthénique. Trente ans plus tard, deux hématologues français, Jean Bernard et Jean-Pierre Soulier décrivirent le cas de deux enfants présentant un syndrome hémorragique majeur associé à un temps de saignement allongé et à une macrothrombocytopenie. Ils nommèrent alors cette pathologie : « dystrophie thrombocytaire hémorragipare congénitale (Bernard and Soulier, 1948).

Jusqu'au début des années 60, peu d'outils diagnostiques étaient disponibles pour étudier les maladies plaquettaires. Seuls la microscopie optique, la numération sanguine, le temps de saignement et l'étude de la rétraction du caillot permettaient de caractériser les thrombopathies. Avec ces techniques simples, les cliniciens et scientifiques ont ainsi individualisé quelques pathologies plaquettaires identifiées essentiellement par des anomalies morphologiques importantes :

- Les anomalies dites de « May-Hegglin » présentées pour la première fois par Richard May en 1909 chez un patient associant une macrothrombocytopenie et la présence d'inclusions basophiles bleutées et persistantes dans le cytoplasme des leucocytes (May, 1909). Ces observations furent complétées en 1945 par Robert Hegglin qui précisa le caractère héréditaire de la pathologie (Hegglin, 1945). Cette anomalie ne sera regroupée avec les syndromes de Fechtner et Sebastian sous le nom de syndrome MYH9 qu'en 2000... (Seri et al., 2000)
- Le syndrome d'Hermansky-Pudlak dont la première description fut publiée par Frantisek Hermansky et Paulus Pudlak en 1959 (Hermansky and Pudlak, 1959). Ces deux médecins présentèrent l'histoire de deux patients albinos non apparentés présentant un syndrome hémorragique modéré caractérisé par un temps de saignement allongé en l'absence de thrombopénie.

1.1.2 Agrégométrie et microscopie électronique

Deux technologies révolutionnèrent par la suite l'étude des pathologies plaquettaires : l'agrégométrie en 1962 et la microscopie électronique appliquée à l'observation du sang dans les années 1950. Décrit en 1962 par Gustav Born (Born, 1962) et O'Brien (O'Brien J, 1962), un agrégomètre est un photomètre qui permet de mesurer la transmission lumineuse au travers d'une cuvette thermostatée dans laquelle une solution ou une suspension est sous agitation constante. Cette technique turbidimétrique permet de mesurer *in vitro* les capacités des plaquettes à former des agrégats après stimulation par divers agonistes appelés agents agrégants. Les agrégats formés au cours de la réaction entraînent un éclaircissement du milieu réactionnel dont la cinétique est caractéristique de l'agent agrégant utilisé. Les différentes voies d'activation plaquettaire peuvent potentiellement être étudiées de manière indépendante. Dès l'invention de cette technologie, plusieurs équipes testèrent les plaquettes des patients atteints de thrombasthénie de Glanzmann et démontrèrent qu'elles étaient incapables d'agréger en réponse à une stimulation par l'ADP (adénosine 5'-diphosphate), le collagène,

l'adrénaline, la sérotonine et la thrombine (Zucker et al., 1966). La première caractérisation d'un déficit fonctionnel plaquettaire avait ainsi été réalisée.

L'utilisation du microscope électronique à transmission permit d'accéder à l'observation de l'ultrastructure plaquettaire et en particulier des organelles telles que les granules α et δ . James G White publia une revue en 1971 (White and Gerrard, 1976) qui proposa une description extrêmement moderne des thrombopathies avec anomalie morphologique. Il décrivit alors les maladies du pool vide (δ -SPD pour δ -Storage Pool Disease) en séparant déjà les entités syndromiques (Hermansky-Pudlak) des entités non syndromiques. Il observa également des petites plaquettes provenant de patients atteints de syndrome de Wiskott-Aldrich découvert en 1954. Il mit en évidence les plaquettes « vides d'organelles » chez un patient atteint du syndrome des plaquettes grises ainsi que les anomalies de May-Hegglin et débuta l'observation des macrothrombocytopénies en général. Enfin, il étudia les macro-plaquettes des patients atteints du syndrome de Bernard-Soulier et montra que celles-ci ne présentaient pas de déficit en organelles intracellulaires.

1.1.3 L'essor de la biochimie des protéines

A partir des années 1970, le développement des techniques d'électrophorèse permit non seulement la détection des principales glycoprotéines plaquettaires mais surtout d'effectuer la corrélation entre une absence de glycoprotéine et une anomalie fonctionnelle responsable d'un syndrome hémorragique. L'utilisation de l'électrophorèse en gel de polyacrylamide utilisant un agent détergent ionique (le sodium dodecyl sulfate : SDS) autorisa d'abord la séparation de différentes protéines membranaires plaquettaires en fonction de leur taille (Nachman and Ferris, 1972). Trois glycoprotéines majeures furent alors individualisées : la GPI (future GPIb), la GPII (future GPIIb) et la GPIII (future GPIIIa) (Nurden, 2007). Les travaux d'Alan Nurden et de Jacques Caen (Nurden and Caen, 1974) réalisés à Paris sur des membranes de plaquettes de patients atteints de thrombasthénie de Glanzmann (GZ) mirent en évidence l'absence de deux protéines majoritaires : la GPII et la GPIII. L'absence de ces glycoprotéines fut rapidement corrélée avec l'incapacité des plaquettes des patients GZ à agréger après stimulation par divers agonistes. Ces données furent également complétées par les tests de liaison de fibrinogène (Mustard et al., 1978) qui montrèrent l'incapacité des plaquettes provenant de patients GZ à lier le fibrinogène même après activation de celles-ci par l'ADP et l'adrénaline (Bennett and Vilaire, 1979). Les techniques d'électrophorèse en deux dimensions associées à l'utilisation d'immunoglobulines issues de lapins immunisés contre des plaquettes humaines (immunoélectrophorèses croisées) (Hagen et al., 1979) permirent par la suite d'individualiser six glycoprotéines plaquettaires et de révéler l'association de la GPIIb et la GPIIIa précédemment identifiées sous la forme d'un complexe dépendant du calcium : la GPIIb-IIIa (Kunicki et al., 1981). Cette glycoprotéine sera reconnue plus tard comme l'intégrine α IIb β 3 (Coller and Shattil, 2008). L'utilisation de l'immunoélectrophorèse croisée appliquée à l'étude des plaquettes provenant de patients GZ permit d'affiner la caractérisation du défaut fonctionnel plaquettaire corrélé à l'absence de glycoprotéine (Hagen et al., 1980). L'introduction de l'électrophorèse en condition réductrice (SDS-PAGE) précisa rapidement que la sous-unité GPIIb était composée d'une chaîne lourde et

d'une chaîne légère liées par des ponts disulfures et que la sous unité GPIIIa comportait au moins un pont disulfure intra-caténaire.

En suivant le même type de raisonnement et en utilisant les techniques modernes de l'époque, les plaquettes sanguines des patients atteints du syndrome de Bernard-Soulier (BSS) furent caractérisées par l'absence de glycoprotéine GPIb (Grottum and Solum, 1969) (Clemetson et al., 1982) (Hagen et al., 1980) et par une incapacité à s'agglutiner en présence de facteur Willebrand et de ristocétine (antibiotique extrait du champignon : *Amycolatopsis lurida* et ayant la propriété d'entraîner l'agglutination des plaquettes en présence de facteur Willebrand (VWF) via la GPIb plaquettaire). Le déficit d'adhésion au sous-endothélium des plaquettes provenant des patients BSS fut rapidement mis en évidence et permit l'identification de l'interaction entre la GPIb et le VWF.

En parallèle de l'identification des protéines impliquées dans les maladies de GZ et les syndromes de BSS, la biochimie des protéines du début des années 80 donna un aperçu de l'hétérogénéité des protéines membranaires plaquettaires.

1.1.4 Le développement des anticorps monoclonaux

Dès 1980, le développement des anticorps monoclonaux dirigés contre les récepteurs plaquettaires (McEver et al., 1980) a permis d'affiner largement les connaissances sur les plaquettes et d'identifier de très nombreux acteurs de la physiologie plaquettaire. En effet, les expériences d'immunoprécipitation couplées aux techniques modernes d'électrophorèse ont permis une caractérisation précise des différents partenaires des protéines d'intérêt. En particulier, la découverte de la GPV et de la GPIX, bien connues aujourd'hui comme étant associées à la GPIb pour former le complexe GPIb-V-IX, ont été mises en évidence un peu plus tardivement à l'aide d'expériences de co-immunoprécipitation utilisant un anticorps monoclonal (FMC25) dirigé contre la GPIb (Berndt et al., 1983). Quelques années plus tard, la GPVI fut caractérisée grâce à deux équipes : celle de Sugiyama qui mit en évidence la présence d'un anticorps dirigé contre une protéine de 62 kDa chez un patient présentant un purpura thrombopénique idiopathique (Sugiyama et al., 1987) et l'équipe de Moroi Masaaki qui démontra que l'anticorps découvert par Sugiyama était dirigé contre la GPVI, une glycoprotéine plaquettaire capable de lier le collagène et d'entraîner l'agrégation des plaquettes (Moroi et al., 1989). Par ailleurs, l'utilisation de la cytométrie en flux permet la quantification précise des glycoprotéines membranaires mais aussi plus récemment l'étude des voies de signalisation intra-cellulaires. Bien entendu, ces techniques immunologiques nécessitent la génération d'anticorps monoclonaux spécifiques des cibles protéiques d'intérêt. Ceci inclut les spécificités de conformation (état activé ou non activé) ainsi que la spécificité liée aux modifications post-traductionnelles des protéines au cours de la vie des cellules (phosphorylation par exemple). Il est important de noter qu'en 2015, nous ne disposons pas d'anticorps monoclonaux dirigés contre certaines protéines plaquettaires et leur caractérisation passe alors par l'utilisation de techniques alternatives.

1.1.5 L'ère de la biologie moléculaire

Le milieu des années 80 annonce l'émergence des nouvelles méthodes de biologie moléculaire. Dès 1987 (Fitzgerald et al., 1987) (Bray et al., 1987), les techniques de clonage et de séquençage suivant la méthode de Sanger (Sanger et al., 1977) permirent l'identification des gènes codant pour les deux sous-unités de la GPIIb-IIIa (*ITGA2B* et *ITGB3* respectivement pour les sous-unités GPIIb et GPIIIa) et les localisèrent sur le chromosome 17 chez l'Homme. Les alignements de séquences indiquèrent également que la GPIIb-IIIa fait partie d'une grande famille de protéines adhésives composées systématiquement d'une sous-unité α et d'une sous-unité β : les intégrines (Hynes, 1987). Afin de correspondre à la nomenclature de ces intégrines, la GPIIb-IIIa changea alors de nom pour s'appeler l'intégrine α IIb β 3. (*Dans la suite de ce document, nous nommerons indifféremment cette glycoprotéine la GPIIb-IIIa ou l'intégrine α IIb β 3*). Les travaux réalisés à la fin des années 80 et dans les années 90 mirent en évidence que l'intégrine α IIb β 3 liant entre autre le fibrinogène reste l'intégrine largement majoritaire (50 000 à 80 000 copies présentes sur la membrane des plaquettes au repos). Toutefois, quatre autres protéines de la même famille sont présentes sur la membrane des plaquettes en quantité bien plus faible : α 2 β 1, α 5 β 1, α 6 β 1 et α V β 3. Le séquençage des protéines se liant aux intégrines permet également de mettre en évidence les motifs peptidiques indispensables à l'interaction récepteur/ligand partiellement redondante de cette classe de protéines adhésives. Ainsi le motif RGD (Arg-Gly-Asp) présents sur la fibronectine, le VWF, la vitronectine, la thrombospondine et le fibrinogène permet de comprendre la raison de la fixation de ces différents ligands sur l'intégrine α IIb β 3 tandis que la portion docapeptide γ -terminale du fibrinogène lui est unique et joue un rôle important dans la liaison à l'intégrine (Timmons et al., 1984).

De nombreux récepteurs plaquettaires dont la présence à la surface des plaquettes et le rôle au cours de la physiologie plaquettaire étaient déjà suspectés furent alors clairement identifiés. C'est le cas notamment pour les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) tel que le premier récepteur de la thrombine PAR-1 qui fut cloné et caractérisé en 1991 (Vu et al., 1991). De même, les récepteurs purinergiques P2 furent clonés et séquencés à partir de 1993 pour le récepteur P2Y₁ de poulet (Webb et al., 1993) jusqu'en 2001 pour le récepteur P2Y₁₂ (Hollt et al., 2001) alors que leur implication dans l'activation plaquettaire était étudiée depuis des décennies (Mills, 1996) (Gachet, 2001). De manière concomitante, les techniques de PCR (polymerase chain reaction) associées au séquençage des gènes d'intérêt permirent petit à petit de mettre en évidence des mutations chez des patients atteints de pathologies plaquettaires déjà caractérisées au niveau fonctionnel. L'introduction de ces gènes mutés dans des lignées cellulaires grâce à des techniques de transfection et/ou la génération d'animaux génétiquement modifiés exprimant ou non les protéines mutantes d'intérêt et reproduisant la pathologie humaine permettent dorénavant de corréliser le phénotype observé avec la présence d'anomalies génétiques précises. De cette manière, un spectre de mutations délétères parfois très étoffé est régulièrement mis à jour dans des banques de données dédiées à des pathologies précises. Plusieurs centaines de mutations ont ainsi été décrites pour être responsables des maladies de Glanzmann (Mount-Sinai-School-

of-Medicine) et de Bernard-Soulier (Savoia et al., 2014). L'essor de la bio-informatique et des capacités de modélisation *in silico* des structures tridimensionnelles des protéines complètent ces données moléculaires par des prédictions de modification de structure responsables des anomalies fonctionnelles observées *in vitro* et *in vivo*. Ces modélisations et les prévisions structurales qui en découlent peuvent également être confirmées par les études en cristallographie lorsque les dites molécules ont pu être cristallisées avec une résolution suffisante. Par ailleurs, l'utilisation d'organismes génétiquement modifiés est devenue un outil indispensable pour la compréhension des mécanismes moléculaires responsables des pathologies observées chez l'Homme. De nombreuses thrombopathies disposent ainsi de leur modèle animal et cette approche est particulièrement intéressante pour l'étude des thrombopénies congénitales. En effet, la culture des précurseurs plaquettaires, les mégacaryocytes, jusqu'à l'étape ultime de libération de plaquettes fonctionnelles n'est actuellement maîtrisée que par très peu d'équipes dans le monde. Les modèles animaux sont donc un moyen précieux pour étudier les mécanismes de maturation et de différenciation des mégacaryocytes qui conduisent à ces pathologies (voir annexe 1 « Apport des modèles murins dans les thrombopénies constitutionnelles »). Cependant, la recherche de mutation par séquençage ciblé complétée par une évaluation du potentiel délétère de l'anomalie *in silico* et dans un modèle cellulaire adapté n'est possible que si le gène responsable de la pathologie est connu.

Les nouvelles techniques de séquençage à haut débit (autrement appelées NGS pour Next Generation Sequencing) développées depuis 2005 permettent de séquencer des milliards de bases nucléotidiques de manière très rapide et à faible coût. Ces nouvelles technologies permettent dorénavant de séquencer tout ou partie d'un génome chez une ou plusieurs personnes en une seule manipulation. Son application principale correspond à la possibilité de rechercher des mutations dans un ensemble de gènes voire dans l'exome ou le génome complet de patients présentant des anomalies fonctionnelles identiques et bien caractérisées. Le croisement des données de séquençage obtenues chez plusieurs patients à l'aide d'outils bio-informatiques permet alors de mettre en évidence de nouveaux gènes susceptibles d'être impliqués dans les défauts fonctionnels préalablement identifiés. Ces analyses d'exomes ou de génomes complets sont actuellement à l'origine de l'identification de nombreux gènes responsables de thrombopathies dont voici quelques exemples :

- *ACTN1* codant pour l' α -actinine dont les mutations sont responsables d'une macrothrombopénie modérée sans syndrome hémorragique (Gueguen et al., 2013, Kunishima et al., 2013)
- Deux gènes impliqués de manière mutuellement exclusive dans le syndrome des plaquettes grises : *NBEAL2* (Albers et al., 2011) (Gunay-Aygun et al., 2011) (Kahr et al., 2011) ou *GFI1B* (Monteferrario et al., 2014).
- Le gène *RASGRP2* codant pour le facteur d'échange du GDP CalDAG-GEFI et responsable d'une thrombopathie particulièrement hémorragique (Canault et al., 2014)
- Le gène *PRKACG* codant pour la sous-unité γ d'une protéine kinase dépendante de l'AMP cyclique (AMPC) et responsable d'une macrothrombopénie à tendance hémorragique modérée (Manchev et al., 2014).

Dans chaque cas, l'identification de gènes de susceptibilité grâce aux techniques NGS nécessite obligatoirement une confirmation fonctionnelle *in vitro* ou mieux encore *in vivo*. Les techniques de biochimie des protéines, l'observation en microscopie optique et électronique, la caractérisation phénotypique des cellules ou animaux d'intérêt et l'évaluation des interactions récepteurs/ligands ainsi que les voies de signalisation en aval restent donc absolument indispensables pour confirmer l'imputabilité des mutations de ces nouveaux gènes dans le phénotype observé chez les patients.

Depuis la découverte des plaquettes sanguines, l'utilisation des différentes techniques développées a permis d'avancer dans la compréhension de la physiologie plaquettaire et de la physiopathologie des thrombopathies. L'unité INSERM UMR S949 et le laboratoire d'hémostase de l'EFS Alsace, qui travaillent en coopération permanente, participent activement à l'identification et à la caractérisation de ces pathologies souvent peu connues et par conséquent encore sous-diagnostiquées. Ainsi, dans le cadre du réseau national d'étude des pathologies plaquettaires, les patients atteints de syndromes hémorragiques pris en charge dans l'inter-région grand-Est sont régulièrement adressés au laboratoire en cas de suspicion d'anomalie plaquettaire. De ce fait, nous avons la possibilité d'étudier de nombreux cas de thrombopathies différentes : syndrome de Bernard-Soulier, maladies de Glanzmann, syndromes des plaquettes grises, déficit en GPVI, anomalie du récepteur P2Y₁₂ et maladie du pool vide.

Nous présenterons, dans ce mémoire de thèse d'université, une description actualisée des plaquettes sanguines et de leur rôle dans l'hémostase primaire. Puis nous dresserons un état de l'art des techniques actuellement utilisées lors du diagnostic des thrombopathies dont nous tenterons de proposer une classification pertinente. Enfin, nous décrirons plus en détail l'étude des thrombopathies congénitales liées à des anomalies des voies d'activation plaquettaires dépendantes de l'ADP à savoir trois cas de variants du récepteurs P2Y₁₂ et une famille porteuse d'une maladie du pool vide non syndromique avec déficit sélectif en ADP dans les granules denses.

1.2 Les plaquettes sanguines : origine, structure et fonctions dans l'hémostase primaire

L'hémostase primaire correspond à la première étape du processus hémostatique dont l'objectif est l'arrêt du saignement en cas de brèche vasculaire. La formation du clou plaquettaire fait intervenir trois acteurs essentiels : les plaquettes sanguines, l'endothélium vasculaire avec la matrice sous-endothéliale et une macromolécule de très haut poids moléculaire : le facteur Willebrand. Nous nous focaliserons dans cette partie sur les plaquettes sanguines et nous présenterons brièvement leur origine, leur structure et leur physiologie au cours de l'hémostase primaire.

1.2.1 Origine des plaquettes sanguines

Les plaquettes sanguines sont des éléments figurés du sang anucléés produits à partir de précurseurs médullaires polyploïdes de grande taille : les mégacaryocytes (Lordier et al., 2008). Au cours de leur maturation, les mégacaryocytes subissent plusieurs cycles d'endomitoses et acquièrent la machinerie cellulaire nécessaire à la production d'environ 2000 plaquettes par mégacaryocyte mature. En parallèle, le cytoplasme subit une maturation et acquiert un système de membranes de démarcation (DMS) (Eckly et al., 2014). Ce DMS est un réseau de membranes internes qui remplit tout le cytoplasme et qui est connecté à la surface du mégacaryocyte.

Le processus de différenciation et de maturation des mégacaryocytes à partir des cellules souches hématopoïétiques est régulé par l'expression séquentielle de facteurs de transcription (GATA-1, RUNX1 etc.) et par plusieurs cytokines (Kaushansky, 2008). Le SCF (Stem Cell Factor) et l'interleukine 3 agissent essentiellement au cours des premiers stades de différenciation alors que la thrombopoïétine (TPO) qui se lie à son récepteur mégacaryocytaire (cMPL) est absolument indispensable tout au long du processus qui mène à la génération de mégacaryocytes matures (Kaushansky, 1995) dits proplaquetto-gènes. Les interleukines 6 et 11 sont également nécessaires à la différenciation des progéniteurs plaquettaires mais agissent plutôt en coopération avec l'interleukine 3 ou la TPO (Michelson, 2013)(Chapter 2).

Le processus de libération des plaquettes n'est pas encore complètement élucidé mais la théorie la plus communément admise passe par l'émission dans les sinusoides médullaires de fragments cytoplasmiques, les proplaquettes ($> 100\mu\text{m}$), qui sous l'effet du flux sanguin se séparent du corps des mégacaryocytes pour former des pré-plaquettes (Italiano et al., 1999, Thon and Italiano, 2010). Ces pré-plaquettes constituées de boutons plaquettaires reliés par de fins ponts cytoplasmiques se fragmentent par la suite dans la circulation afin de former les plaquettes définitives (Machlus and Italiano, 2013) (Figure 1).

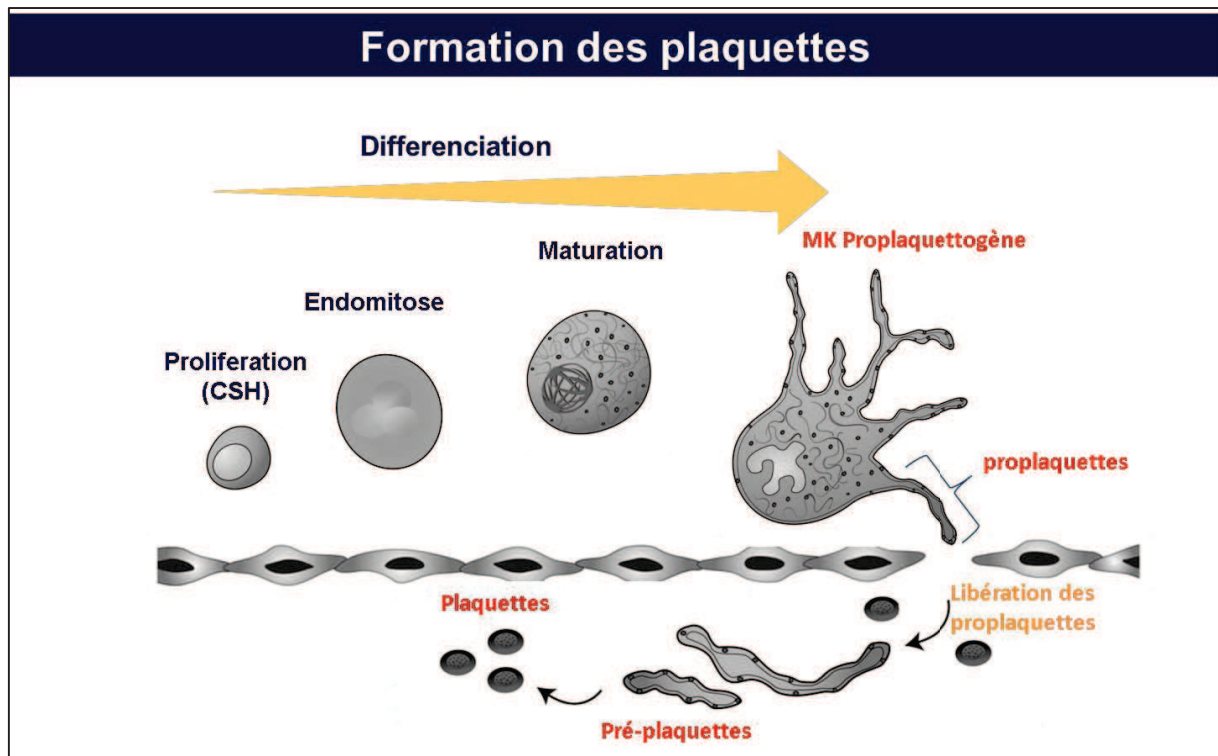


Figure 1 : Différenciation mégacaryocytaire et production des plaquettes sanguines dans la moelle osseuse
 Les précurseurs mégacaryocytaires se différencient à partir des cellules souches hématopoïétiques (CSH) présents dans la moelle osseuse. Ils subissent plusieurs cycles d'endomitose pour aboutir à la formation de cellules polyploïdes. Le cytoplasme subit également une maturation. Les mégacaryocytes matures proplaquetto-gènes émettent alors des protrusions dans les sinusoides médullaires (les proplaquettes) et libèrent des pré-plaquettes dans la circulation. Ces dernières se fragmentent pour former les plaquettes sanguines.

1.2.2 Structure des plaquettes sanguines

1.2.2.1 Présentation générale

Les plaquettes sanguines mesurent 2 à 3 μm de diamètre pour un volume moyen compris entre 8 et 11 fL. Comme les autres cellules de l'organisme, leur membrane plasmique est composée de cholestérol et d'une bicouche phospholipidique asymétrique. En l'absence d'activation, les phospholipides neutres sont localisés sur le feuillet externe alors que les phospholipides anioniques sont majoritaires sur le feuillet interne (Colman, 2006) (Chapter 22). Au cours de l'activation plaquettaire, l'exposition des phospholipides anioniques vers le milieu extracellulaire est essentielle pour l'acquisition du caractère pro coagulant des plaquettes activées.

La membrane plasmique est le support de très nombreux récepteurs plaquettaires impliqués dans les différentes phases d'adhésion, d'activation et d'agrégation plaquettaires. De plus, elle s'invagine vers l'intérieur de la

cellule et donne naissance à un système de membrane particulièrement développé, le système canaliculaire ouvert. Celui-ci a un double rôle :

- Il permet d'augmenter la surface d'échange avec le milieu extérieur en facilitant à la fois l'endocytose et l'exocytose des organelles intracellulaires (White and Escolar, 1991)
- Il sert de réserve de membranes et est indispensable à l'émission de filopodes et à l'étalement des plaquettes au cours de leur l'activation (Escolar et al., 1989)

Le cytosquelette plaquettaire est formé de tubuline, d'actine, de myosine IIA et comporte un enroulement de 8 à 12 microtubules formant un anneau en périphérie appelé la bande marginale. Cet enroulement confère à la plaquette une forme discoïde stable (White, 1968, White and Rao, 1998).

Les plaquettes possèdent également de nombreuses organelles : du réticulum endoplasmique lisse (système tubulaire dense), des mitochondries, des granules α , des granules denses (ou granules δ), des lysosomes et des grains de glycogènes (Figure 2).

1.2.2.2 Les organelles plaquettaires

Les plaquettes sanguines disposent de nombreuses organelles intracellulaires impliquées dans les processus métaboliques et dans les phénomènes de sécrétion. Des mitochondries et du glycogène fournissent l'énergie nécessaire au métabolisme plaquettaire et en particulier au mécanisme de sécrétion. Les granules α , δ et les lysosomes contiennent de nombreuses molécules (décrites ci-dessous) qui sont sécrétées dans le milieu extérieur lors de l'activation (Gresele, 2002), Chapter 7).

1.2.2.3 Les granules α

Les granules α sont des organelles plaquettaires sphériques ou ovoïdes de 200 à 500 nm de diamètre synthétisés par le mégacaryocyte durant la maturation de son cytoplasme. Une plaquette contient entre 50 et 80 granules α et ceux-ci sont identifiables en microscopie électronique à transmission (MET) grâce au contraste hétérogène qu'ils présentent (Michelson, 2013) (chapter 7). Ce sont par ailleurs les seules structures plaquettaires observables en microscopie optique après coloration au May-Grunwald-Giemsa. La membrane des granules α portent de nombreuses glycoprotéines sur sa face interne qui sont exposées sur la membrane plasmique après activation et dégranulation des plaquettes :

- la P-selectine (CD62) spécifique des granules α (Harrison and Cramer, 1993).
- D'autres glycoprotéines plaquettaires également présentes à la membrane plasmique à l'état basal: GPIIb-IIIa, GP IV (CD36), CD9, PECAM1 (Cramer et al., 1994) et à l'état de traces : le complexe GPIb-V-IX (Berger et al., 1996).

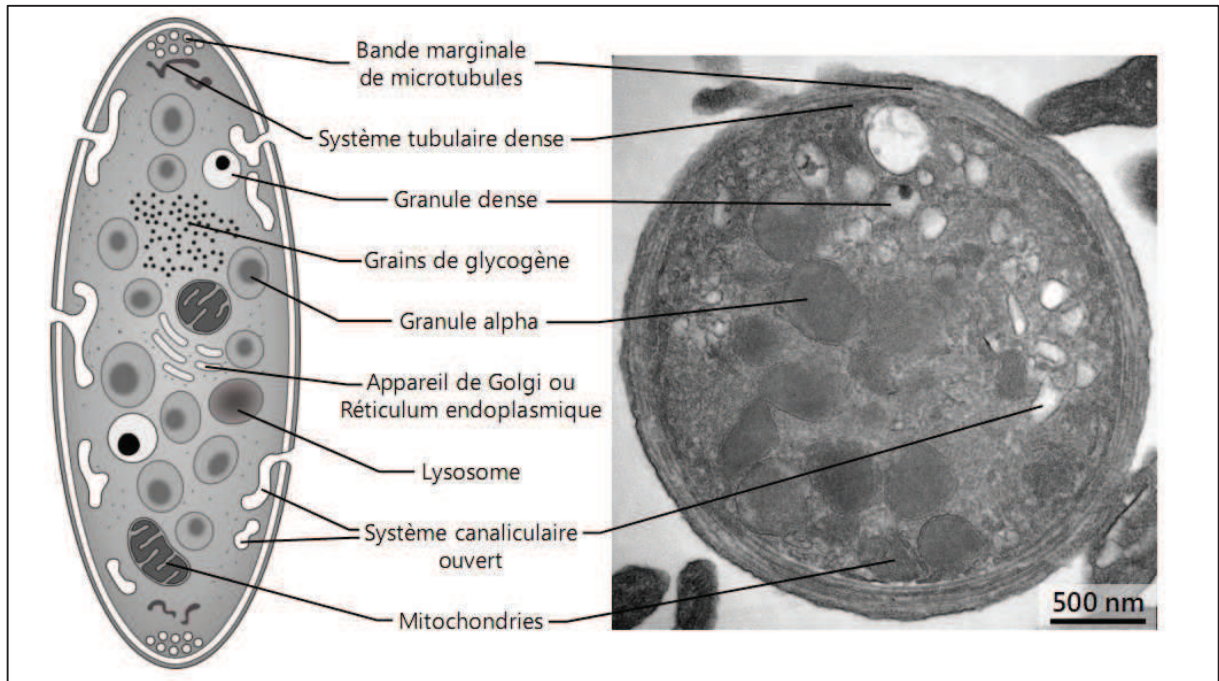


Figure 2 : Schéma d'une plaquette sanguine

A gauche, schéma d'une plaquette en coupe transversale (adapté de B. Boneu et J-P. Cazenave, *Introduction à l'étude de l'hémostase et de la thrombose* » deuxième édition (1997), figure I-4) (Boneu and Cazenave, 1997), A droite, coupe frontale d'une plaquette en microscopie électronique à transmission (Anita Eckly, UMR_S949, EFS Alsace).

Les granules α contiennent de très nombreuses molécules qui peuvent être incorporées soit pendant leur synthèse au cours de la maturation mégacaryocytaire, soit plus tardivement dans la plaquette mature. Ainsi, le dosage des molécules les plus abondantes comme la β -thromboglobuline (β -TG) et le facteur 4 plaquettaire (PF4) (Kaplan and Owen, 1981) (Ohkawa et al., 2005) dans le surnageant des suspensions plaquettaires au cours des tests d'agrégation sont devenus de très bons marqueurs de l'activation des plaquettes. De manière plus exhaustive, les granules α contiennent des facteurs de la coagulation, des facteurs de croissance, des inhibiteurs de protéases, des protéoglycanes et des immunoglobulines (Figure 3).

Durant l'activation plaquettaire les granules α relarguent leur contenu dans le milieu extracellulaire afin de stabiliser et de faire croître le thrombus. Les molécules sécrétées permettent le recrutement local de nouvelles plaquettes (VWF, fibrinogène) (Blair and Flaumenhaft, 2009) et participent également à l'amplification de la coagulation dans le cœur du thrombus en favorisant la génération de thrombine (McFadyen and Jackson, 2013).

1.2.2.4 Les granules denses

Les granules δ sont des organelles spécifiques des plaquettes qui appartiennent à la classe des organelles dérivées des lysosomes. Ils mesurent environ 150 nm de diamètre et sont appelés granules denses en raison de

leur centre opaque aux électrons en microscopie électronique à transmission. On compte entre 3 et 8 granules δ (Mumford et al., 2015) par plaquette qui contiennent uniquement de petites molécules : du calcium présent en très forte concentration (environ 2 M) conférant aux granules denses leur opacité aux électrons, 90% de la sérotonine circulante de l'organisme (65 mM), de grandes quantités de nucléotides (ATP et ADP) aux concentrations respectives de 0.6 et 0.4 M, des pyrophosphates et des polyphosphates (Smith and Morrissey, 2008).

Comme les granules α , la membrane des granules denses porte des récepteurs qui peuvent également être retrouvés sur les membranes des autres organelles plaquettaires (CD63 (Nishibori et al., 1993) , GPIIb-IIIa, GPIb (Youssefian et al., 1997) et LAMP2 (Israels et al., 1996)). Des transporteurs permettant l'entrée des petites molécules dans les granules denses sont également présents : les transporteurs vésiculaires de monoamines (VMAT2) (Carneiro et al., 2008) (Jedlitschky et al., 2012), les transporteurs de nucléotides MRP4 (Jedlitschky et al., 2010) et VNUT (Hiasa et al., 2014).

Lors de l'activation plaquettaire, les granules denses fusionnent avec la membrane plasmique afin de déverser leur contenu dans le milieu extérieur. L'ADP et la sérotonine sécrétés agissent de manière autocrine et paracrine pour conduire à l'agrégation des plaquettes. En particulier l'ADP se fixe sur ses deux récepteurs plaquettaires : P2Y₁ et P2Y₁₂ et entraîne d'une part le changement de forme des plaquettes et d'autre part l'amplification de l'activation plaquettaire induite par les autres agonistes solubles (sérotonine, thromboxane A2 et thrombine).

1.2.2.5 Lysosomes

On compte deux à trois lysosomes de 200 et 250 nm de diamètre par plaquette. Ces organelles contiennent essentiellement des protéases et des hydrolases (Figure 3) dont le rôle principal est la dégradation et le recyclage des récepteurs plaquettaires internalisés (Hoxie et al., 1993) (Michelson, 2013) (Chapter 7)

Principales molécules stockées dans les organelles plaquettaires		
Granules α	Granules δ	Lysosomes
Proteoglycanes <i>β-thrombomoduline</i> <i>PF4</i> Glycoprotéines riches en histidines <i>Platelet basic protein</i> <i>NAP-2</i> <i>CTAP-III</i>	<i>Sérotonine</i> <i>Calcium</i> <i>ATP</i> <i>ADP</i> <i>Pyrophosphates</i> <i>Polyphosphates</i>	Protéases acides <i>Cathepsines D, E</i> <i>Carboxypeptidase (A, B)</i> <i>Prolinecarboxypeptidase</i> <i>Collagenase</i> <i>Phosphatase acide</i> <i>arylsulfatase</i>
Protéines adhésives <i>Fibronectine</i> <i>Vitronectine</i> <i>vWF</i> <i>Thrombospondine</i>		Glycohydrolases <i>Heparinase</i> <i>β-N-acetyl-glucosamidase</i> <i>β-glucuronidase, β-galactosidase</i> <i>β-glycerophosphatase, α-D-glucosidase</i> <i>β-D-glucosidase, α-L-fucosidase</i> <i>α-L-arabinosidase, β-D-fucosidase</i> <i>α-D-mannosidase</i>
Facteur de la coagulation <i>Fibrinogène</i> <i>facteur V, VIII, XI, XIII</i> <i>Protéine S</i>		
Facteur de croissance <i>PDGF</i> <i>TGF β</i> <i>ECGF</i> <i>EGF</i> <i>VEGF</i> <i>IGF</i> <i>Interleukine β</i>		
Inhibiteur de protéase <i>α2-macroglobuline</i> <i>α2-antitrypsine</i> <i>PDCI</i> <i>α2-antiplasmine</i> <i>PAI-I</i> <i>TFPI</i> <i>C1-inhibiteur</i> <i>PN-2/APP</i>		
Immunoglobuline <i>IgG, IgA, IGM</i> <i>Albumine</i>		

Figure 3 Principaux constituants des organelles plaquettaires
D'après *Platelets in Thrombotic and Non-thrombotic Disorders*. (Gresele, 2002)

1.2.3 Physiologie plaquettaire au cours de l'hémostase primaire

La physiologie plaquettaire au cours de l'hémostase primaire fait intervenir de nombreux récepteurs membranaires qui participent aux étapes d'adhésion, d'activation et d'agrégation des plaquettes. Des protéines riches en leucine (complexe GPIb-V-IX), des intégrines ($\alpha 2\beta 1$, $\alpha \text{IIb}\beta 3$), des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) et des protéines appartenant à la superfamille des immunoglobulines (GPVI) modulent les flux calciques intra-cellulaires et l'état d'activation de nombreuses protéines kinases pour conduire à l'étalement des plaquettes et à leur agrégation. En parallèle, le contenu des granules plaquettaires est sécrété et amplifie de manière autocrine et paracrine l'activation des plaquettes. L'ensemble de ces mécanismes aboutit à la formation d'un thrombus qui permet le comblement des brèches vasculaires.

En l'absence de brèche vasculaire, l'endothélium vasculaire synthétise et libère des inhibiteurs plaquettaires (Furchgott and Vanhoutte, 1989). Le monoxyde d'azote (Moncada and Higgs, 1991) inhibe les plaquettes en stimulant la production de GMP cyclique (Warner, 1996) et entraîne également une vasodilatation locale en agissant directement sur les cellules musculaires lisses de la paroi vasculaire. La PGI_2 inhibe les plaquettes en se liant à son récepteur : un RCPG couplé avec une protéine $\text{G}\alpha_s$ qui augmente l'AMPc intra-cellulaire en stimulant l'adénylate cyclase (AC) (Armstrong, 1996). Cette inhibition permanente permet de garder les plaquettes sous une forme discoïde et non activée.

1.2.3.1 L'adhésion des plaquettes

En cas de traumatisme vasculaire, la matrice sous-endothéliale riche en collagène et en autres protéines fibrillaires (fibronectine, laminines, et vitronectine) est exposée au flux sanguin et entraîne l'adhésion des plaquettes. Cette première étape est un phénomène rapide (3 à 5 min) et débute par une vasoconstriction réflexe qui perturbe le flux sanguin pour le rendre turbulent. Les plaquettes sont ainsi projetées contre la matrice sous-endothéliale. Dans les artères en particulier où les forces de cisaillement sont élevées, les plaquettes ne peuvent pas adhérer directement à la matrice sous-endothéliale. Une macromolécule, le facteur Willebrand (VWF) (Figure 4), joue alors un rôle essentiel en se fixant sur le collagène et en induisant le recrutement des plaquettes. Le VWF est un multimère de très haut poids moléculaire (500 à 20 000 kDa) constitué d'homodimères. Chaque monomère de 2050 acides aminés possède entre autre un site de liaison au collagène (domaine A3) et un site de liaison pour la sous-unité GPIb α domaine A1) (Zhou et al., 2012) du complexe protéique GPIb-V-IX présenté dans le paragraphe suivant. Le VWF est présent dans le plasma à la concentration de 5 à 10 mg/L mais est stocké dans les corps de Weibel Palade des cellules endothéliales ainsi que dans les granules α plaquettaires (Nightingale and Cutler, 2013).

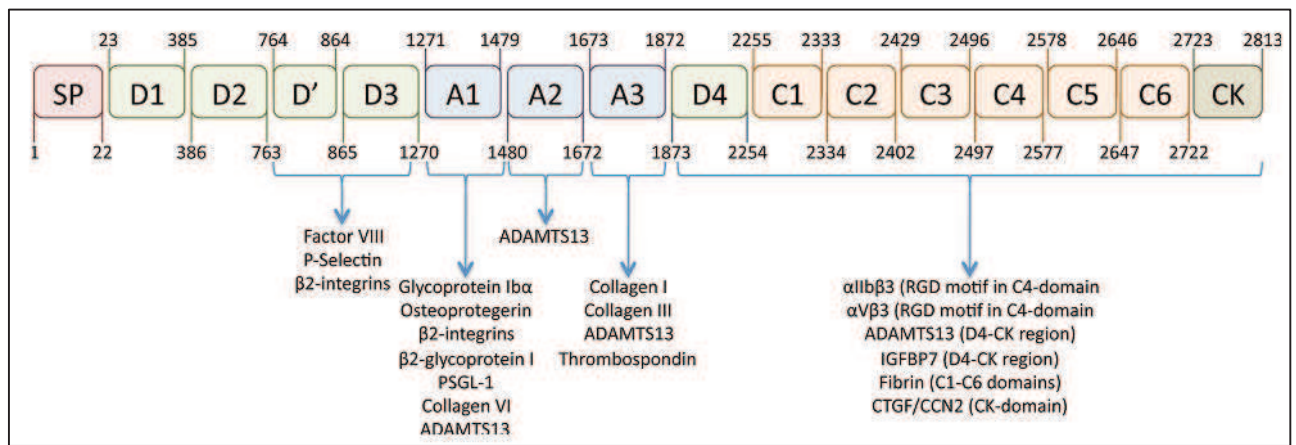


Figure 4: représentation des différents domaines du facteur Willebrand et de leurs rôles physiologiques respectifs

D'après Bryckaert et al. (Bryckaert et al., 2015).

Le VWF circule dans le plasma sous une forme globulaire dans laquelle les sites de liaison à la GPIb α de chaque monomère sont masqués. En cas de contact avec le sous-endothélium, le VWF adhère au collagène via son domaine A3. La force du flux sanguin déplie alors le VWF et démasque les sites de liaison à la GPIb α plaquettaire. Ce mécanisme permet ainsi l'adhésion réversible des plaquettes et le rapprochement spatial de celles-ci au niveau du tissu vasculaire lésé.

Le complexe GPIb-V-IX (Figure 5) indispensable à l'adhésion des plaquettes est composé de quatre sous-unités transmembranaires : la GPIb α , la GPIb β , la GPIX et la GPV qui appartiennent à la famille des protéines riches en leucine (Kobe and Deisenhofer, 1994). La GPIb α qui supporte l'essentiel de l'activité de ce complexe est associée de façon covalente à un ou deux monomères de GPIb β pour former la glycoprotéine Ib (GPIb) (Lanza et al., 2008). La GPIb est associée de manière non covalente avec les deux dernières glycoprotéines : la GPIX qui est indispensable à l'expression membranaire du complexe et la GPV (Figure 5). Sa partie extracellulaire possède des sites de liaison avec de nombreux ligands (VWF, thrombospondine, thrombine, facteurs de la coagulation XI et XII, kininogène de haut poids moléculaire, P-selectine et intégrine leucocytaire α M β 2) tandis que sa partie intracellulaire permet l'ancrage du complexe au cytosquelette d'actine par l'intermédiaire de la filamine (Dyson et al., 2003). La partie intra-cellulaire permet également la transduction du signal en aval du récepteur.

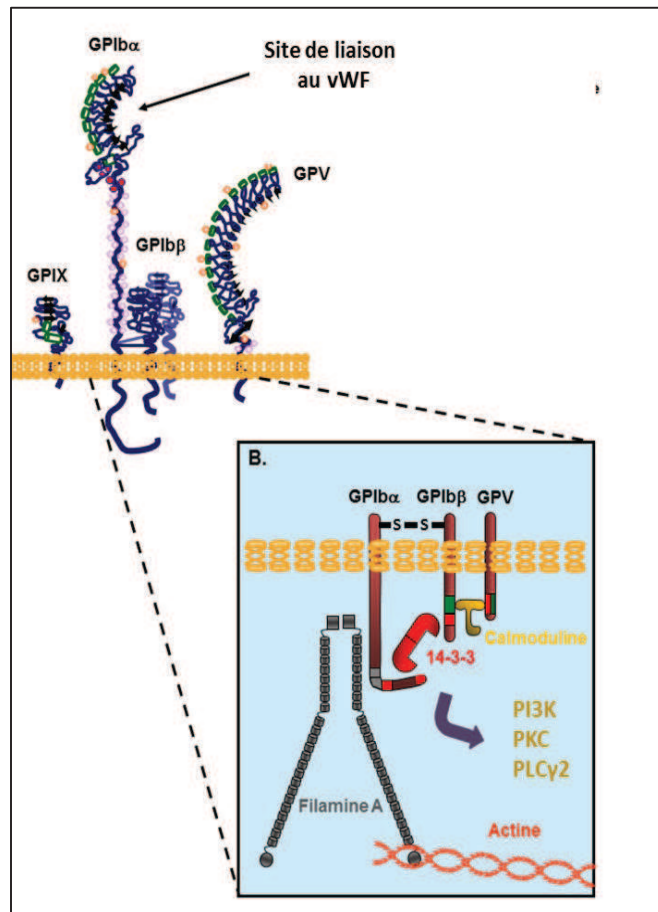


Figure 5 : Structure générale du complexe GPIb-V-IX et principales voies de signalisation en aval du complexe D'après Lanza et al. (Lanza et al., 2008)

L'interaction VWF/GPIb entraîne une activation la phospholipase C $\gamma 2$ (PLC $\gamma 2$) et la mobilisation des stocks de calcium intra-cellulaire qui induit une modification du cytosquelette d'actine (Faix and Rottner, 2006). Les plaquettes deviennent d'abord sphériques puis émettent de nombreux filopodes (Mangin et al., 2003). En parallèle, la liaison GPIb/VWF active la phosphoinositide-3-kinase (PI3K) qui interagit directement avec la protéine 14.3.3 intimement liée au domaine intra-cellulaire de la GPIb α . L'activation de la PI3K provoque une entrée supplémentaire de calcium à partir du milieu extracellulaire qui soutient les modifications du cytosquelette déjà engagées et participe à l'activation de la GPIIb-IIIa (Nesbitt et al., 2002). Cette première étape d'adhésion dite instable favorise alors le contact entre les autres récepteurs plaquettaires et les composants de la matrice sous-endothéliale pour conduire à une adhésion stable des plaquettes et à une activation de celles-ci. En particulier, l'adhésion dépendante du complexe GPIb-V-IX induit la dimérisation de la glycoprotéine VI (GPVI) qui peut ainsi fixer le collagène matriciel et activer les plaquettes (Jiang and Jandrot-Perrus, 2014).

La GPVI qui appartient à la superfamille des immunoglobulines est le principal récepteur d'activation au collagène (Nieswandt and Watson, 2003). La GPVI est étroitement associée à la chaîne γ des récepteurs au fragment Fc des immunoglobulines (Fc γ) par l'intermédiaire de son domaine transmembranaire. La liaison

au collagène entraîne une dimérisation des complexes GPVI/FcR γ et un démasquage des domaines ITAM des FcR γ . L'auto phosphorylation des domaines ITAM par les protéines kinase Fyn et Lyn associées au domaine intra-cellulaire de la GPVI permet le recrutement de la protéine kinase Syk et des protéines adaptatrices LAT et SLP76. L'activation de la phospholipase C $\gamma 2$ (PLC $\gamma 2$) et de la PI3K qui en découle entraîne alors la mobilisation du calcium intracellulaire, la dégranulation des plaquettes et l'activation des intégrines (Zahid et al., 2012) (Figure 6). Tout récemment, Mammadova et al. (Mammadova-Bach et al., 2015) ont par ailleurs mis en évidence le rôle de la GPVI dans la croissance du thrombus et l'amplification locale de la coagulation. En effet, en se liant à la fibrine polymérisée, la GPVI permet le recrutement des plaquettes au niveau du thrombus en formation. De plus, l'interaction entre la GPVI et la fibrine amplifie la génération de thrombine en promouvant l'exposition de phospholipides anioniques à l'extérieur de la cellule.

D'autres interactions récepteurs/ligands stabilisent encore l'adhésion plaquettaire : le collagène se lie à l'intégrine $\alpha 2\beta 1$, la fibronectine interagit avec l'intégrine $\alpha 5\beta 1$, les laminines avec l'intégrine $\alpha 6\beta 1$, et l'intégrine $\alpha \text{IIb}\beta 3$ lie le fibrinogène adsorbé dans la matrice. Lors du processus d'adhésion, l'ensemble de ces interactions conduit à l'activation proprement dite des plaquettes.

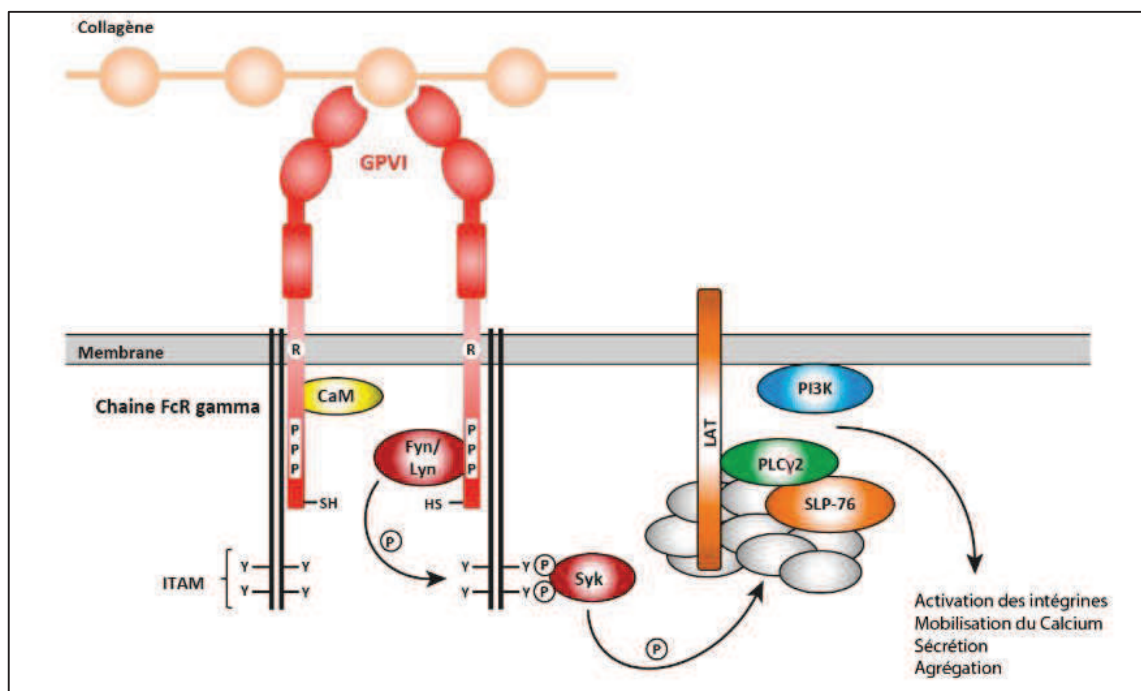


Figure 6 : Structure générale de la GPVI et principales voies de signalisation associées
D'après Dütting et al, (Dutting et al., 2012).

1.2.3.2 L'activation plaquettaire (Figure 7)

L'adhésion irréversible des plaquettes à la matrice sous-endothéliale initie l'activation plaquettaire grâce à l'activation de voies de signalisation en aval du complexe GPIb-V-IX et de la GPVI. Cette activation est par la suite renforcée par la synthèse et la sécrétion de médiateurs solubles qui agissent essentiellement par l'intermédiaire de RCPG présents sur la membrane des plaquettes.

Les RCPG sont des récepteurs composés de sept domaines transmembranaires couplés à des protéines G hétéro-trimériques composées de deux sous-unités : α et β/γ . La sous-unité α porte une activité GTPasique et module l'action des effecteurs enzymatiques situés en aval. La sous-unité β/γ se dissocie de la sous-unité α uniquement après l'échange GDP/GTP et active la PLC, la PI3K ou certains récepteurs canaux. Dans les plaquettes sanguines, au moins quatre grands types de récepteurs couplés aux protéines G ont été décrits :

- Les récepteurs couplés aux protéines $G\alpha_q$ qui activent la PLC β puis la protéine kinase C (PKC) pour aboutir à la mobilisation du calcium intracellulaire. C'est le cas notamment pour les récepteurs à la thrombine : PAR1 et PAR4 (protease activated receptor 1 et 4), le récepteur à l'ADP : P2Y₁, et le récepteur au thromboxane A₂ : TBXA2R.
- Les récepteurs couplés aux protéines $G\alpha_{12/13}$ qui permettent la phosphorylation de la myosine comme les récepteurs TBXA2R, PAR1 et PAR4.
- Les récepteurs couplés aux protéines Gs qui activent l'AC tel que le récepteur à la PGI₂.
- Les récepteurs couplés aux protéines $G\alpha_i$ qui inhibent l'AC et activent des sous-types de PI3K tels que le récepteur à l'ADP : P2Y₁₂ (Versteeg et al., 2013).

Parmi les nombreuses molécules relarguées par les plaquettes au cours de l'activation plaquettaire, les médiateurs les plus importants sont l'ADP, la sérotonine et le calcium contenu dans les granules denses, le thromboxane A₂ (TXA₂) nouvellement formé et la thrombine générée localement.

Les plaquettes activées synthétisent du TXA₂ à partir de l'acide arachidonique membranaire. Ce processus passe par l'action de la phospholipase A₂ puis de la cyclo-oxygénase de type 1 (COX-1) bien connue pour être inhibée de manière irréversible par l'aspirine (Landry et al., 2006). Le TXA₂ très lipophile diffuse alors à l'extérieur de la cellule. Il entraîne une vasoconstriction locale et agit sur son récepteur plaquettaire, un RCPG couplé à des protéines $G\alpha_q$ et $G\alpha_{12/13}$, (TBXA2R) (Giannarelli et al., 2010) (Feletou et al., 2010) afin de mobiliser le calcium intra-cellulaire, activer la PKC, la PI3K et la GTPase RhoA. La stimulation de ces voies de transduction renforce, en coopération avec l'action des autres agonistes solubles, la dégranulation des plaquettes, un remodelage du cytosquelette et l'activation des intégrines.

La thrombine générée localement au cours de l'activation de la coagulation est également un puissant agoniste plaquettaire. Elle agit par l'intermédiaire de ses récepteurs plaquettaires, les récepteurs PAR1 et PAR4 (Coughlin, 2005). Le mécanisme d'activation de ces récepteurs est atypique. En effet, la thrombine utilise son activité enzymatique de type sérine protéase pour cliver la partie extracellulaire du récepteur. Il en résulte la

formation d'une nouvelle extrémité N-terminale capable d'auto-activer le récepteur. L'activation des récepteurs PAR entraîne une activation plaquettaire similaire à l'action des récepteurs TBXA₂R entraînant la dégranulation des plaquettes, des modifications du cytosquelette et l'activation des intégrines.

L'ADP libéré au cours de la sécrétion des granules denses se fixe sur ses récepteurs : P2Y₁ et P2Y₁₂ (Gachet, 2001) (Gachet, 2008) (Gachet, 2006). Le récepteur P2Y₁, couplé à une protéine G_{α_q}, qui se désensibilise transitoirement après une activation (Baurand et al., 2000), induit une mobilisation modérée du calcium intracellulaire et initie le changement de forme des plaquettes. L'action de l'ADP sur le récepteur P2Y₁₂ qui est lui couplé à une protéine G_{α_i} inhibitrice, entraîne de son côté une levée de l'inhibition médiée par la PGI₂ en bloquant la synthèse d'AMPc dépendante de l'AC. Cette levée d'inhibition entraîne une amplification de l'activation plaquettaire initiée d'une part par l'activation du récepteur P2Y₁ mais aussi par les autres médiateurs solubles tels que la sérotonine et le TXA₂. L'action de l'ADP sur le récepteur P2Y₁₂ stimule la PI3K ce qui entraîne l'activation de l'intégrine αIIbβ3. La sérotonine relarguée de manière concomitante permet une vasoconstriction locale et stimule aussi les plaquettes en se liant à son récepteur membranaire couplé à une protéine G_q (Figure 7).

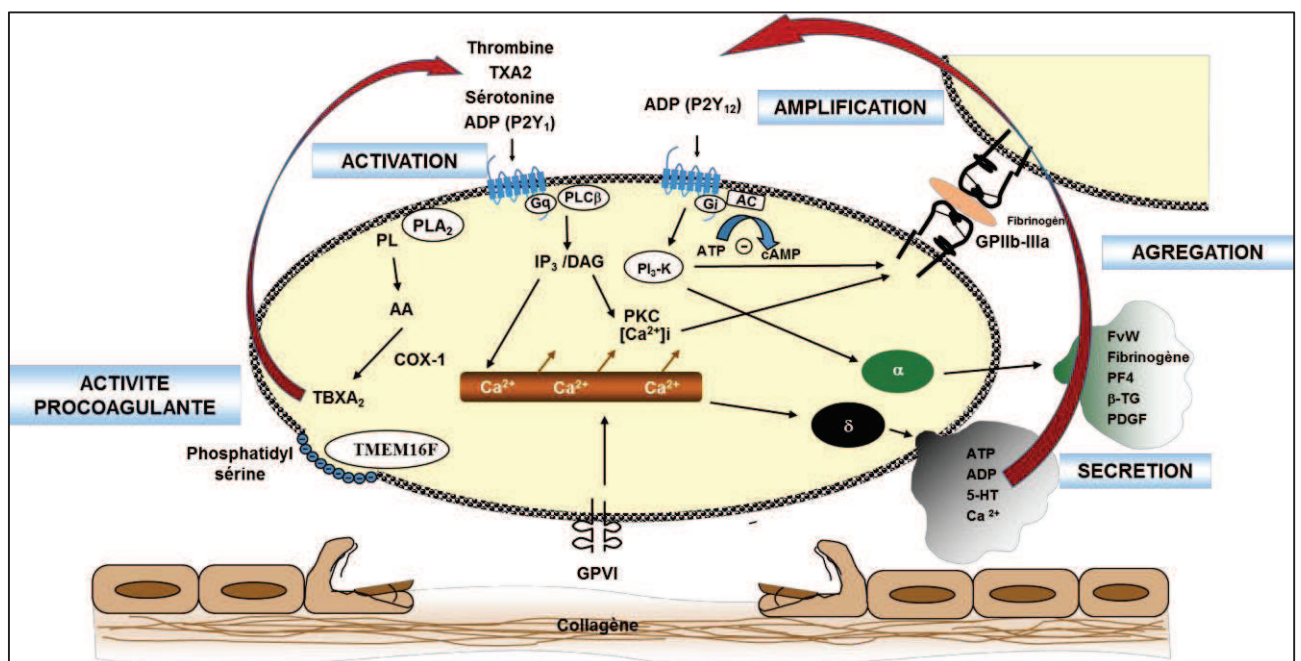


Figure 7 : Principales voies de signalisation au cours de l'activation plaquettaire

L'activation des plaquettes sanguines passe par l'acquisition de propriétés procoagulantes (exposition des phospholipides anioniques vers l'extérieur de la cellule), la sécrétion des granules α et δ qui libèrent des agonistes solubles (ADP, sérotonine), et la génération de TXA₂. L'activation médiée par les agonistes solubles tels que la sérotonine, la thrombine et le TXA₂ est potentialisée par l'action de l'ADP sur les récepteurs P2Y₁₂ et P2Y₁. Ce phénomène aboutit à l'agrégation des plaquettes dépendante de l'activation de l'intégrine αIIbβ3.

Enfin, au cours de leur activation, les plaquettes exposent vers le milieu extracellulaire des phospholipides anioniques normalement localisés sur le feuillet interne de la membrane plasmique (van Kruchten et al., 2013). Cette exposition passe par l'action d'une scramblase dépendante du calcium : TMEM16F (Suzuki et al., 2010). L'exposition des phospholipides anioniques vers le milieu extracellulaire permet ainsi, en présence de calcium, le recrutement des facteurs de la coagulation et la génération de thrombine.

1.2.3.3 3^{ème} étape : l'agrégation plaquettaire irréversible (Figure 8)

L'hémostase primaire consiste en la formation d'un clou plaquettaire stabilisé au niveau du tissu vasculaire lésé. L'agrégation plaquettaire en est un élément essentiel qui requiert l'activation de l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta 3$ qui doit changer de conformation afin de fixer le fibrinogène et former ainsi des ponts entre les plaquettes.

L'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta 3$ dont on compte 50 000 à 80 000 molécules par plaquette chez l'Homme est composée de deux sous-unités transmembranaires liées de manière non covalente (Nurden et al., 2011a). Son activation est déclenchée par la signalisation en aval des récepteurs plaquettaires stimulés par les agonistes solubles (ADP, thrombine, TXA₂) ou impliqués dans la phase d'adhésion des plaquettes (le complexe GPIb-V-IX et la GPVI). On parle alors de signalisation « inside out ». Elle comporte le recrutement de PLC (PLC β pour les récepteurs aux agonistes solubles et PLC γ pour les récepteurs impliqués dans l'adhésion) (Jackson et al., 2004) qui hydrolysent le phosphatidyl-inositol 4,5 diphosphate (PIP₂) en diacide glycérol (DAG) et inositol 1,4,5 diphosphate (IP₃). L'IP₃ permet alors la libération des stocks de calcium intra-cellulaire qui participe avec le DAG au recrutement de la protéine d'échange du GDP CALDAG-GEFI nécessaire à l'activation d'une petite protéine G : Rap1 (Guidetti and Torti, 2012). Cette petite protéine G permet l'association de la taline et de la kindline-3 avec la queue intracellulaire de la sous-unité $\beta 3$ de l'intégrine et entraîne son activation (Ma et al., 2007, Shen et al., 2013). Cette signalisation dite « inside out » aboutit au changement de conformation de la GPIIb-IIIa qui peut fixer de manière très affine le fibrinogène en présence de calcium. La fixation du fibrinogène induit la création de ponts entre les plaquettes activées et autorise le recrutement de plaquettes supplémentaires au sein du thrombus en formation. La liaison entre les plaquettes et l'activation de celles-ci est encore renforcée grâce au regroupement spatial des récepteurs GPIIb-IIIa induit par l'activation de l'intégrine (« clustering »). Ce regroupement entraîne une activation massive de protéines kinases interagissant avec le domaine intracellulaire de la sous-unité $\beta 3$ de la GPIIb-IIIa telles que c-Src, Syk et Fyn (signalisation « outside in »). Le recrutement de c-Src (Wu et al., 2015) permet la phosphorylation de Syk qui conduit à la phosphorylation de la PLC $\gamma 2$ ((Zhang et al., 2011) puis à l'activation de Rap1b. De cette manière, Rap1b permet le maintien de l'intégrine dans sa forme activée. Par ailleurs, la protéine kinase Fyn permet la phosphorylation de nombreuses protéines intra-cellulaires dont la myosine 2A ainsi que de plusieurs protéines adaptatrices qui entraînent le recrutement de la PI3K (Gratacap et al., 2011)(Figure 8). La myosine 2A participe alors au changement de forme et à l'étalement des plaquettes tandis que la PI3K renforce la dégranulation des organelles plaquettaires qui majore de manière autocrine et paracrine l'activation des plaquettes présentes au sein du thrombus en formation.

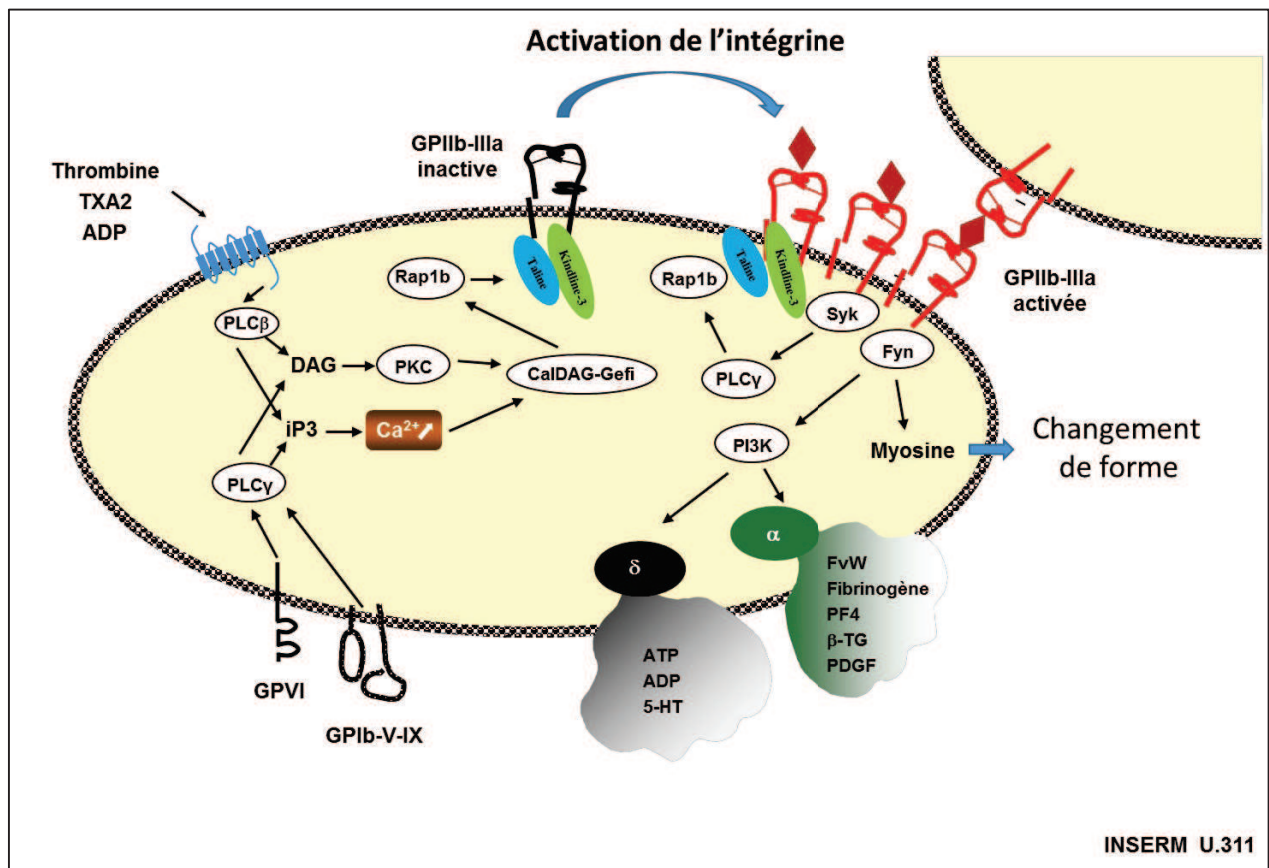


Figure 8 : Activation de l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta 3$

L'activation des plaquettes sanguines dépendante des récepteurs d'adhésion (GPVI et GPIb-V-IX) ou des récepteurs aux agonistes solubles (thrombine, TXA2, ADP) conduit à une augmentation de calcium intracellulaire et à l'activation de la kinase Rap1b qui permet le recrutement de la kindline-3 et de la taline sur la sous-unité $\beta 3$ de l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta 3$. Cette signalisation « inside out » induit le changement de conformation de l'intégrine qui peut lier le fibrinogène. L'activation de l'intégrine entraîne une signalisation « outside in » qui permet le renforcement du recrutement de Rap1b et le regroupement spatial des intégrines $\alpha\text{IIb}\beta 3$ activées conduisant à l'agrégation irréversible des plaquettes.

Comme nous venons de le voir, les plaquettes sanguines sont un élément central dans le processus d'arrêt du saignement au cours de l'hémostase primaire. Toutes les anomalies qualitatives ou quantitatives des plaquettes, de leurs récepteurs plaquettaires ou des voies de signalisation associées peuvent potentiellement entraîner un dysfonctionnement de l'hémostase primaire et conduire à un syndrome hémorragique. Nous nous attacherons dans la suite de ce document à présenter les différents outils actuellement utilisés au laboratoire pour le diagnostic et la caractérisation des thrombopathies et nous proposerons ensuite une classification des principales pathologies plaquettaires actuellement identifiées.

1.3 Diagnostic et classification des thrombopathies

1.3.1 Stratégie diagnostique des thrombopathies

Les syndromes hémorragiques liés à une anomalie plaquettaire congénitale peuvent avoir deux origines : la présence d'un déficit quantitatif par insuffisance de production centrale et/ou la présence d'un déficit qualitatif entraînant une limitation des plaquettes à adhérer au sous-endothélium, à s'activer ou à s'agréger de manière irréversible. De nombreuses analyses ont été développées au cours du temps afin de mettre en évidence ces différentes anomalies. Nous présenterons dans cette partie les examens essentiels pour l'identification des principales pathologies des plaquettes connues à ce jour.

1.3.1.1 Etude de la morphologie plaquettaire

1.3.1.1.1 *Numération plaquettaire et microscopie optique*

L'examen biologique de première intention permettant d'évoquer une insuffisance de production de plaquettes par la moelle osseuse est la réalisation d'une numération plaquettaire avec évaluation du volume plaquettaire moyen (VPM). Une thrombocytopénie doit alors être recherchée (numération plaquettaire < 150 000 plt/ μ L) (Rapport de l'ANAES : lecture critique de l'hélogramme : valeurs seuils à reconnaître comme probablement pathologiques et principales variations non pathologiques, 1997) (Geneviève, 2014) associée ou non à une macrocytose plaquettaire (VPM > 10.9 fL). L'évaluation de ces résultats permet déjà d'orienter le diagnostic de thrombopathie congénitale vers certaines pathologies bien caractérisées. En effet, les travaux récents de Noris et al (Noris et al., 2014a) réalisés sur une population de 376 patients atteints de thrombopathies bien caractérisées montrent que la présence de plaquettes largement macrocytaires oriente le diagnostic vers un groupe de pathologies limitées qui seront présentées dans le chapitre suivant : les syndromes MYH9, les maladies de Bernard-Soulier et dans une moindre mesure les anomalies de la tubuline β 1, les syndromes des plaquettes grises, les anomalies de l'alpha-actinine et les anomalies de la filamine A. Sur la base de cette observation, les autres thrombopathies actuellement connues ne semblent pas différenciables à la seule lecture de ces paramètres de numération. Toutefois, un groupe de pathologies avec présence de plaquettes microcytaires se démarque mais une zone de recouvrement du VPM avec les valeurs obtenues chez les témoins inclus dans l'étude ne permet pas d'isoler de manière fiable ces pathologies sur ce seul paramètre. En parallèle de la numération plaquettaire, l'observation du frottis sanguin coloré au May-Grunwald-Giemsa peut également donner des informations capitales sur la pathologie : la présence d'inclusion basophile dans les polynucléaires neutrophiles oriente vers un syndrome MYH9, la présence de plaquettes incolores ou très pâles permet d'évoquer un syndrome des plaquettes grises, l'observation de granules géants dans les polynucléaires doit faire penser à une maladie de Chediakh-Higashi et la présence de granules géants dans les plaquettes oriente le diagnostic vers une maladie de Paris-Trousseau.

Les nouveaux automates de numération proposent actuellement, en plus des paramètres classiques de la numération plaquettaire, une évaluation quantitative des plaquettes immatures (IPF= immature platelet fraction) dites plaquettes réticulées. Ces plaquettes réticulées correspondent aux plaquettes les plus jeunes qui contiennent encore de l'ARN et des ribosomes (Ault and Knowles, 1995). Ce nouveau paramètre IPF est basé sur la mise en évidence de ces plaquettes jeunes contenant des résidus d'ARN à l'aide d'un marquage des acides nucléiques (par la polyméthine et l'oxadine sur les automates XN de Sysmex) (Briggs et al., 2012). Un algorithme non publié permet d'évaluer la fraction des IPF par l'automate. Cette nouvelle technologie semble bien adaptée à l'évaluation des capacités de production plaquettaire de la moelle osseuse au cours du suivi des greffes de cellules souches hématopoïétiques (van der Linden et al., 2014) et des purpuras thrombotiques idiopathiques (Adly et al., 2015). Cependant, bien que certaines études soient actuellement en cours, aucune publication permettant de corréler la numération des IPF avec des sous-types de thrombopathies congénitales n'est parue à ce jour. Par ailleurs, l'absence de compréhension des algorithmes permettant la numération des IPF ne permet pas de considérer ce paramètre comme fiable et utilisable dans une réflexion scientifique. Du reste, l'utilisation des paramètres de la numération plaquettaire ne permet pas dans une immense majorité de cas de statuer sur le potentiel hémorragique des thrombopathies congénitales. En effet, comme le montrent les recommandations sur les modalités des transfusions plaquettaires publiées par l'Afssaps (aujourd'hui ANSM) en 2003, le risque d'hémorragie spontanée chez les patients thrombopéniques n'est réel qu'en cas de thrombopénie sévère inférieure à 10 000 plt/ μ L ce qui est rarement le cas lors des thrombopathies congénitales. Une évaluation de l'intégrité des fonctions plaquettaires est donc indispensable dans un contexte de suspicion de pathologie plaquettaire.

1.3.1.1.2 Etudes plaquettaires en immunofluorescence

L'utilisation d'anticorps spécifiques couplés directement ou indirectement à des fluorochromes permet la mise en évidence de nombreux récepteurs ou molécules plaquettaires directement sur un frottis sanguin fixé. Cette technique simple permet le dépistage des déficits en certains récepteurs (GPIIb-IIIa, GPIb-V-IX) et des principales anomalies de l'ultrastructure plaquettaire (granules α , δ , tubuline, myosine). Ces techniques d'immunofluorescence font en particulier partie des tests de dépistages des syndromes MYH9 (Figure 9). En effet, l'utilisation d'un anticorps anti-myosine 2A permet la mise en évidence d'amas de myosine dans les polynucléaires neutrophiles chez les patients atteints. C'est aussi un outil important pour l'étude des granules α (marquage VWF, thrombospondine et P-selectine), des granules δ (marquage CD63 et LAMP2) et des macrothrombopénies (marquage MYH9, tubulines, et filamine) (Figure 9). La mise en évidence d'un immunomarquage anormal permet entre autre d'orienter les tests spécialisés qui conduiront au diagnostic de la thrombopathie.

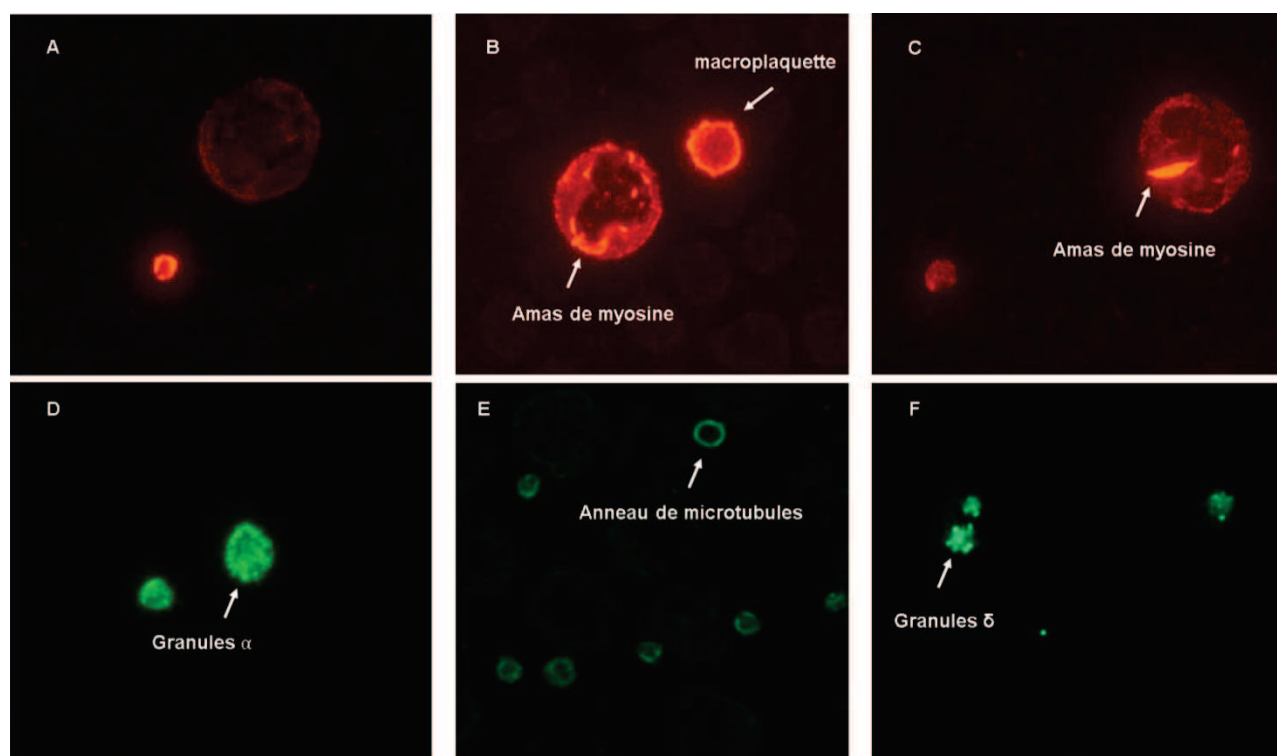


Figure 9 : Immunofluorescence indirecte réalisée sur des frottis sanguins fixés

A : marquage anti-myosine 2A sur des plaquettes témoins. B : marquage anti-myosine 2A sur les plaquettes d'un patient MYH9 (mutation exon 40). On note la présence de macroplaquettes et d'amas de myosine dans un polynucléaire. C : marquage anti-myosine 2A sur les plaquettes d'un patient MYH9 (mutation exon 38). On note la présence d'un gros amas de myosine en forme de banane. D : marquage anti-P-selectine sur des plaquettes témoin. On note un marquage punctiforme correspondant aux granules α . E : marquage anti-tubuline sur des plaquettes témoin avec la présence d'un anneau de microtubules caractéristique. F : marquage des granules denses sur des plaquettes témoin à l'aide d'un anticorps anti-CD63.

1.3.1.1.3 Ultrastructure plaquettaire et microscopie électronique

En complément de l'étude du frottis sanguin en microscopie optique, l'observation des plaquettes en microscopie électronique permet de visualiser l'ensemble de l'ultrastructure plaquettaire. L'utilisation de la microscopie électronique à balayage (scanning electron microscopy – SEM) permet d'accéder à la surface des plaquettes et en particulier d'étudier leur changement de forme, l'émission de filopodes et leur étalement.

La microscopie électronique à transmission (MET) permet de son côté d'effectuer des observations en coupe et de mettre en évidence les déficits quantitatifs en granules α ou denses ainsi que les anomalies des principales structures internes des plaquettes. Cette technique est d'ailleurs un des tests de référence pour le diagnostic du syndrome des plaquettes grises (Islam and Alamelu, 2011) (Figure 10). L'étude de l'ultrastructure plaquettaire en MET peut être complétée par des immunomarquages utilisant des billes d'or. Cette technique complexe réservée aux laboratoires spécialisés permet de visualiser directement dans les plaquettes la localisation de l'antigène cible de l'anticorps utilisé.

Enfin, l'utilisation de microscope électronique à double faisceaux (dual Beam) permet d'effectuer la reconstruction de plaquettes et de mégacaryocytes en trois dimensions. Ces microscopes associent un faisceau focalisé d'ions réalisant des coupes ultrafines et la technologie des microscopes électroniques à balayage permettant une acquisition numérique de chaque coupe réalisée. Le traitement des données obtenues permet la visualisation des éléments observés en trois dimensions.

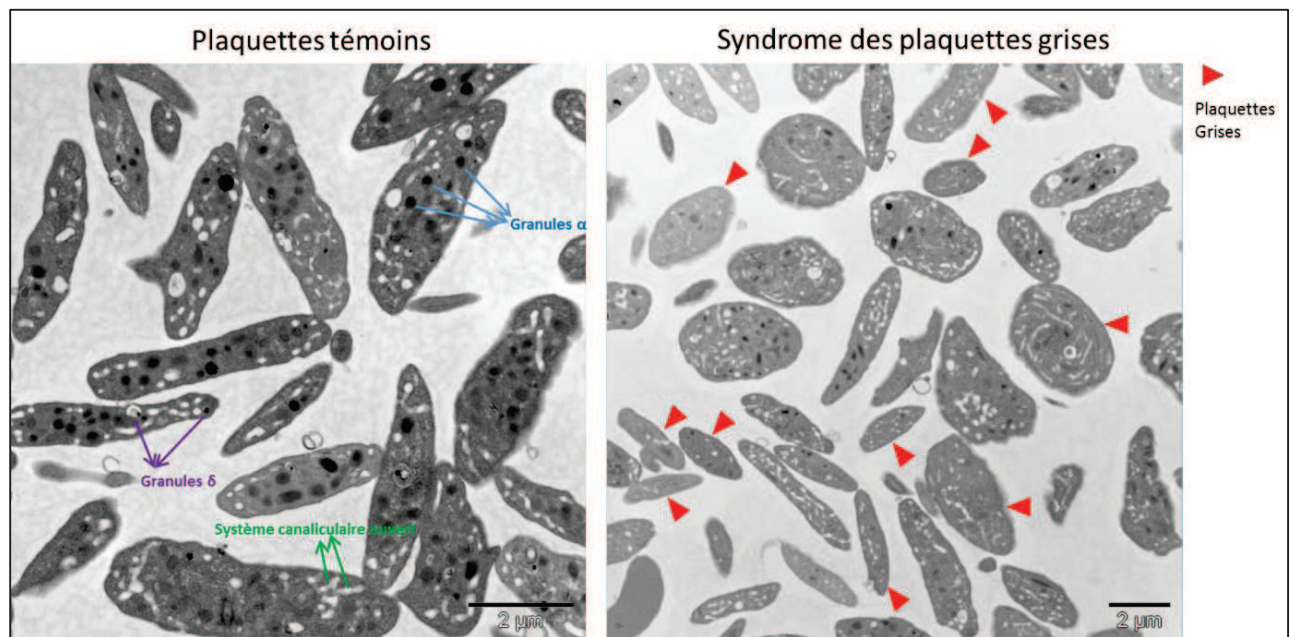


Figure 10 : Plaquettes sanguines en microscopie électronique à transmission

A gauche, plaquettes témoins en coupe transversale où l'on peut observer la présence de nombreux granules α , de quelques granules δ et du système canaliculaire ouvert. A droite : plaquettes d'un patient atteint du syndrome des plaquettes grises où l'on note une absence de granules α dans de nombreuses plaquettes (Images, Anita Eckly, UMR S949).

1.3.1.2 Tests de dépistage des anomalies de l'hémostase primaire

1.3.1.2.1 Temps de saignement

En parallèle de l'examen clinique, de l'interrogatoire des patients et surtout de l'établissement du score hémorragique selon les recommandations des sociétés savantes (ISTH, International Society of Thrombosis and Haemostasis) ou de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), le temps de saignement est le seul test clinique réalisé *in vivo* disponible pour le dépistage des thrombopathies. Ce test évalue le temps d'arrêt du saignement après une incision calibrée à l'oreille (épreuve de Duke), sur l'avant-bras et sous pression contrôlée de 40 mm Hg (méthode Ivy-incision) ou triple ponction simultanée (Ivy-trois points) de la peau. Le temps d'arrêt du saignement est mesuré et correspond à la cinétique de formation du clou plaquettaire au cours de

l'hémostase primaire. Selon la technique utilisée, les valeurs normales varient entre 2 et 4 minutes pour l'épreuve de Duke, entre 2 et 5 minutes pour la technique d'Ivy-trois points et entre 4 et 8 minutes pour la technique d'Ivy-incision. Cependant, ce test invasif est peu sensible (en particulier en cas de thrombopathie modérée ou de maladie de Willebrand), peu spécifique et dépend beaucoup de l'opérateur. En conséquence, depuis 2010 la Haute Autorité de Santé recommande de ne plus réaliser ce test pour le dépistage des pathologies de l'hémostase primaire (Biologie des anomalies de l'hémostase 2010).

1.3.1.3 Temps d'occlusion plaquettaire

Ce test de dépistage alternatif réalisé *in vitro* est disponible depuis 1995 (Kundu et al., 1995). Un petit automate : le « platelet function analyser » (PFA-100 puis PFA-200) permet d'évaluer les capacités des plaquettes à occlure un micro-capillaire de 150 µm de diamètre recouvert d'une matrice de collagène en présence d'ADP ou d'adrénaline. Un allongement significatif du temps d'occlusion permet d'orienter le diagnostic vers une anomalie de l'hémostase primaire en l'absence de prise d'aspirine. Cependant, cette technique a de nombreuses limites à prendre en compte dans l'interprétation des résultats :

- une sensibilité et une spécificité limitées (respectivement 80% et 60%, (Karger et al., 2007)) pour le diagnostic des anomalies modérées de l'hémostase primaire.
- un temps d'occlusion par définition allongé en cas de thrombopénie inférieure à 80 000 plt/µL ou d'hématocrite inférieure à 30% (Harrison, 2005).
- une incapacité à discriminer entre les pathologies plaquettaires et les maladies de Willebrand.
- une insensibilité pour le dépistage des maladies du pool vide (Sladky et al., 2012).

Dans ce contexte, le PFA-100 reste un automate de dépistage intéressant à utiliser en routine. En effet, il n'est pas invasif comme les méthodes de temps de saignement bien qu'il ne permette pas dans certains cas de statuer sur la présence d'une thrombopathie chez un patient.

1.3.1.4 Agrégation plaquettaire

La technique de référence pour l'étude des fonctions plaquettaires reste à ce jour l'agrégation plaquettaire réalisée *in vitro* par technique photométrique. La technique a relativement peu évolué depuis sa mise au point en 1962. Le principe est resté le même : une suspension plaquettaire, un PRPc (plasma citraté riche en plaquettes obtenu après centrifugation à 250 g pendant 15 minutes du sang total prélevé sur tube citrate 0.129 M) ou des plaquettes lavées (préparées selon Cazenave et al (Cazenave et al., 2004) (Cazenave et al., 1983)), est mise sous agitation à 37 °C puis les plaquettes sont stimulées par un agent agrégant spécifique d'une voie d'activation entraînant leur agglutination ou leur agrégation. Des courbes représentatives de la cinétique d'agrégation sont alors obtenues et permettent d'apprécier son caractère irréversible, sa vitesse, son amplitude à un temps donné ainsi que la présence du changement de forme des plaquettes (Figure 11).

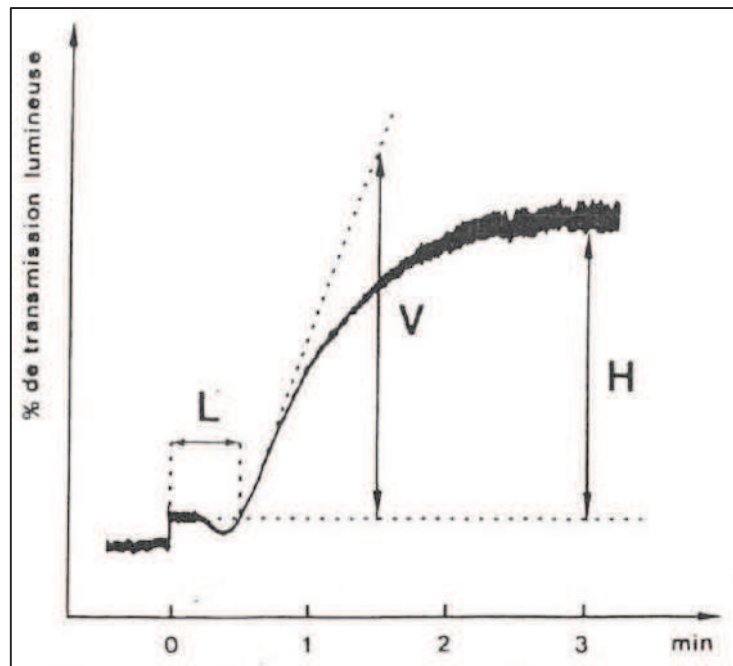


Figure 11 : Courbe typique d'agrégation des plaquettes humaines en PRPc après stimulation par le collagène. *L* représente le temps de latence, *V*, la vélocité et *H* l'amplitude d'agrégation après 3 minutes. On note également une diminution de la transmission lumineuse pendant le temps de latence qui correspond au changement de forme des plaquettes qui deviennent sphériques avant de s'agréger. (Cazenave et al., 1983)

Pour chaque agoniste, un profil d'agrégation typique doit être observé en l'absence d'anomalie plaquettaire. Les principales évolutions technologiques du système portent essentiellement sur les techniques d'évaluation de la turbidimétrie du milieu réactionnel où les systèmes électroniques sont devenus irremplaçables. Par ailleurs, les principaux développements ont porté sur les méthodes de préparation des plaquettes ainsi que sur la disponibilité de nouveaux agonistes extrêmement spécifiques des voies d'activation. Ainsi dès 1972, Mustard JF (Mustard et al., 1972) propose une technique de lavage des plaquettes qui permet une étude fine de la voie d'activation dépendante de l'ADP et cela pendant une durée de 5 à 8h quand les plaquettes sont conservées à 37°C. Selon ce protocole mis à jour par JP Cazenave en 1983 puis en 2004 (Cazenave et al., 2004), les plaquettes sont suspendues dans un milieu tamponné iso-osmotique à pH 7.30 contenant du glucose, de l'albumine, des inhibiteurs de l'activation plaquettaire (PGI₂ et apyrase) et du calcium (2 mM). L'apyrase extraite de pommes de terre germées dégrade les traces d'ADP relarguées au cours du lavage et responsables de la désensibilisation des plaquettes à la stimulation par l'ADP (état réfractaire) (Baurand et al., 2005).

Nous disposons dorénavant d'une batterie d'agonistes dits de première intention qui comprend l'ADP, le collagène, l'acide arachidonique et la ristocétine (Dawood et al., 2012) (Cattaneo et al., 2013) permettant l'obtention de tracés d'agrégation typiques (Figure 12).

Les agrégations réalisées en PRPc correspondent à un système *in vitro* artéfactuel où la concentration en calcium (de l'ordre du μM) est diminuée par rapport au milieu physiologique. La stimulation des plaquettes par l'ADP (5 μM) favorise alors la synthèse de TXA_2 et la dégranulation conduisant à une agrégation irréversible en double vague (Mustard et al., 1975). Le collagène (2.5 $\mu\text{g/mL}$) entraîne une agrégation forte et irréversible dépendante de la GPVI et de l'intégrine $\alpha_2\beta_1$. L'acide arachidonique (1 mM) permet également une agrégation rapide et irréversible dépendante cette fois de la voie de synthèse du TXA_2 et de son récepteur plaquettaire. Les agrégations induites par l'acide arachidonique sont inhibées par une prise d'aspirine qui bloque la COX-1 de manière irréversible. Enfin, la ristocétine entraîne, en présence d'EDTA, une agglutination des plaquettes indépendante du calcium et de la GPIIb-IIIa et évalue la capacité de la GPIb α à lier le VWF.

En plaquettes lavées, la concentration en calcium de 2 mM (proche de la concentration physiologique) entraîne une agrégation réversible après stimulation par l'ADP en présence de fibrinogène car elle empêche la formation de TXA_2 et la dégranulation des plaquettes. Le collagène et l'acide arachidonique entraînent une agrégation complète et irréversible identique à celle observée en PRPc. Les agglutinations induites par la ristocétine ne sont pas utilisables en plaquettes lavées en raison de l'absence de VWF.

En complément de ces agonistes de première intention, de nombreuses molécules ont été développées afin de stimuler de manière exclusive certains récepteurs. Nous citerons deux exemples largement utilisés au laboratoire :

- Le « collagen related peptide » (CRP) permettant une stimulation directe de la GPVI plaquettaire est un outil indispensable dans l'étude des déficits en cette glycoprotéine.
- Le peptide mimétique du TXA_2 : U46619 qui permet de discriminer l'absence de réponse des plaquettes à une stimulation par l'acide arachidonique due à une prise d'aspirine ou à une anomalie du récepteur TBXA2R.

Bien qu'étant considéré comme le « Gold Standard », la technique d'agrégométrie a des contraintes importantes qui limitent sa mise en place hors de laboratoires spécialisés :

- C'est une technique manuelle nécessitant une expertise importante.
- Les échantillons sanguins doivent être traités dans les 4h suivant le prélèvement.
- La numération du PRPc doit être supérieure à 150 000 plt/ μL pour pouvoir interpréter les tests (données de validation de méthode du laboratoire d'étude des fonctions plaquettaires de l'EFS Alsace).
- Chaque agrégation nécessite un volume de 300 μL de PRPc ce qui limite la réalisation des tests en particulier chez les nouveau-nés.
- Les patients doivent être à jeun.
- Peu de standardisation existe actuellement au niveau français ou international.
- Aucune évaluation externe de la qualité n'est disponible.

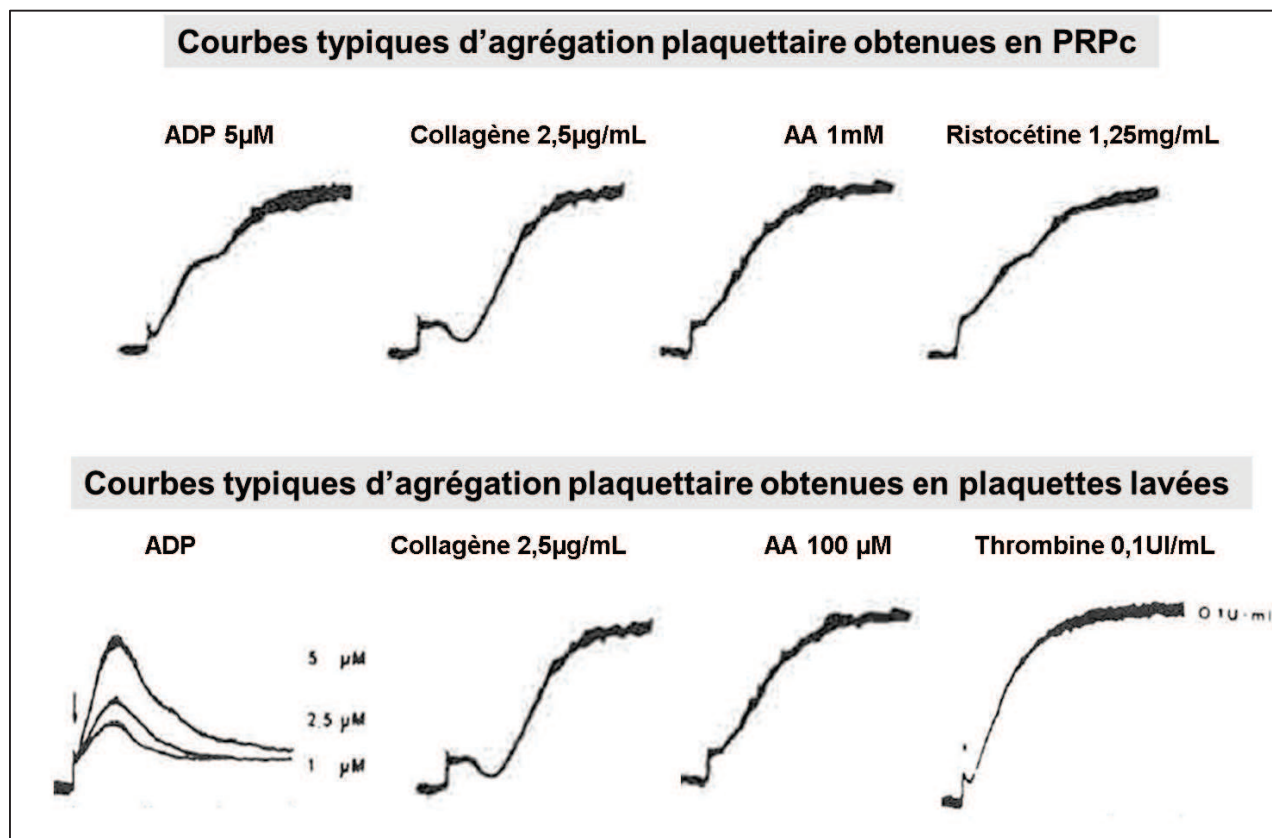


Figure 12 : Courbes normales d'agréations plaquettaires

Courbes d'agréations typiques observées en PRPc et en plaquettes lavées après stimulation par divers agonistes classiquement utilisés pour le dépistage des thrombopathies congénitales. (AA : acide arachidonique).

D'après Cazenave et al (Cazenave et al., 1983).

L'ensemble de ces limitations explique la réticence de nombreux laboratoires non spécialisés à proposer cette analyse de première intention pour l'exploration des thrombopathies constitutionnelles. Plusieurs publications récentes préconisent cependant une conduite à tenir pour l'exploration fonctionnelle des thrombopathies (Cattaneo et al., 2013) (Cattaneo et al., 2009) (Centre de référence des pathologies plaquettaires, agrégation plaquettaire, standardisation méthodologique, mai 2008). La prise en compte de ces recommandations par les laboratoires devrait permettre à l'avenir de développer la réalisation locale de ces tests avant l'orientation éventuelle des patients vers les centres spécialisés.

1.3.1.5 Etude des plaquettes en cytométrie en flux

En complément des études effectuées en agrégométrie, le développement des anticorps monoclonaux et de la cytométrie en flux permettent dorénavant de quantifier de manière simple et rapide les principales glycoprotéines plaquettaires mais également d'effectuer certains tests fonctionnels ou une évaluation de l'activabilité de certaines glycoprotéines plaquettaires.

Des kits commerciaux sont disponibles afin d'effectuer la quantification des principales glycoprotéines plaquettaires : la GPIIb-IIIa, le complexe GPIb-V-IX et la GPIa-IIa (Kit Platelet GP Screen Biocytex®). Ces réactifs commerciaux permettent également d'évaluer la variation de l'expression membranaire (Schober et al., 2003) des récepteurs tels que la GPIIb-IIIa ou le complexe GPIb-V-IX au cours du processus d'activation plaquettaire. Par ailleurs, des kits contenant des billes de calibration ont également été développés afin de quantifier théoriquement n'importe quel récepteur plaquettaire (Kit Platelet Calibrator, Biocytex®). Ce kit est en particulier adaptable à quantification de la GPVI dont des anticorps commerciaux sont dorénavant également disponibles (Clone 1G5, Diagnostica Stago®). La quantification de ces récepteurs est devenue un outil indispensable au diagnostic rapide des maladies de Glanzmann, de Bernard-Soulier ou encore au dépistage des déficits en GPVI. De plus, l'utilisation de ces techniques est bien plus souple que les tests d'agrégation plaquettaire. En effet, les tests sont réalisables 8h après le prélèvement, sont effectués sur sang total citraté ou PRPc et ne nécessitent que quelques microlitres de sang.

Les techniques cytométriques sont également adaptées à la réalisation de certains tests fonctionnels ainsi qu'à une mesure de l'activabilité de certaines glycoprotéines plaquettaires. L'utilisation de l'anticorps PAC-1 dirigé contre le site de liaison au fibrinogène de l'intégrine α IIb β 3 activée permet une évaluation rapide des capacités fonctionnelles de la glycoprotéine (Shattil et al., 1995). Les tests d'exposition de la P-selectine après stimulation des plaquettes (Johnston et al., 1987) évaluent la sécrétion des granules α . La quantification de l'exposition du CD63 permet une première appréciation de la sécrétion des granules denses (Mirlashari et al., 1996). De très nombreuses autres applications sont actuellement disponibles (étude de la liaison du fibrinogène, tests d'exposition des phospholipides anioniques, étude des agrégats leuco-plaquettaires, etc) mais celles-ci ne seront pas détaillées dans la suite de ce document (Michelson, 2013)(Chapter 29).

1.3.1.6 Etude de la sécrétion

Un complément aux explorations effectuées en agrégométrie et en cytométrie en flux consiste en l'exploration des capacités de sécrétion des plaquettes. On peut ainsi distinguer deux grands types d'examen : le dosage direct du contenu granulaire ou l'étude fonctionnelle du processus de sécrétion en lui-même.

L'exploration du contenu des granules α passe par le dosage par technique ELISA de la β -TG (β -thromboglobuline) et du PF-4 (Platelet Factor-4) dans les surnageants obtenus après stimulation des plaquettes lors des tests d'agrégation (Takahashi et al., 1988). Cependant le diagnostic des anomalies des granules α comme le syndrome des plaquettes grises repose plutôt sur la mise en évidence de l'absence de granule α en microscopie électronique ou en immunofluorescence. Le dosage des nucléotides plaquettaires (ATP et ADP) réalisé en chromatographie liquide haute performance (HPLC) est relativement peu répandu bien qu'il soit un outil spécifique, rapide et reproductible pour la caractérisation des anomalies de ces organelles. L'ADP étant majoritairement concentré dans les granules δ , un rapport ATP/ADP supérieur à 4 (valeurs normales du laboratoire : 1.1-2.2) sera alors en faveur d'une anomalie des granules δ . Le dosage des nucléotides associé au dosage de la sérotonine plaquettaire par technique ELISA ou HPLC permet ainsi de poser le diagnostic de

maladie du pool vide liée à un déficit qualitatif ou quantitatif en granules denses plaquettaires (Mumford et al., 2015).

Plutôt que de réaliser le dosage direct du contenu granulaire, la plupart des laboratoires préfère effectuer une exploration des capacités sécrétoires des plaquettes. Le « test à la mépacrine » permet par exemple une évaluation des capacités d'incorporation et de sécrétion des plaquettes. La mépacrine (Gawaz et al., 1993), un marqueur fluorescent dérivé de l'acridine orange, est incorporée dans les plaquettes grâce au même transporteur que la sérotonine (SERT). La mépacrine captée par les granules denses est ensuite sécrétée grâce à la stimulation des plaquettes par divers agonistes. La fluorescence plaquettaire peut ainsi être quantifiée par cytométrie en flux avant et après stimulation. Cependant, bien que ce test puisse permettre une évaluation de la sécrétion des granules denses, il possède au moins deux inconvénients majeurs : la fluorescence disparaît rapidement après le marquage des plaquettes et le marquage non spécifique est souvent important perturbant ainsi l'interprétation des résultats.

Le principe de la lumi-agrégométrie repose sur l'étude simultanée de l'agrégation plaquettaire et du dosage de l'ATP relargué dans le milieu extracellulaire tout au long du processus d'agrégation (Feinman et al., 1977) (Cattaneo, 2009). L'ATP sécrété est converti en adénylate de luciférine en présence de luciférine et de magnésium. L'adénylate de luciférine est ensuite transformé par l'oxygène en oxyluciférine et produit de la lumière facilement quantifiable. Cette technique largement répandue permet la mise en évidence des anomalies globales de la sécrétion sans différencier à elle-seule les déficits liés à une anomalie primaire de sécrétion des déficits qualitatifs ou quantitatifs en granules δ .

Enfin, l'étude de l'incorporation et de sécrétion de sérotonine radiomarquée (Holmsen et al., 1973) est encore actuellement considérée comme la technique de référence pour l'évaluation des capacités de sécrétion plaquettaire. De la sérotonine marquée au tritium ou au carbone 14 mise en présence de plaquettes est rapidement incorporée dans les granules δ . Les plaquettes sont stimulées à l'aide d'agonistes comme le collagène ou la thrombine. La quantité de sérotonine libérée dans le milieu peut ensuite être quantifiée à l'aide d'un compteur adapté. Cette technique permet à la fois d'évaluer les capacités des plaquettes à capter la sérotonine ainsi que leur capacité de sécrétion (Mumford et al., 2015). Cette technique intéressante n'autorise pourtant pas à faire la différence entre les δ -SPD liés à un défaut de stockage de la sérotonine dans les granules denses et les δ -SPD liés à un déficit primaire de sécrétion.

1.3.1.7 Biologie moléculaire

La généralisation des techniques de biologie moléculaire permet dorénavant la recherche de mutations des gènes codant pour les protéines d'intérêt. En effet, la corrélation entre une mutation génétique, une anomalie protéique, et un phénotype précis offre désormais la possibilité de boucler la boucle de la compréhension de la physiopathologie de certaines thrombopathies. Deux grandes stratégies sont actuellement appliquées dans le génotypage des thrombopathies : un séquençage ciblé par méthode de Sanger en cas d'anomalie

fonctionnelle typique d'une pathologie ou une stratégie plus généraliste utilisant les nouvelles techniques de séquençage à haut débit dans les autres cas.

La mise en évidence d'anomalies fonctionnelles typiques à l'aide des techniques citées dans les paragraphes précédents orientera le génotypage vers un ou des gènes bien connus pour être responsables du phénotype plaquettaire observé. C'est notamment le cas dans la maladie de Glanzmann où une absence d'agrégation quel que soit l'inducteur (à part la ristocétine) doit faire suspecter cette thrombopathie et entraîner un séquençage systématique des gènes *ITGA2B* et *ITGB3*.

Dans les cas plus complexes, notamment quand les anomalies fonctionnelles sont atypiques, une stratégie plus généraliste doit être envisagée en utilisant les nouvelles techniques de séquençage à haut débit. Si plusieurs patients apparentés présentent le même profil morphologique ou fonctionnel, un séquençage d'exome ou de génome sera la méthode de choix pour la recherche de gènes candidats potentiellement impliqués dans la pathologie. Nous avons d'ailleurs opté pour cette méthode de séquençage pour rechercher les gènes impliqués dans la maladie du pool vide non syndromique mise en évidence dans une famille comportant trois membres atteints. Les résultats seront présentés dans la troisième partie de ce document. A l'inverse, si une anomalie est mise en évidence chez un patient isolé, le séquençage d'un panel de gènes de susceptibilité sera plutôt envisagé. Cette dernière stratégie est celle que nous avons choisie avec nos collègues de l'EFS Bretagne et l'EFS Centre Atlantique pour conduire une étude d'épidémiologie moléculaire sur la fréquence des mutations de 17 gènes d'intérêt dans la population des donneurs de sang récusés pour thrombopénie (Etude ABC actuellement en cours). Compte tenu de l'investissement financier et de l'expertise nécessaire à l'utilisation de ces nouvelles technologies de séquençage à haut débit, des plateformes de séquençage se développent et centralisent ces analyses. C'est le cas notamment en Angleterre avec le projet du consortium BRIDGE (projet BPD pour bleeding platelet disease, (Cambridge-Biomedical-Research-Centre)) qui vise à identifier de nouveaux gènes responsables de thrombopathies par séquençage d'exome. En France, les centres spécialisés dans l'étude des thrombopathies sont regroupés sous l'égide du Centre de Référence des Pathologies Plaquettaires (CRPP) qui centralise les échantillons d'ADN provenant des patients atteints de thrombopathies afin de séquencer en masse ces ADN à la recherche de mutations connues ou inconnues. Cette approche a un double objectif :

- Offrir la possibilité de rechercher les mutations génétiques chez tous les patients atteints de thrombopathies congénitales.
- Comparer les génotypes de patients présentant les mêmes anomalies fonctionnelles mais dont l'origine géographique est différente afin de mettre en évidence de nouveaux gènes responsables de thrombopathies.

Nous disposons donc actuellement de très nombreux outils diagnostiques qui permettent la mise en évidence d'anomalies fonctionnelles plaquettaires spécifiques. Cependant, la standardisation des méthodes d'exploration des thrombopathies reste actuellement limitée (Gresele et al., 2014). Des travaux récents (Gresele and Subcommittee on Platelet, 2015) tentent de proposer une approche consensuelle pour

l'exploration des pathologies plaquettaires qui mériterait d'être mise en application dans l'ensemble des centres spécialisés. Avec les techniques actuellement disponibles à l'EFS Alsace, nous essayons de nous tenir à ces recommandations (Figure 13).

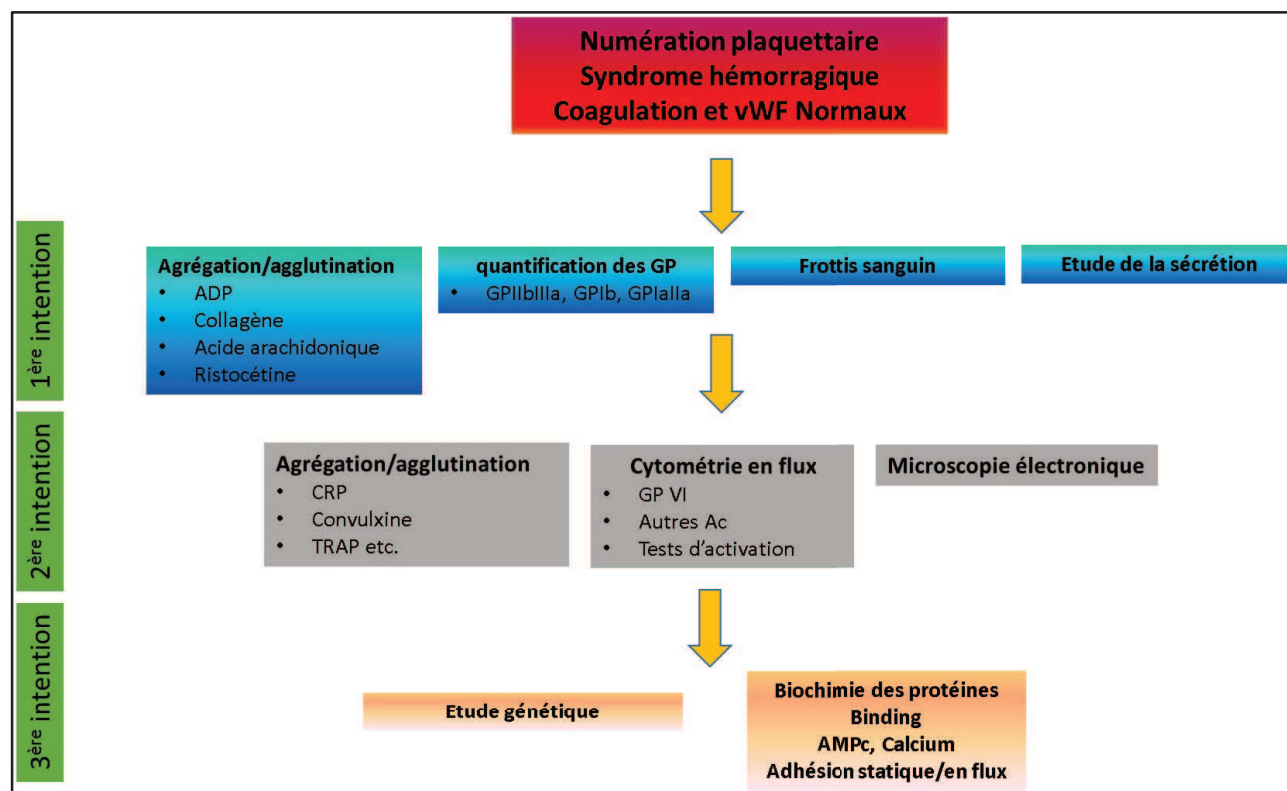


Figure 13 : Stratégie diagnostique préconisée par un groupe de travail du comité de standardisation de l'ISTH et applicable au laboratoire de l'EFS Alsace

1.3.2 Présentation des principales thrombopathies

Les thrombopathies congénitales correspondent donc à un groupe de pathologies hétérogènes associant un syndrome hémorragique cutanéomuqueux de sévérité très variable à une ou des anomalie(s) fonctionnelle(s) plaquettaire(s) et dans certains cas, à des anomalies morphologiques et/ou une thrombopénie. Toutes les fonctions plaquettaires peuvent être touchées (adhésion, activation, agrégation, rôle pro-coagulant), les anomalies morphologiques peuvent porter sur la taille des plaquettes, le cytosquelette ou les organelles intracellulaires et la thrombopénie, quand elle est présente, peut être extrêmement sévère ou tout à fait modérée. Notons que nous ne traiterons pas dans ce chapitre les thrombopénies constitutionnelles pour lesquelles des anomalies fonctionnelles ou morphologiques des plaquettes ne sont pas retrouvées à savoir : les thrombopénies dues à anomalies de l'ankyrine D26 (OMIM : 188000) et les amégacaryocytoses congénitales associées aux anomalies du récepteur MPL (OMIM : 604498).

Malgré les nombreux outils actuellement disponibles, plus de 50% des thrombopathies restent à ce jour non étiquetées (Balduini et al., 2012, Quiroga et al., 2007, Gresele et al., 2014)(Figure 14)

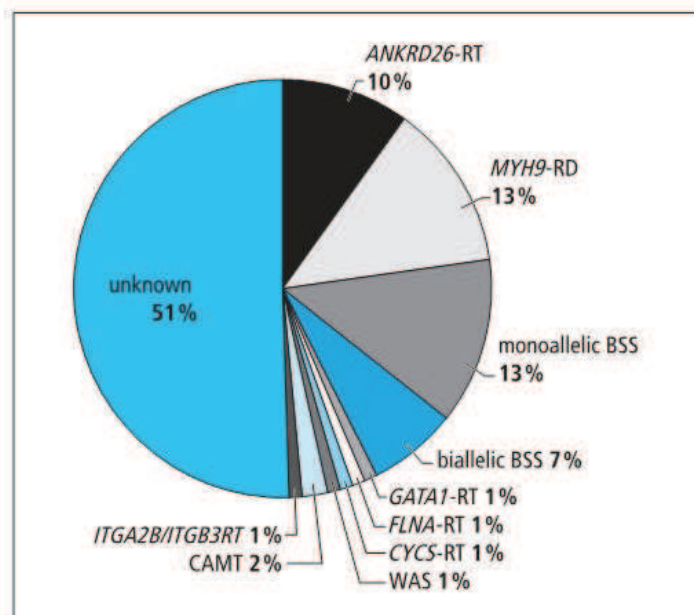


Figure 14 : *Fréquences observées des différentes thrombopathies et thrombopénies constitutionnelles étiquetées et non étiquetées en 2012* (Balduini et al., 2012).

Avec les connaissances actuelles, plusieurs types de classification des thrombopathies peuvent être envisagés. Il est ainsi possible de différencier ces pathologies suivant la fonction plaquettaire perturbée (adhésion, activation, agrégation) (Nurden et al., 2012), suivant leur appartenance ou non à un syndrome (Balduini et al., 2013) ou bien encore suivant le mode transmission (autosomique dominant, autosomique récessif ou lié à l'X).

Cependant, aucune des classifications proposées n'est parfaitement adaptée à l'ensemble des pathologies identifiées à ce jour. Nous proposons dans ce document de présenter ces pathologies de manière alternative en nous appuyant sur la fonction des protéines affectées étant entendu que des chevauchements existent pour certaines entités. Nous détaillerons donc les thrombopathies liées à une anomalie des facteurs de transcription, des récepteurs plaquettaires, des protéines de la structure plaquettaire et enfin des acteurs des voies de signalisation intracellulaire. En nous appuyant sur une série de revues récentes et quelques publications princeps, nous tenterons de brosser le tableau des principales thrombopathies pour lesquelles les mutations des gènes ont été identifiées comme étant responsables de ces pathologies. Deux types de thrombopathies feront l'objet d'une présentation séparée et plus détaillée respectivement dans la deuxième et troisième partie de ce document : les anomalies du récepteur P2Y₁₂ et les maladies du pool vide.

1.3.2.1 Thrombopathies dues à des mutations des facteurs de transcription

Les facteurs de transcription (FT) sont des protéines intra-cellulaires qui régulent l'expression de familles de gènes. Ils interviennent entre autre dans l'activation ou la répression de gènes spécifiques de lignées au cours de la différenciation des cellules souches en cellules spécialisées. Les FT se fixent sur des séquences spécifiques localisées dans les promoteurs des gènes ou les régions cis-régulatrices associées. Ils modulent l'accès des complexes de transcription aux promoteurs des gènes en agissant sur les modifications épigénétiques de l'ADN (méthylation de l'ADN ou acétylation des histones). Comme ces FT sont impliqués dans la différenciation cellulaire et sont rarement spécifiques d'une seule et même lignée, les anomalies de ces protéines connues pour être responsables de thrombopathies congénitales sont également susceptibles d'augmenter le risque de développer des hémopathies malignes.

Les thrombopathies liées à des anomalies des FT ne peuvent que difficilement être reliées à une anomalie fonctionnelle isolée. En effet, comme les FT régulent l'expression de panels de gènes, les anomalies peuvent entraîner une insuffisance de production plaquettaire, une production de plaquettes morphologiquement anormales et/ou des anomalies fonctionnelles. Dans ce contexte, nous avons choisi de traiter ces pathologies de manière séparée.

1.3.2.1.1 Anomalies de *RUNX1*

Le gène *RUNX1* localisé en 22q22.12 code pour la sous-unité α du complexe de transcription hétérodimérique CBF (Core binding factor) indispensable à l'établissement de l'hématopoïèse définitive. (Osato, 2004). Cette sous-unité α porte le site de liaison à l'ADN par l'intermédiaire d'un domaine de 128 acides aminés très conservé dans l'évolution (domaine runt) qui se lie aux séquences 5'-PYGPYGGT-3' de manière spécifique. La sous-unité β codée par le gène *CBFB* augmente l'affinité de la sous-unité α pour l'ADN. Ce gène a été largement étudié dans le cadre de l'exploration des leucémies aiguës myéloblastiques (LAM) et fait partie des critères majeurs de la dernière classification de ces pathologies (Classification des hémopathies malignes OMS 2008) en définissant les LAM dites « CBF ». Les anomalies congénitales de *RUNX1* sont responsables de

thrombopathies avec prédisposition aux leucémies aiguës FDP/AML (OMIM : 601399). L'inactivation totale du gène dans un modèle murin entraîne d'ailleurs la mort *in utero* par hémorragie intracrânienne (Wang et al., 1996) alors que l'inactivation dans les souris adultes provoque une inhibition de la maturation des mégacaryocytes (Ichikawa et al., 2004). Dans le cadre des thrombopathies congénitales, les mutations de RUNX1 touchent essentiellement le domaine de liaison à l'ADN runt et entraînent généralement une haplo-insuffisance (Michaud et al., 2002). Il a été également suggéré que quelques mutations sont responsables de la synthèse d'une protéine à effet dominant négatif (Matheny et al., 2007). Par ailleurs, plus récemment, Bluteau D et al (Antony-Debre et al., 2012) ont montré que RUNX1 régulait l'expression des gènes *MYH9* (codant pour la chaîne lourde de la myosine 2A) et *MYH10* (codant pour la chaîne lourde la myosine 2B) au cours de la mégacaryopoïèse. La thrombopénie observée serait ainsi liée à une absence de répression du gène *MYH10* et à diminution de l'expression de myosine 2A au cours des stades tardifs de différenciation. Cette dérégulation entraîne une diminution de la ploïdie et une altération de la formation des proplaquettes. Biologiquement, ces mutations provoquent une thrombopénie sans macrocytose, associée à un déficit fonctionnel plaquettaire apparenté aux pools vides. Celui-ci se caractérise par un déficit d'agrégation en présence de faibles concentrations de collagène ou d'acide arachidonique. Cliniquement, les patients présentent généralement un syndrome hémorragique modéré à transmission autosomique dominante associée à un risque accru de développer des myélodysplasies ou leucémie aiguës (+ 40%) (Song et al., 1999).

1.3.2.1.2 Anomalies de GATA-1

Le gène *GATA-1* localisé en Xp11.23 code pour la protéine GATA-1 faisant partie de la famille des FT GATA qui se fixent de manière spécifique sur la séquence 5'-GATA-3'. C'est un FT indispensable pour la différenciation et la maturation des lignées érythroïdes et mégacaryocytaires. GATA-1 possède deux domaines en doigt de Zinc qui permettent d'une part l'interaction avec l'ADN et d'autre part l'interaction avec son cofacteur la protéine FOG1 (Friend of GATA). Deux types de thrombopathies congénitales affectant également la lignée érythroïde ont été décrits. Les mutations V205M et D218G (Nichols et al., 2000) (Freson et al., 2001) entraînent une anomalie de l'interaction de GATA-1 avec son cofacteur FOG-1. Biologiquement, la thrombopathie (OMIM : 300367) est caractérisée par une macrothrombopénie associée à une dysérythropoïèse avec ou sans anémie. Les anomalies fonctionnelles plaquettaires seraient caractérisées par une anomalie de la GPVI associée à une diminution de réponse au collagène (Songdej and Rao, 2015). Une autre mutation affectant uniquement la liaison de GATA-1 avec l'ADN (R216Q) a été rapportée pour être responsable d'une autre thrombopathie congénitale liée à l'X associée à une bêta-thalassémie (XLTT, OMIM : 305371) (Tubman et al., 2007). Biologiquement, la pathologie est caractérisée par une anémie microcytaire, une macrothrombopénie curieusement associée à la présence de plaquettes grises. Cliniquement, Phillips et al (Phillips et al., 2007) rapportent en plus du syndrome hémorragique cutanéomuqueux la présence d'une photosensibilité, d'un hirsutisme, d'une splénomégalie ainsi que d'avortements spontanés. Enfin d'autres mutations de *GATA-1* ont été rapportées pour être responsables du syndrome XLANP (X-linked anemia with or without neutropenia and/or platelet abnormalities, OMIM : 300835), mais la thrombopathie liée à un déficit

quantitatif en granules α et δ (Hollanda et al., 2006) est inconstante dans les rares cas décrits. Par ailleurs, le diagnostic différentiel avec l'anémie de Blackfan-Diamond est actuellement discuté (Sankaran et al., 2012).

1.3.2.1.3 Anomalies de *FLI1*

FLI1 est un FT membre des ETS (E-twenty-six) qui contrôlent entre autre l'expression des gènes *ITGA2B* (codant pour la GPIIB), *GPIBA* (codant pour la GPIb α), *GP9* (codant pour la GPIX) et *c-MPL* (récepteur à la thrombopoïétine) (Songdej and Rao, 2015). Ce FT est codé par le gène *FLI1* localisé en 11q23.3. Les délétions partielles du bras long du chromosome 11 incluant le locus *FLI1* sont responsables de deux thrombopathies à transmission autosomique dominante : le syndrome de Jacobson (OMIM : 147791) et le syndrome de Paris-Trousseau. Dans les deux cas, la thrombopathie résulte d'un défaut de maturation mégacaryocytaire (Favier et al., 2003) et est caractérisée par la présence de plaquettes géantes portant parfois un granule α géant (Laleye et al., 2002). Le syndrome de Jacobson se différencie du syndrome de Paris-Trousseau par l'addition d'un retard mental, d'anomalie cardiaque, rénale, intestinale et génitale. La réflexion actuelle réside sur le fait que chez l'Homme, l'haplo-insuffisance liée à la délétion du bras long du chromosome 11 suffit à entraîner la pathologie alors que les modèles murins hétérozygotes *FLI1* +/- ne présentent aucune pathologie (Hart et al., 2000). Très récemment, une mutation homozygote c.970C>T a été mise en évidence chez deux enfants d'une même famille consanguine (Stevenson et al., 2015). Cette mutation entraîne la substitution de l'arginine 324 localisée dans le site de liaison de *FLI1* à l'ADN et entraîne une thrombopathie similaire au syndrome de Paris-Trousseau mais à transmission autosomique récessive.

1.3.2.1.4 Anomalies de *GFI1B*

GFI1B est un FT codé par le gène *GFI1B* (localisé en 9q34.13) qui comporte six doigts de Zinc permettant sa liaison à l'ADN et un domaine répresseur de type SNAG (Moroy, 2005). Ce FT est exprimé essentiellement dans les progéniteurs érythroïdes et mégacaryocytaires et agit comme répresseur transcriptionnel dans les dernières étapes de la différenciation mégacaryocytaire (Foudi et al., 2014). Très récemment, deux mutations localisées dans la séquence codant pour un doigt de Zinc ont été mises en évidence et seraient responsables de la génération d'une protéine tronquée à effet dominant négatif (Stevenson et al., 2013) (Monteferrario et al., 2014). Ces mutations entraînent une thrombopathie à transmission autosomique dominante (OMIM : 187900) qui s'apparente au syndrome des plaquettes grises. En effet, on peut observer chez les patients la présence d'une macrothrombopénie modérée caractérisée par une absence de granule α dans la majorité des thrombocytes. Par ailleurs, une tendance à développer une fibrose médullaire classiquement rapportée dans les syndromes des plaquettes grises a également été identifiée chez les patients.

1.3.2.1.5 Anomalies de HOXA11

Le FT HOXA11 est codé par le gène HOXA11 localisé en 7p15.2 et fait partie des gènes homeobox indispensables aux premières étapes de développement de l'embryon. Dans la lignée hématopoïétique, ce FT serait exprimé uniquement aux stades les plus précoces. Les mutations du gène HOXA11 sont responsables d'une thrombopénie syndromique amégacaryocytaire caractérisée par une thrombopénie majeure, une fusion radio-cubitale et un risque accru d'insuffisance médullaire globale (OMIM : 142958) (Thompson and Nguyen, 2000). Cette pathologie extrêmement rare se rapproche des syndromes à transmission autosomique récessive TAR (Thrombocytopenia-absent radius, OMIM : 274000) qui trouvent leur origine dans la présence de mutations ponctuelles du gène RBM8A codant pour une protéine impliquée dans l'épissage alternatif et l'adressage des ARNm (Albers et al., 2012).

1.3.2.2 Anomalies de la structure des plaquettes

En l'absence d'activation, les plaquettes sanguines restent physiologiquement dans un état de repos où les réserves de membranes représentées par le système canaliculaire ouvert sont enchâssées à l'intérieur de la cellule. En cas d'anomalie des protéines du cytosquelette, les forces qui maintiennent la forme discoïde des plaquettes sont altérées conduisant à des anomalies morphologiques souvent associées à une macrocytose plaquettaire.

Par ailleurs, les déficits qualitatifs ou quantitatifs en organelles plaquettaires sont responsables de thrombopathies associées le plus souvent à des déficits d'activation des plaquettes. Les mutations de *NBEAL2* responsables, comme les anomalies du FT GFI1B, de syndromes des plaquettes grises seront donc traitées dans cette partie. Les maladies du pool vide (δ -SPD) liées à des anomalies qualitatives ou quantitatives des granules δ feront l'objet d'une présentation détaillée dans la troisième partie de ce manuscrit.

1.3.2.2.1 Anomalies de la myosine 2A

Le gène *MYH9* localisé en 22q13.1 code pour la chaîne lourde de la myosine non musculaire de type IIA. Les mutations du gène sont responsables de plusieurs entités auparavant séparées : l'anomalie de May-Hegglin, les syndromes de Sebastian, de Fechtner d'Epstein ainsi que certains syndromes d'Alport. Suite à la mise en évidence de mutations du gène *MYH9*, ces différentes entités ont été regroupées sous le nom de syndrome MYH9 depuis 2000 (OMIM : 160775) (Seri et al., 2000). Ce syndrome à transmission autosomique dominante est la cause la plus fréquente de macrothrombopénie et est caractérisé par un VPM largement augmenté (en majorité supérieur à 15 fL) associé à la présence d'amas de myosine polymérisée dans les leucocytes. Selon la localisation de la mutation, le syndrome peut s'accompagner de l'apparition progressive de surdité, de cataracte et d'insuffisance rénale. En particulier, les mutations du domaine moteur situé en N-terminal entraînent généralement une thrombopénie profonde corrélée à la sévérité du syndrome hémorragique et à l'apparition des manifestations extra-hématologiques dans les tissus qui expriment également la myosine 2A (Pecci et al.,

2014). Le diagnostic repose sur la mise en évidence de la macrothrombopénie associée à une absence de changement de forme plaquettaire objectivable au cours des tests d'agrégation réalisés *in vitro*. L'utilisation de modèles murins Knock-in a permis de reproduire la pathologie humaine liée à des mutations ponctuelles associant une macrothrombopénie et des manifestations extra-hématologiques retrouvées chez l'Homme (Zhang et al., 2012). Cependant, la corrélation génotype/phénotype sur l'apparition des manifestations extra-hématologiques observées chez l'Homme n'a pour l'instant pas pu être mise en évidence dans ces modèles animaux.

1.3.2.2.2 *Anomalie de la filamine A*

Le gène *FLNA* localisé en Xq28 code pour la filamine A, une protéine qui permet l'ancrage des récepteurs membranaires comme le complexe GPIb-V-IX au cytosquelette d'actine (Falet et al., 2010). Les anomalies de la filamine A sont responsables de plusieurs maladies appelées filaminopathies (OMIM : 300017) caractérisées par des anomalies cardiaques, cérébrales et osseuses (Hehr et al., 2006) (Kyndt et al., 2007). Cependant, la mise en évidence récente d'une mutation non-sens dans le gène *FLNA* entraînant la production d'une protéine tronquée suggère que certaines mutations de la filamine A sont responsables de thrombopathies isolées, caractérisées par une macrothrombopénie et un syndrome hémorragique modéré (Nurden et al., 2011b).

1.3.2.2.3 *Mutations de la tubuline $\beta 1$*

Le gène *TUBB1* localisé en 20q13.32 code pour l'isoforme $\beta 1$ de la tubuline exprimée majoritairement par les plaquettes sanguines. Une mutation hétérozygote (p.R318W) de ce gène a été mise en évidence dans une seule famille et semble responsable d'une macrothrombopénie (OMIM : 612901) (Kunishima et al., 2009) liée à une désorganisation de l'assemblage de microtubules au cours de la formation des proplaquettes (Kunishima et al., 2014). Aucune donnée sur un éventuel phénotype hémorragique des patients porteurs de la mutation n'a cependant été rapportée.

1.3.2.2.4 *Mutations de l' α -actinine*

Le gène *ACTN1* localisé en 14q24.1 code pour l' α -actinine 1, une protéine liée aux microfilaments d'actine qui permet leur ancrage à la membrane plasmique. Plusieurs mutations ponctuelles mises en évidence par deux équipes en 2013 (Kunishima et al., 2013) (Gueguen et al., 2013) conduisent à une macrothrombopénie à transmission autosomique dominante qui ne semble pas associée à un syndrome hémorragique particulier. Aucune anomalie fonctionnelle n'a d'ailleurs été mise en évidence lors des épreuves d'agrégation plaquettaire. Ces données ont été confirmées récemment par Bottega et al (Bottega et al., 2015) qui ont identifié des mutations du gène *ACTN1* dans environ 4% des macrothrombopénies de leur cohorte de 128 patients.

1.3.2.2.5 Mutations de la protéine WAS

Le gène WAS localisé en Xp11.22 code pour la protéine WAS qui est exprimée uniquement dans la lignée hématopoïétique et qui participe à la polymérisation du cytosquelette d'actine. Plusieurs types de mutations ont été mis en évidence et donnent naissance à deux pathologies de sévérité différente. A l'inverse des autres thrombopathies liées à une anomalie des protéines du cytosquelette, ces pathologies sont caractérisées par la présence d'une microthrombopénie. Les mutations non-sens, les insertions/délétions (INDEL) et les mutations complexes entraînent le syndrome de Wiskott-Aldrich (OMIM : 301000) (Massaad et al., 2013) qui associe à la microcytose plaquettaire, un déficit immunitaire sévère et une prédisposition aux maladies auto-immunes et aux hémopathies malignes. En l'absence de traitement par allogreffe de cellules souches hématopoïétiques ou de thérapie génique, ce syndrome est mortel dans l'enfance dans la plupart des cas (Boztug et al., 2010). La forme modérée de la pathologie, le syndrome XLT (OMIM : 313900), est lié à la présence de mutations faux-sens et se limite à une microthrombopénie associée à un syndrome hémorragique modéré (Ochs, 2009).

1.3.2.2.6 Anomalie des granules α

Le syndrome des plaquettes grises (GPS) est connu au minimum depuis les années 70 mais la découverte des gènes impliqués dans la pathologie est extrêmement récente. En plus des mutations de *GFIIB* présentées précédemment, le gène *NBEAL2* (Albers et al., 2011) (Gunay-Aygun et al., 2011) (Kahr et al., 2011) a également été décrit pour être responsable de GPS. *NBEAL2*, localisé en 3p21.31 code pour une protéine indispensable à la biosynthèse des granules α dont le rôle exact reste à ce jour indéterminé. Les mutations du gène sont responsables d'une thrombopathie à transmission autosomique récessive (OMIM: 614169) caractérisée par une thrombopénie modérée à VPM légèrement augmenté mais surtout par une absence ou quasi absence de granules α dans les plaquettes des patients. Le syndrome hémorragique associé est généralement modéré mais l'évolution de la pathologie vers la fibrose médullaire majore le phénotype hémorragique dû à la sévérité de la thrombopénie au cours de la vie des patients. A ce jour, aucune différence phénotypique majeure n'a pu être établie entre les GPS dus à des mutations de *GFIIB* et des mutations de *NBEAL2*.

1.3.2.3 Anomalies des récepteurs plaquettaires

L'ensemble des pathologies plaquettaires présentées ci-dessous entraîne des anomalies fonctionnelles des plaquettes sanguines objectivables lors des tests d'agrégation plaquettaire. Certaines pathologies sont associées à des anomalies de la morphologie plaquettaire et/ou à une thrombopénie

1.3.2.3.1 Anomalies du complexe GPIb-V-IX : Syndrome de Bernard-Soulier

Les anomalies du complexe GPIb-V-IX entraînent une pathologie à transmission essentiellement autosomique récessive : le syndrome de Bernard-Soulier (OMIM : 231200). Cette thrombopathie est caractérisée chez l'Homme par une macrothrombopénie (en moyenne 60 000 plt/ μ L (Savoia et al., 2011) avec présence de

plaquettes géantes et un syndrome hémorragique cutanéomuqueux souvent sévère. La pathologie touche environ une personne sur un million (Balduini et al., 2013) et est liée à des mutations dans les gènes codant les sous-unités GPIb α (*GPIBA*, localisé en 17p13.2), GPIb β (*GPIBB*, localisé en 22q11.21) et/ou GPIX (*GP9* localisé en 3q21.3). Aucune mutation touchant le gène codant pour la GPV n'a été décrite à ce jour. La présence de ces anomalies génétiques est responsable d'une diminution voire de l'absence d'expression de la protéine à la membrane plaquettaire et au niveau fonctionnel d'une absence d'agglutination induite par la ristocétine. L'absence du complexe entraîne la suppression de l'interaction entre la GPIb α , la filamine et le cytosquelette d'actine qui maintient normalement les plaquettes au repos dans une forme discoïde (Cranmer et al., 2005) et serait donc impliquée dans la macrocytose plaquettaire. Dans sa forme classique, seuls les patients porteurs de deux mutations du même gène sont symptomatiques. Ceci implique qu'en l'absence de consanguinité, les malades sont généralement hétérozygotes composites. Les personnes apparentées aux patients BSS et porteurs d'une seule mutation ne sont ni thrombopéniques ni symptomatiques mais une macrocytose plaquettaire est fréquemment observée.

Plus récemment, une forme dominante de la thrombopathie a été décrite d'abord dans des familles du sud de l'Italie grâce à la mise en évidence d'une première mutation du gène *GPIBA* : c.515C>T transformant l'alanine en position 172 en valine (Miller et al., 1992). Cette forme de BSS mono-allélique dite « Bolzano » est caractérisée par la présence d'une macrothrombopénie plus modérée que dans les formes de BSS bi-alléliques. L'expression membranaire du complexe GPIb-V-IX n'est la plupart du temps que légèrement inférieure aux valeurs normales observées dans la population générale (Noris et al., 2012). Le syndrome hémorragique est majoritairement modéré et limité à des épistaxis et à des gingivorragies mais peut parfois être complètement absent. Depuis l'identification de la mutation Bolzano, trois autres mutations du gène *GPIBA* (p.Asn57His, p.Tyr70Asp et p.Leu73Phe) et une mutation du gène *GPIBB* (p.Arg42Cys) provoquant toutes des formes de BSS mono-alléliques ont été mises en évidence.

En 2014, 211 familles ont été identifiées dans le monde par le consortium international pour l'étude des BSS bi-alléliques (Savoia et al., 2014). Au sein de ces familles, 45 mutations touchent le gène *GPIBA*, 38 le gène *GPIBB*, et 28 le gène *GP9*. Ces mutations sont réparties essentiellement dans les domaines extracellulaires des protéines et touchent préférentiellement les régions riches en leucines, mais d'autres sites peuvent également être affectés.

On peut enfin noter que dans certaines zones géographiques, la fréquence d'une mutation particulière peut être fortement augmentée. C'est le cas notamment sur l'île de la Réunion où la mutation c.265A>G du gène *GPIBB* a été identifiée chez 13 patients appartenant à 7 familles à priori sans consanguinité. La reconstruction de l'arbre généalogique remontant à la 11^{ème} génération a permis de mettre en évidence un effet fondateur

remontant à la colonisation de l'île Bourbon par les colons français établis sur les comptoirs commerciaux situés à Goa en Inde en 1678 (Lanza et al, poster ISTH, 2012) (Figure 15).

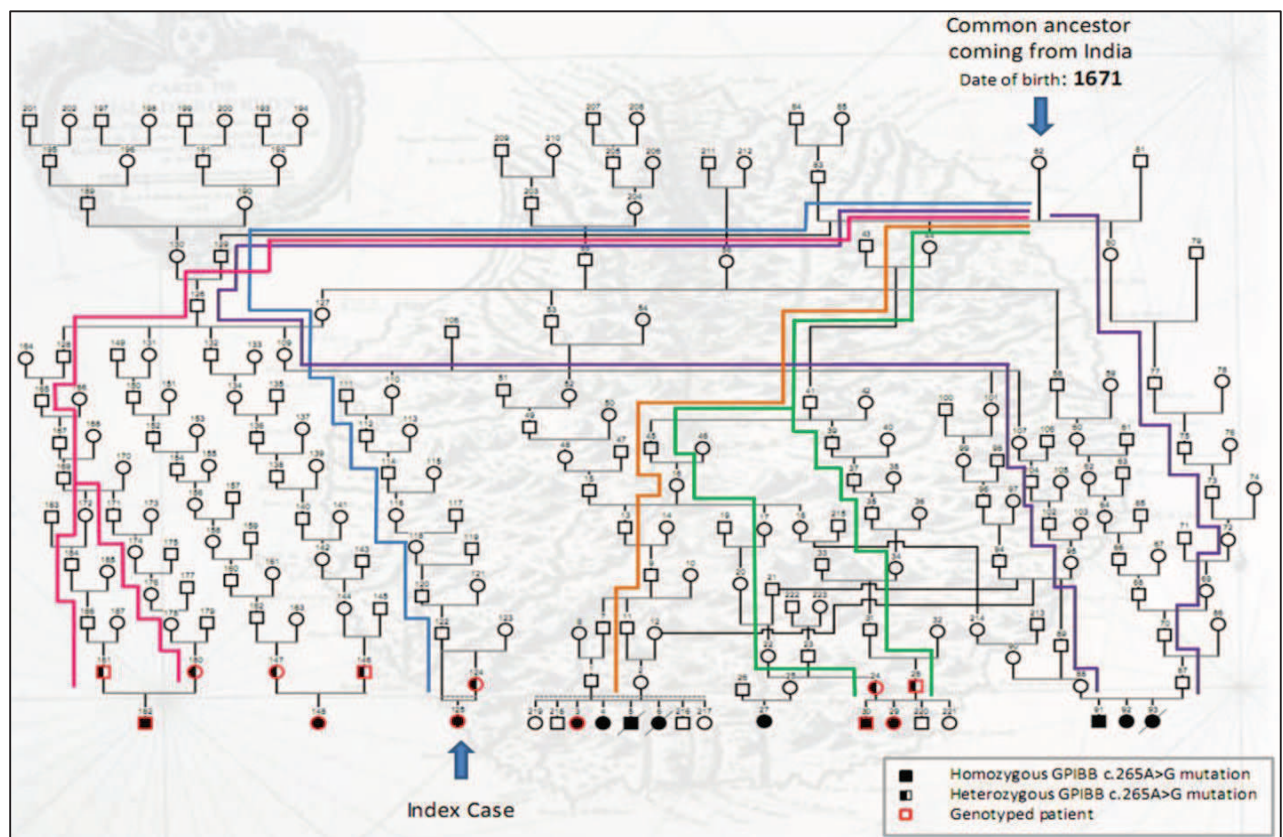


Figure 15 : Arbre généalogique des patients BSS de l'île de la Réunion

Les patients atteints de syndrome de Bernard-Soulier partagent tous un ancêtre commun : une femme originaire de Goa en Inde arrivée en 1678 sur le bateau "le Rossignol". A cette époque, 12 familles françaises étaient présentes sur l'île.

Enfin, certaines mutations de la GPIIb entraînent une pathologie plaquettaire proche de la maladie de Willebrand de type 2B : la maladie pseudo-Willebrand ou Willebrand plaquettaire. Cette thrombopathie à transmission autosomique dominante identifiée en 1982 (Weiss et al., 1982) est caractérisée par la présence d'une mutation gain de fonction qui augmente l'affinité des plaquettes pour le VWF et entraîne une clairance accrue des multimères de haut poids moléculaire ainsi qu'une macrothrombopénie. Le diagnostic repose sur la mise en évidence d'une hyperagglutination induite par la ristocétine à faible concentration (0,5 mg/mL) et nécessite des tests d'agglutination croisés utilisant les plaquettes des patients et un plasma témoin.

1.3.2.3.2 Anomalies de la GPVI

Les anomalies de GPVI (OMIM : 605546) sont généralement mises en évidence lors des épreuves d'agrégation plaquettaire au cours de l'exploration de patients présentant un syndrome hémorragique très modéré. On observe alors une diminution voire une absence d'agrégation induite par le collagène ainsi que par les agonistes directs de la GPVI (CRP et convulxine). Ces résultats sont généralement associés à une diminution d'expression de la GPVI membranaire. La majorité des déficits en GPVI décrits à ce jour chez l'Homme sont des déficits acquis, liés à la présence d'auto-anticorps anti-GPVI, à des anomalies de signalisation en aval du récepteur (Arthur et al., 2007) ou à un processus de clivage du domaine extracellulaire par des métalloprotéases de type ADAMT10. Cependant, quelques cas de mutations familiales ont été récemment décrits (Hermans et al., 2009) (Matus et al., 2013). Il a par ailleurs été rapporté (Nurden et al., 2004) une association d'un déficit en GPVI en présence d'un syndrome des plaquettes grises qui amplifierait le potentiel hémorragique de la thrombopathie.

1.3.2.3.3 Anomalies de l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$: Maladie de Glanzmann

Les déficits qualitatifs ou quantitatifs en GPIIb-IIIa conduisent à un syndrome hémorragique majeur sans thrombopénie appelé Thrombasthénie de Glanzmann (GZ) dont la prévalence est estimée à environ 1/1 000 000 dans la population générale. Nous savons dorénavant que cette thrombopathie est liée des mutations des gènes codant les deux sous-unités de la GPIIb-IIIa. En août 2015, 255 mutations du gène *ITGA2B* et 164 mutations du gène *ITGB3* ont été décrites dans la littérature et l'ensemble des données sont collectées dans la base de données internationale de l'Icahn School of Medicine at Mount Sinai (Mount-Sinai-School-of-Medicine). Globalement, les grandes délétions dans la séquence de ces deux gènes sont rares contrairement aux mutations non-sens, aux mutations de type INDEL de petite taille et aux mutations décalant la phase de lecture qui donnent naissance à des protéines tronquées ou non fonctionnelles (Nurden et al., 2011a). Cependant, à ce jour, aucune corrélation entre le type de mutation et le phénotype hémorragique observé n'a pu être mise en évidence (George et al., 1990) (Nurden et al., 2012). Seuls les travaux publiés par M. Fiore suggèrent que les anomalies du gène *ITGB3* confèrent un phénotype particulièrement hémorragique (Fiore et al., 2012). Les maladies de GZ sont classées en trois types dépendant uniquement de l'expression résiduelle de l'intégrine à la surface plaquettaire: les patients exprimant moins de 5% de GPIIb-IIIa sont considérés comme des patients GZ de type I, les patients exprimant entre 5 et 20% de GPIIb-IIIa sont atteints de maladie de GZ de type II et les rares patients exprimant plus de 20% de GPIIb-IIIa sont considérés comme GZ variants. Les patients GZ variants conservent donc une expression résiduelle de l'intégrine normalement suffisante pour induire la fixation du fibrinogène et l'agrégation plaquettaire. Cependant, sans abolir l'expression membranaire de la protéine, les mutations GZ variants perturbent l'activation de l'intégrine (Chen et al., 1992), la stabilité de la liaison récepteur/ligand (Bajt and Loftus, 1994) (Honda et al., 1998) ou la transduction du signal en aval du récepteur (Wang et al., 1997). Les recherches actuelles se focalisent d'une part sur l'étude de ces variants qui permet l'identification des partenaires moléculaires responsables de l'activation des intégrines (Nurden et

al., 2015) et d'autre part sur la mise en évidence de nouvelles formes de la pathologie associant une macrothrombopénie modérée et une transmission autosomique dominante (Gresele et al., 2009).

1.3.2.3.4 Anomalies du récepteur au thromboxane A_2

Les mutations du gène codant pour le récepteur au TXA_2 (gène *TBXA2R* localisé en 19p13.3) entraînent la présence d'un syndrome hémorragique modéré à transmission autosomique dominante (OMIM: 188070). A ce jour les quatre mutations mises en évidence à l'état hétérozygote entraînent une incapacité des plaquettes des patients à agréger en présence d'acide arachidonique et une agrégation fortement diminuée après stimulation par l'analogue du TXA_2 : U46619 (Mumford et al., 2013) (Nisar et al., 2014).

Les mutations du récepteur $P2Y_{12}$ sont également responsables de maladies plaquettaires entraînant chez les patients un phénotype hémorragique hétérogène. Ces anomalies seront traitées en détails dans la deuxième partie de ce manuscrit.

Par ailleurs, il existe de nombreux autres récepteurs plaquettaires (récepteurs à la sérotonine SERT, récepteur à la vasopressine, récepteur à l'ADP $P2Y_1$, récepteur canal $P2X_1$ etc.) ainsi que d'autres glycoprotéines ($\alpha 5\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$, $\alpha V\beta 3$, etc.) qui pourraient potentiellement être impliquées dans des thrombopathies. Cependant, à ce jour, aucune anomalie des gènes codant ces protéines n'a été mise en évidence chez des patients.

1.3.2.4 Anomalies des protéines de signalisation

1.3.2.4.1 Anomalies de la kindlin-3

Les mutations des gènes codant pour les molécules impliquées dans la transduction du signal en amont de l'activation de l'intégrine $\alpha IIb\beta 3$ donnent naissance à des thrombopathies au phénotype hémorragique très proche de celui observé chez les patients atteints de maladie de GZ. Les mutations du gène *FERMT3* localisé en 11q13.1 (OMIM : 612840) codant pour la kindlin-3 indispensable à l'activation de l'intégrine sont dorénavant connues pour être responsables de la pathologie LAD-3 (leukocytes adhesion deficiency type 3) (Svensson et al., 2009). Cette pathologie à transmission autosomique récessive associe un syndrome hémorragique majeur de type GZ (lié à un déficit d'activation des intégrines) à un déficit immunitaire.

1.3.2.4.2 Anomalie de CalDAG-GEFI

Très récemment, une mutation (c.G742T) du gène *RASGRP2* (Canault et al., 2014) codant pour le facteur d'échange CalDAG-GEFI a été mise en évidence chez trois enfants d'une même famille consanguine présentant un syndrome hémorragique important. Cette anomalie abolit l'activation de la GTPase Rab1 nécessaire à l'activation de l'intégrine $\alpha IIb\beta 3$. Les épreuves d'agrégation plaquettaire réalisées *in vitro* mettent en évidence une diminution d'amplitude d'agrégation après stimulation des plaquettes par l'ADP tandis que la réponse à une stimulation par un peptide agoniste de PAR-1 ou par le collagène semble impactée plutôt quand de faibles concentrations d'agonistes sont utilisées.

1.3.2.4.3 *Anomalie de l'isoforme gamma de la sous-unité catalytique de la protéine kinase dépendante de l'AMPc (isoforme γ de la sous-unité catalytique de la PKA)*

Très récemment également, une mutation du gène *PRKACG* localisé en 9q21.11 a été mise en évidence chez deux enfants issus d'une famille consanguine et présentant un syndrome hémorragique assez sévère (score de l'OMS de 3 ou 4). La pathologie à transmission autosomique récessive (OMIM : 176893) se présente sous la forme d'une macrothrombopénie majeure associée à un déficit d'activation plaquettaire. Celui-ci est mis en évidence par un déficit d'exposition du pool de GPIIb-IIIa intra-cellulaire, un déficit d'exposition de la P-selectine et une réduction de la mobilisation du calcium intracellulaire après stimulation des plaquettes (Manchev et al., 2014).

1.3.2.4.4 *Anomalie de l'Anoctamin 6*

Les mutations du gène *TMEM16F* localisé en 12q12 et codant pour la scramblase Anoctamin-6 entraîne une thrombopathie à transmission autosomique récessive connue sous le nom de syndrome de Scott (OMIM : 262890) (Suzuki et al., 2010). Cette protéine joue un rôle essentiel dans l'acquisition du caractère pro-coagulant des plaquettes au cours de l'activation plaquettaire. En effet, elle permet l'exposition des phosphatidylsérines vers le milieu extracellulaire par un mécanisme de migration dépendant du calcium (Munnix et al., 2003). Les patients atteints de syndrome de Scott présentent généralement un syndrome hémorragique modéré et le diagnostic repose sur la mise en évidence d'anomalies de consommation de la prothrombine et surtout d'un déficit d'exposition des phospholipides anioniques après une stimulation puissante des plaquettes par un peptide agoniste de PAR1 associé au collagène et/ou la convulxine.

1.4 Problématique de la thèse

Nous venons dans cette première partie de dresser un état des connaissances sur les plaquettes sanguines ainsi que sur les outils actuellement disponibles pour le diagnostic des différents types de thrombopathies connues.

Dans ce contexte, le laboratoire d'étude des fonctions plaquettaires de l'EFS Alsace et l'unité INSERM UMR S949 sont régulièrement sollicités pour faire le diagnostic et la caractérisation des anomalies de l'hémostase primaire dues à une pathologie plaquettaire. Nous sommes alors confrontés à trois types de situation :

- Nous mettons en évidence des anomalies morphologiques et/ou fonctionnelles typiques de thrombopathies bien caractérisées et le génotypage des patients met en évidence une mutation connue. Dans ce cas l'objectif du laboratoire est de développer une stratégie diagnostique efficiente et précise pour conduire au diagnostic rapide de ces maladies.
- Nous mettons en évidence des anomalies plaquettaires typiques mais le génotypage du patient met en évidence une mutation non décrite d'un gène déjà identifié. Dans ce cas, la caractérisation de la thrombopathie passera par une étude des effets de la mutation, à la fois sur les plaquettes du patient mais aussi dans un modèle cellulaire ou animal adapté.
- Nous mettons en évidence des anomalies plaquettaires atypiques qui ne peuvent pas être reliées à une thrombopathie bien étiquetée. Le laboratoire caractérise au mieux la pathologie plaquettaire à l'aide d'analyses morphologiques et fonctionnelles spécialisées et recherche des gènes candidats potentiellement responsables de la pathologie.

Nous sommes donc amenés à étudier des thrombopathies très différentes, mais nous nous limiterons pour ce mémoire de thèse d'université aux travaux les plus avancés effectués au laboratoire depuis 2013. Nous présenterons l'étude de deux grands types de pathologies plaquettaires :

- Les anomalies du récepteur P2Y₁₂ : nous avons récemment identifié trois nouvelles mutations du récepteur P2Y₁₂ dans trois familles différentes.
- Les maladies du pool vide : nous développerons en particulier la stratégie adoptée pour rechercher les gènes impliqués dans une forme de maladie du pool vide non syndromique identifiée chez trois membres d'une famille de six personnes.

2 Diagnostic des thrombopathies liées à des anomalies du récepteur P2Y₁₂ et caractérisation des variants du récepteur identifiés au laboratoire

2.1 Le récepteur P2Y₁₂

Le récepteur P2Y₁₂ est un RCPG composé de 342 acides aminés et portant deux ponts disulfures extracellulaires qui lient les cystéines en position 17 et 270 d'une part et les cystéines en position 97 et 175 d'autre part. La protéine est codée par le gène *P2RY12* localisé sur le bras court du chromosome 3 et qui ne comporte qu'un seul exon codant (Cattaneo, 2011b). Le récepteur porte par ailleurs deux sites de glycosylation dans son domaine N-terminal et deux sites de phosphorylation sur les boucles intracellulaires 2 et 3 (Figure 16).

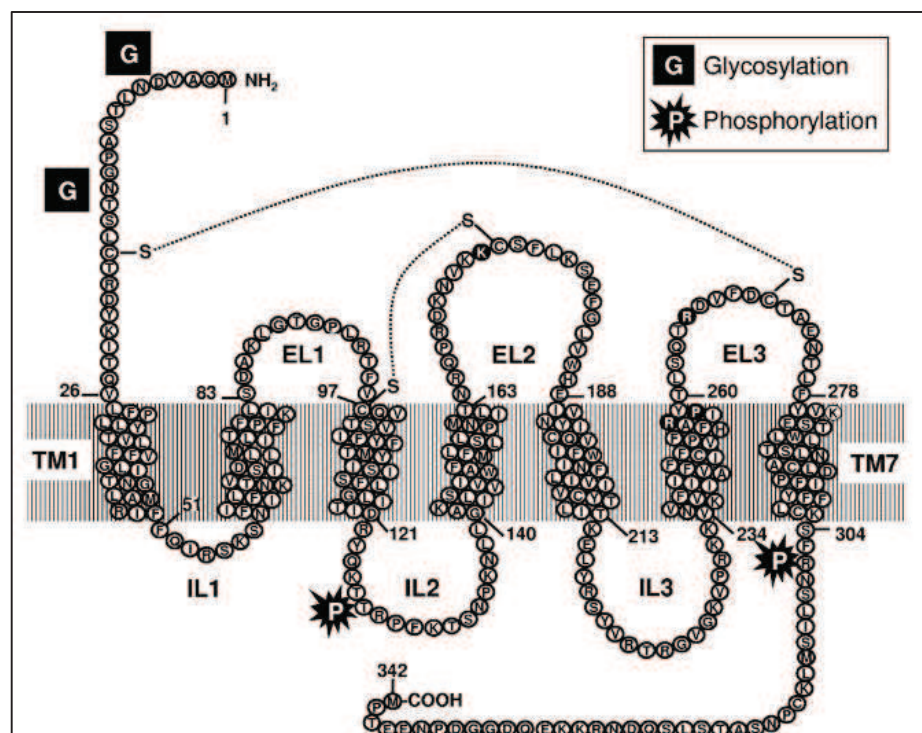


Figure 16 : Structure linéaire du récepteur P2Y₁₂ (Cattaneo et al, Blood, 2011) (Cattaneo, 2011b).

Le récepteur a été cristallisé récemment à la fois dans une conformation où il est lié à un agoniste (le 2-Méthylthio-ADP) (Zhang et al., 2014a) et dans une conformation où il est lié à un antagoniste non nucléotidique (l'AZD1283) (Zhang et al., 2014b) (Figure 17).

Ces travaux récents ont montré que le site de liaison des agonistes nucléotidiques était en grande partie différent de celui permettant la liaison d'un antagoniste non nucléotidique comme l'AZD1283. En effet, la liaison d'un agoniste tel que le 2MeSADP fait intervenir 3 régions du récepteur :

- La liaison du cœur adénylique est effectuée par l'intermédiaire des acides aminés suivants : Y105, F106, L155, S156 et N159
- Le noyau ribose s'insère grâce à l'interaction avec les acides aminés K179, H187, T163 et K174
- Le groupement phosphate se lie grâce aux acides aminés R256, K280, Y259, R19 et R93.

De son côté, l'AZD1283 se lie essentiellement au récepteur grâce aux acides aminés: Y105, F252, R256, Y259, L276 et K280.

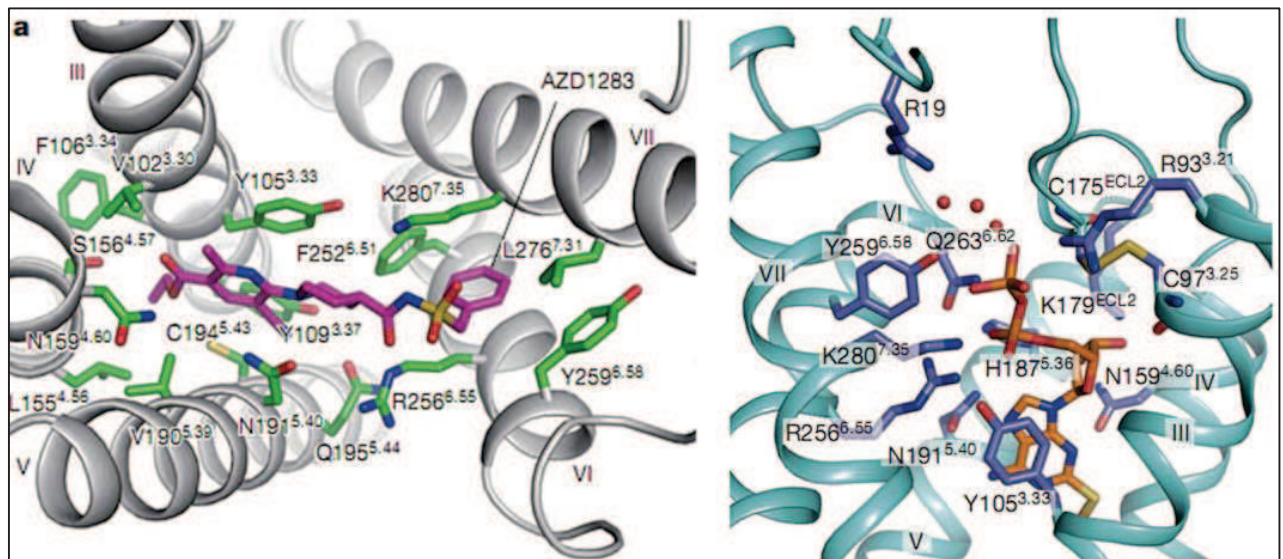


Figure 17 : Représentation en trois dimensions du récepteur $P2Y_{12}$ cristallisé
En présence d'un antagoniste (AZD1283) (à gauche) (Zhang et al., 2014b), et en présence d'un agoniste (2 MeSADP) (à droite) (Zhang et al., 2014a).

2.2 Le récepteur P2Y₁₂ au cours de l'activation des plaquettes

L'ADP est un des principaux agonistes solubles sécrétés par les plaquettes au cours de leur activation. Lorsque l'ADP contenu dans les granules denses est sécrété, il se lie à la fois au récepteur P2Y₁ et au récepteur P2Y₁₂. Le récepteur P2Y₁ entraîne une mobilisation de calcium intra-cellulaire et initie le changement de forme des plaquettes. Le récepteur P2Y₁₂ entraîne alors une levée de l'inhibition plaquettaire induite par la prostacycline (PGI₂) produite par l'endothélium vasculaire et facilite ainsi l'activation plaquettaire induite par les autres agonistes solubles (TXA₂, thrombine, sérotonine). En effet, la liaison de l'ADP au récepteur P2Y₁₂ entraîne une activation de la protéine Gα_i hétérotrimérique couplée au récepteur. La sous-unité α_i inhibe alors l'AC et entraîne une diminution de l'AMP cyclique (AMPc) intracellulaire (Hechler and Gachet, 2011) ce qui facilite l'activabilité des plaquettes. La diminution de l'AMPc entraîne alors une inhibition de la PKA qui module l'état de phosphorylation de la protéine VASP (VAsodilator Stimulated Phosphoprotein). En parallèle, la sous-unité βγ active la PI3K qui participe à l'activation des intégrines α_{IIb}β₃ et aux mécanismes de sécrétion (Figure 18).

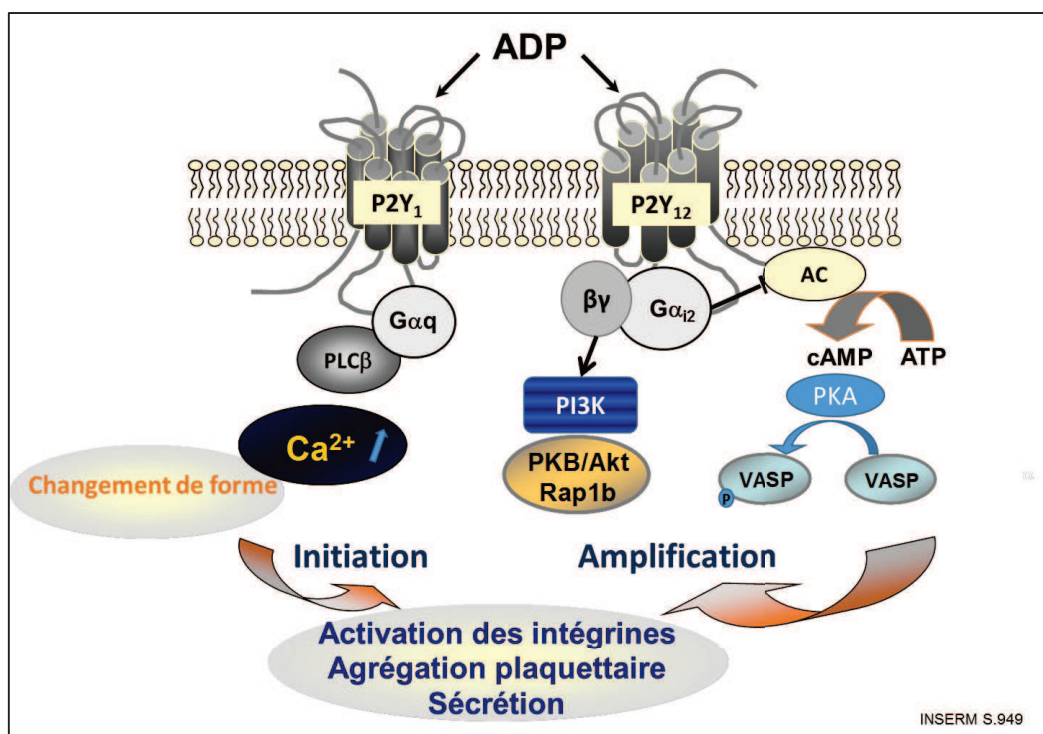


Figure 18 : Voies d'activation en aval des récepteurs P2Y₁ et P2Y₁₂

2.3 Diagnostic des anomalies du récepteur P2Y₁₂

Les anomalies du récepteur P2Y₁₂ peuvent être objectivées *in vitro* grâce à des tests d'agrégation plaquettaire réalisés en PRPc ou en plaquettes lavées. En effet, une absence ou un déficit fonctionnel du récepteur P2Y₁₂ entraîne une diminution très importante et caractéristique de l'amplitude de l'agrégation plaquettaire induite par l'ADP même si celui-ci est utilisé à de fortes concentrations (> 10μM). En particulier, en PRPc, les agrégations induites par l'ADP restent réversibles (Cattaneo, 2011a). La stimulation des plaquettes par le collagène à faible concentration (1.25 μg/mL) entraîne la plupart du temps et en particulier en cas de défaut sévère, des agrégations réversibles.

Le dosage d'AMPc plaquettaire dans différentes conditions de stimulation des plaquettes permet l'évaluation de la fonctionnalité de la signalisation en aval du récepteur P2Y₁₂. En effet le niveau d'AMPc intracellulaire est régulé par une balance entre deux types de récepteurs couplés aux protéines G. La PGI₂ (ou la PGE₁) via son récepteur couplé à une protéine G_s entraîne une activation de l'AC et une augmentation de l'AMPc alors que l'ADP, en stimulant le récepteur P2Y₁₂ couplé à une protéine Gα_i, inhibe l'AC et induit la diminution d'AMPc intracellulaire. En cas d'anomalie de transduction du signal, la stimulation des plaquettes par l'ADP en présence de PGE₁ n'entraînera pas la diminution d'AMPc intracellulaire que l'on observe classiquement sur des plaquettes témoin. (Figure 19). L'inconvénient majeur de cette technique réside dans l'obligation de disposer d'un volume de suspension plaquettaire suffisant pour réaliser les tests. En effet, pour chaque concentration d'ADP testée, 3 à 4 mL de suspension plaquettaire à 300 000 plt/μL sont nécessaires.

Le test VASP (Aleil et al., 2005) qui repose sur la quantification de l'état de phosphorylation de la protéine VASP est une alternative intéressante au dosage direct de l'AMPc. En effet, la phosphorylation de VASP est sous la dépendance de la PKA, elle-même activée par la présence AMPc. La stimulation des plaquettes par l'ADP en présence de PGE₁ entraîne une diminution d'AMPc, et par voie de conséquence la quantité de VASP phosphorylée est modifiée (Figure 19). Ce changement d'état de phosphorylation est alors quantifiable en cytométrie en flux. On obtient un indice de réactivité plaquettaire (PRI) proportionnel au changement d'état de phosphorylation de la protéine. Ce test utilisé classiquement pour évaluer la réponse au traitement des patients traités par antiagrégant plaquettaire de la classe des thienopyridines (antagonistes irréversibles du récepteur P2Y₁₂) peut être également utilisé pour mettre en évidence une anomalie importante de transduction du signal chez les patients suspectés d'être porteurs d'une anomalie du récepteur. Dans ce cas, l'indice de réactivité plaquettaire sera alors fortement diminué (valeurs normales du PRI sur des plaquettes témoins : 69%-100%).

Les études de liaison de différents ligands (ADP, 2-méthylthio-ADP (2MeSADP), analogues nucléotidiques radiomarqués), aux récepteurs P2Y₁₂ permettent alors de mettre en évidence un défaut d'expression du récepteur sur les plaquettes des patients et/ou de caractériser l'anomalie observée. Ces tests peuvent être effectués sur des plaquettes fraîches provenant des patients, sur des membranes plaquettaires ou sur des cellules

exprimant le récepteur d'intérêt. Pendant longtemps, la manière la plus précise de quantifier les récepteurs P2Y₁₂ sur les plaquettes sanguines était d'utiliser le 2MeSADP radiomarqué au ³²P, au ³³P ou au ³H, un agoniste non sélectif du récepteur P2Y₁₂ 100 fois plus puissant que l'ADP, en présence de MRS2179, un antagoniste spécifique du récepteur P2Y₁ (Baurand et al., 2001). Cependant, le développement récent d'un dérivé tritié du cangrelor, un analogue nucléotidique antagoniste sélectif du récepteur P2Y₁₂ : le ³[H]PSB-0413 (El-Tayeb et al., 2005) permet de réaliser une quantification précise du récepteur P2Y₁₂ à la surface des plaquettes (Ohlmann et al., 2013). Les différentes techniques de saturation et de compétition utilisant ce radioligand pour la caractérisation des variants mis en évidence au laboratoire ont fait l'objet d'une publication actuellement sous presse et présentée en annexe 2.

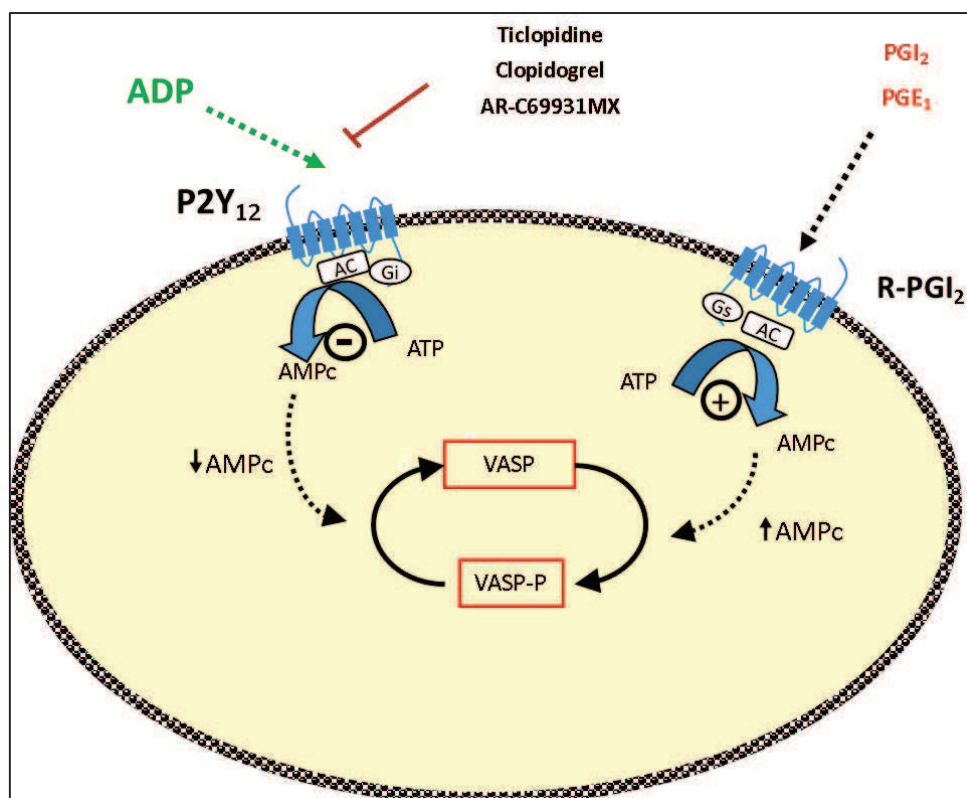


Figure 19 : Régulation de la quantité d'AMPc intracellulaire et de l'état de phosphorylation de la protéine VASP après stimulation des plaquettes par l'ADP ou la PGE₁ (ou PGI₂)
Le traitement des plaquettes par des antagonistes du récepteur P2Y₁₂ (thienopyridines : ticlopidine, clopidogrel ; ou antagoniste réversible du récepteur : AR-C69931MX) inhibe l'action de l'ADP.

2.4 Les différentes mutations décrites pour le récepteur P2Y₁₂

Bien que le récepteur P2Y₁₂ n'ait été cloné qu'en 2001 par Hollopeter G et son équipe (Hollopeter et al., 2001), l'existence de ce récepteur à l'ADP était fortement suspectée depuis plus une dizaine d'année. En effet, il avait déjà été montré en 1990 que la ticlopidine, le premier antiagrégant plaquettaire de la classe des thienopyridines, inhibait sélectivement l'effet de l'ADP sur l'inhibition de l'AC sans affecter la mobilisation de calcium intracellulaire (Gachet et al., 1990) (Defreyn et al., 1991). Peu de temps après, M. Cattaneo (Cattaneo et al., 1992) publia le premier cas de thrombopathie congénitale caractérisée par un déficit d'agrégation induit par l'ADP associé à un syndrome hémorragique et dont les caractéristiques étaient superposables à l'effet d'un traitement antiplaquettaire par les thienopyridines. Ces deux publications apportaient des arguments importants en faveur de l'hypothèse de deux récepteurs à l'ADP distincts à la surface des plaquettes, l'un responsable de l'inhibition de la formation d'AMPc, défectueux chez certains patients et inhibé par les thienopyridines, l'autre responsable de la mobilisation du calcium intracellulaire (Gachet et al., 1995).

Nous savons dorénavant que les déficits congénitaux en récepteur P2Y₁₂ sont responsables de thrombopathies le plus souvent modérément hémorragiques en situation non traumatique. Deux grands types de mutations du gène *P2RY12* peuvent être différenciés : les mutations entraînant une absence d'expression de la protéine à la surface de la cellule et les mutations affectant la fonction du récepteur, soit dans sa capacité de liaison de l'ADP, soit dans sa capacité à transduire le signal. Les premières mutations identifiées correspondent à des mutations entraînant un décalage du cadre de lecture et la génération d'une protéine tronquée ou à des mutations du codon d'initiation de la transcription aboutissant à une absence totale de protéine: la mutation p.Gln98fs (Conley, 2001) chez un patient décrit dès 1992 par M. Cattaneo (Cattaneo et al., 1992), la mutation p.Phe240fs (Hollopeter et al., 2001) chez un patient décrit dès 1995 par A. Nurden (Nurden et al., 1995), la mutation p.Thr126fs (Fontana et al., 2009), et la mutation p.Gly12fs (Dawood et al., 2009). A l'inverse, les mutations faux-sens publiées ne perturbent pas ou peu l'expression membranaire du récepteur. Elles affectent néanmoins les capacités de liaison de l'ADP à ce récepteur ou la transduction du signal en aval de celui-ci. Les mutations p.Arg256Gln et p.Arg265Trp mises en évidence chez le même patient (Cattaneo et al., 2003) entraînent une absence d'inhibition de synthèse d'AMPc en cas de stimulation du récepteur par l'ADP. Récemment, les données cristallographiques ont d'ailleurs confirmé l'importance de cette arginine 256 pour la liaison des groupements phosphates de l'ADP dans son site de liaison au récepteur P2Y₁₂ (Zhang et al., 2014a). La mutation homozygote p.Pro258Thr (Remijn et al., 2007) entraîne également un syndrome hémorragique modéré mais la quantification des récepteurs P2Y₁₂ et la signalisation en aval de celui-ci n'ont pas été étudiées. En 2009, une mutation hétérozygote p.Lys174Glu (Daly et al., 2009) a été identifiée chez un patient atteint de maladie de Willebrand de type 1. La lysine 174 serait en effet nécessaire à la liaison de l'ADP en stabilisant l'interaction récepteur/ligand. La quantification du nombre de sites de liaison a d'ailleurs montré une diminution de 50% du nombre de récepteur P2Y₁₂ à la surface des plaquettes du patient. Enfin, en 2014, une mutation dans le motif DRY (Millar and Newton, 2010) présent sur la deuxième boucle intracellulaire du

récepteur (p.Arg122Cys) (Patel et al., 2014) a été mise en évidence chez un patient également porteur d'un polymorphisme du récepteur à la thrombine PAR1. Ce motif DRY extrêmement conservé dans la famille des RCPG est indispensable dans le maintien du récepteur et des protéines G qui y sont couplées sous forme inactive. La mutation décrite par Patel et al entraînerait d'une part un défaut d'expression du récepteur lié à une anomalie du trafic intra-cellulaire et d'autre part un défaut d'activation de la protéine $G\alpha_i$ couplée au récepteur P2Y₁₂.

2.5 Les variants du récepteur P2Y₁₂ identifiés et caractérisés au laboratoire

Entre 2012 et 2015, en appliquant une stratégie diagnostique basée sur la présence d'un syndrome hémorragique associé à un déficit profond d'agrégations induites par l'ADP à toutes les concentrations testées (2.5, 5, 10, 20 et 100 μ M), nous avons mis en évidence trois nouvelles mutations du récepteur P2Y₁₂ dans trois familles différentes non apparentées. La mutation p.His187Gln trouvée à l'état homozygote chez deux frères issus d'une famille consanguine a fait l'objet d'une caractérisation complète à la fois sur les plaquettes des patients mais aussi dans un modèle cellulaire d'astrocytome humain n'exprimant pas le récepteur P2Y₁₂ à l'état natif. Les deux autres mutations (p.Phe95Ser et p.Tyr259Cys) trouvées à l'état hétérozygote ont été à ce jour uniquement étudiées sur les plaquettes fraîches des patients. (Figure 20)

2.5.1 Mutation p.His187Gln du récepteur P2Y₁₂

En collaboration avec nos collègues italiens (équipe du Pr Marco Cattaneo) et allemands (équipe du Pr Barbara Zieger), nous avons mis en évidence chez deux frères d'origine turque et appartenant à une famille consanguine (l'arbre généalogique est présenté en annexe 3) une anomalie sévère du récepteur P2Y₁₂. Le propositus a été étudié dans les laboratoires de Milan et Freiburg alors que son frère, le patient III-1 a été entièrement caractérisé dans notre laboratoire. L'ensemble de cette étude a fait l'objet d'une publication collaborative en 2015 qui est présentée en annexe 3. La majorité des techniques utilisées sont ainsi présentées dans la partie « Methods » de cet article. Nous détaillerons dans la suite de ce chapitre, l'ensemble des données concernant le patient III-1 ainsi que les expériences de reproduction de la mutation dans des cellules dépourvues de récepteur P2Y₁₂ à l'état natif : cellules 13.21.N1.

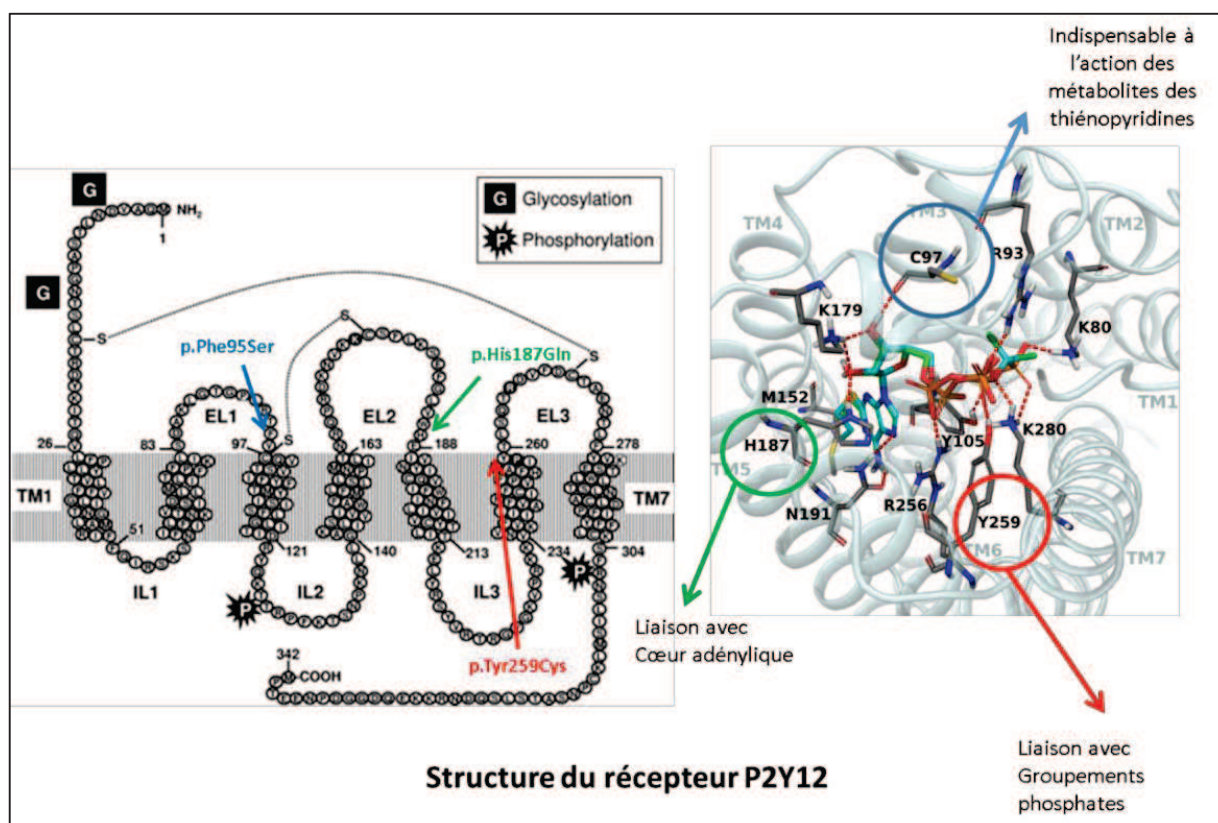


Figure 20 : Structure linéaire (à gauche) et tridimensionnelle du récepteur P2Y₁₂ et localisation des trois mutations identifiées au laboratoire

L'histidine 187 permet la stabilisation du cœur adénylique des ligands par établissement de liaison hydrogène. La tyrosine 259 participe à la stabilisation du groupement phosphate. La phénylalanine 95 est proche de la cystéine 97 qui est indispensable à l'action pharmacologique des métabolites actifs des thienopyridines.

2.5.1.1 Etude des plaquettes du patient III-1

Le patient III-1, âgé de 57 ans lors de son exploration à l'EFS Alsace rapporte une histoire hémorragique modérée associant épistaxis récurrentes dans l'enfance, gingivorragies et saignements excessifs après extraction dentaire. Il a cependant subi une circoncision dans l'enfance sans complication peri-opératoire. La numération plaquettaire (224 000 plt/ μ L, VPM= 10.3 fL), l'examen du frottis sanguin et le bilan de coagulation n'ont mis en évidence aucune anomalie particulière. Le temps d'occlusion plaquettaire (PFA-100) était allongé uniquement avec la cartouche ADP suggérant une anomalie de l'hémostase primaire. Les agrégations plaquettaires réalisées en PRPc et en plaquettes lavées sont d'amplitude fortement diminuée après stimulation par l'ADP quelle que soit la concentration d'agoniste utilisée. Aucune autre anomalie d'agrégation n'a pu être mise en évidence ni en PRPc ni en plaquettes lavées avec les agonistes et les concentrations ici utilisées (Figure 21).

L'étude de la signalisation en aval du récepteur s'est montrée également très perturbée. En effet, le test VASP a mis en évidence une absence totale d'inhibition de la phosphorylation de la protéine VASP après stimulation par l'ADP comme le montre l'indice de réactivité plaquettaire obtenu : 1% (valeurs normales : 69% - 100%). De même, le dosage de l'AMPc intracellulaire montre très clairement une absence d'inhibition de synthèse d'AMPc après stimulation des plaquettes du patient (préalablement exposées à la PGE₁) par l'ADP à la concentration de 100 μ M (Figure 22).

L'ensemble de ces résultats nous a conduits à rechercher une mutation du gène codant pour le récepteur P2Y₁₂. Le séquençage du gène *P2RY12* nous a permis de mettre en évidence la présence d'une mutation faux-sens homozygote c.847T>A conduisant à la substitution de l'histidine 187 par une glutamine. La même mutation homozygote a été retrouvée chez le propositus. L'histidine 187 est localisée juste au-dessus du domaine transmembranaire n°5 (Figure 20) et les études cristallographiques récentes ont montré son importance pour la liaison des ligands tels que le 2MeSADP dans le site actif du récepteur. En particulier, la modélisation du récepteur muté propose que la substitution de l'histidine 187 par une glutamine perturbe la liaison du ligand au site actif en abolissant les liaisons hydrogènes nécessaires à la stabilisation de l'interaction du couple récepteur/ligand.

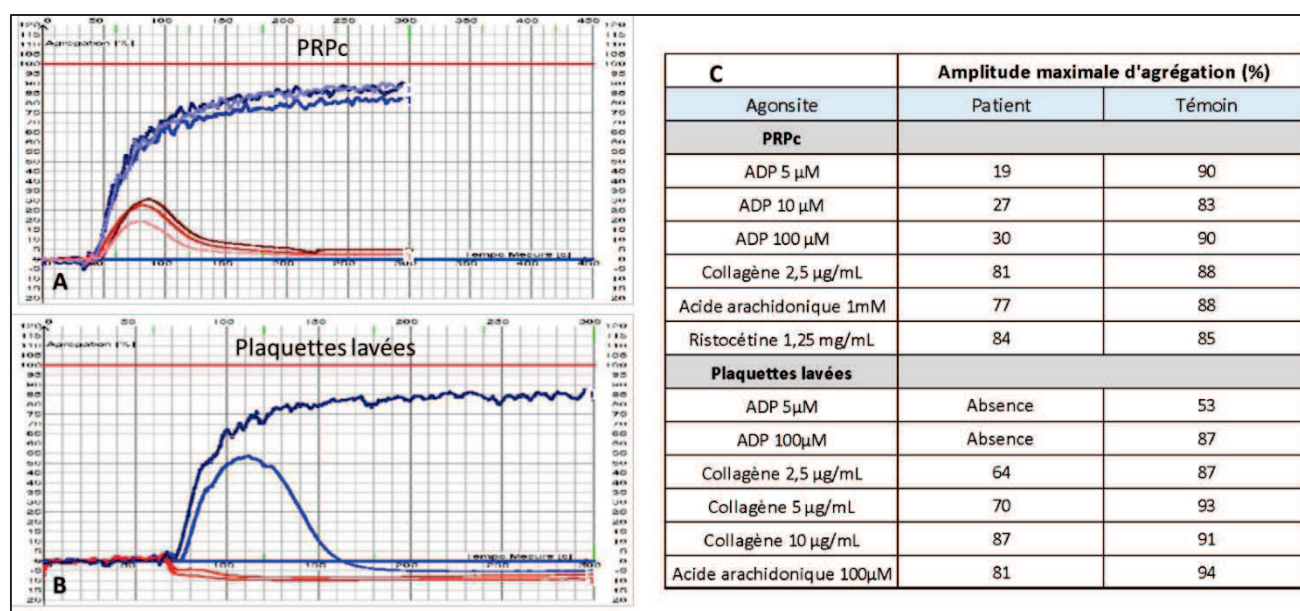


Figure 21 : Agrégations plaquettaires réalisées chez le patient III-1 et chez un témoin du jour
A, agrégations plaquettaires réalisées en PRPc après stimulation par l'ADP (5, 10 et 100 μ M) chez le patient III-1 (courbes rouges) et un témoin du jour (courbes bleues). B, agrégations plaquettaires réalisées en plaquettes lavées après stimulation par l'ADP (5 et 100 μ M) chez le patient III-1 (courbes rouges) et un témoin du jour (courbes bleues). C, présentation des amplitudes maximales d'agrégations obtenues pour les différents agonistes testés au laboratoire sur les plaquettes du patient III-1 et sur les plaquettes d'un témoin du jour.

Nous avons par la suite effectué une quantification du récepteur à la surface des plaquettes du patient ainsi qu'une étude de l'affinité de différents ligands pour le récepteur muté. Pour cela nous avons réalisé des expériences de saturation et de compétition utilisant un dérivé tritié d'un antagoniste sélectif du récepteur $P2Y_{12}$: le ^3H PSB-0413. Les expériences de saturation effectuées en utilisant des concentrations croissantes de ligand radiomarqué en présence d'une concentration constante d'ADP n'ont pas montré de déficit d'expression du récepteur (540 sites par plaquette chez le témoin du jour, 693 sites par plaquette chez le patient III-1) (valeurs normales : 425 ± 50 sites par plaquettes (Ohlmann et al., 2013). Cependant, l'augmentation de la constante de dissociation (K_d) mise en évidence chez le patient (19 nM versus 5,5 nM chez le témoin du jour) suggère une diminution d'affinité du récepteur pour le radioligand (Figure 23).

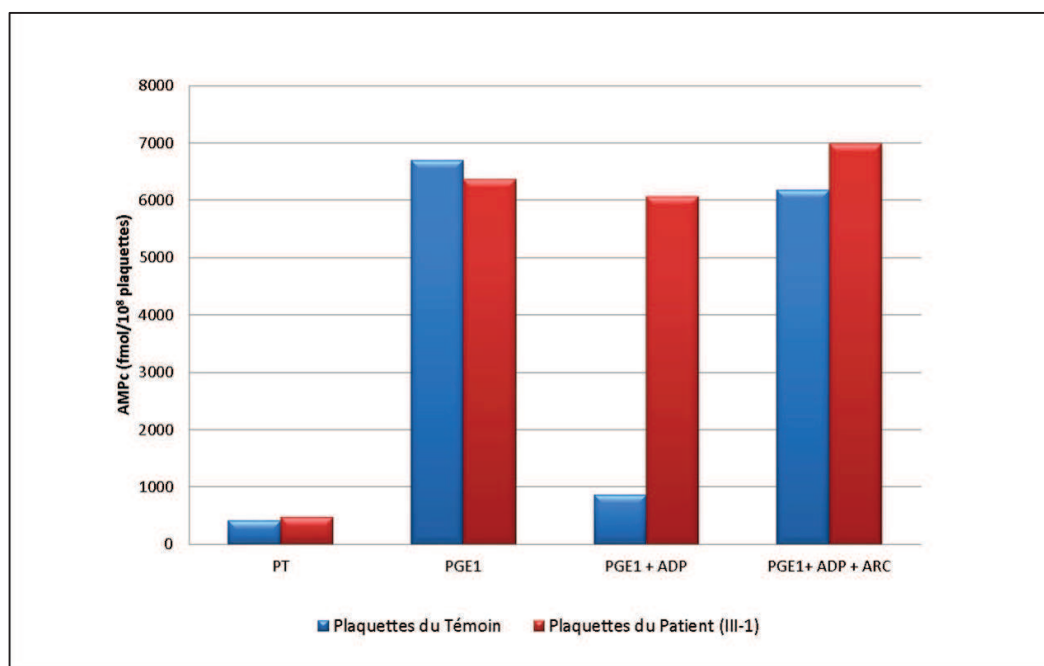


Figure 22 : Dosage de l'AMPc en radio-immunologie chez les plaquettes témoins (bleues) et les plaquettes du patient III-1 (rouge)

En présence de plain tyrode (PT), les plaquettes au repos montrent un niveau basal d'AMPc très bas. En présence d'inhibiteur de l'activation plaquettaire ($\text{PGE}_1, 5 \times 10^{-4} \text{M}$), on remarque une augmentation importante de l'AMPc dans les plaquettes témoins et les plaquettes du patient III-1. Après stimulation des plaquettes par l'ADP ($100 \mu\text{M}$), la quantité d'AMPc s'effondre dans les plaquettes témoin mais reste stable dans les plaquettes du patient. En présence d'un inhibiteur du récepteur $P2Y_{12}$ (AR-C69931MX, $2.5 \times 10^{-4} \text{M}$) et après stimulation par l'ADP, on retrouve dans les plaquettes témoin et les plaquettes du patient, une concentration d'AMPc équivalente à la condition PGE_1 seule. Pour chaque condition, le dosage de l'AMPc en radio-immunologie a été réalisé à l'aide du kit commercial : (cAMP [^{125}I] RIA KIT, Institute of isotope, Budapest, Hongrie) selon les recommandations du fabricant.

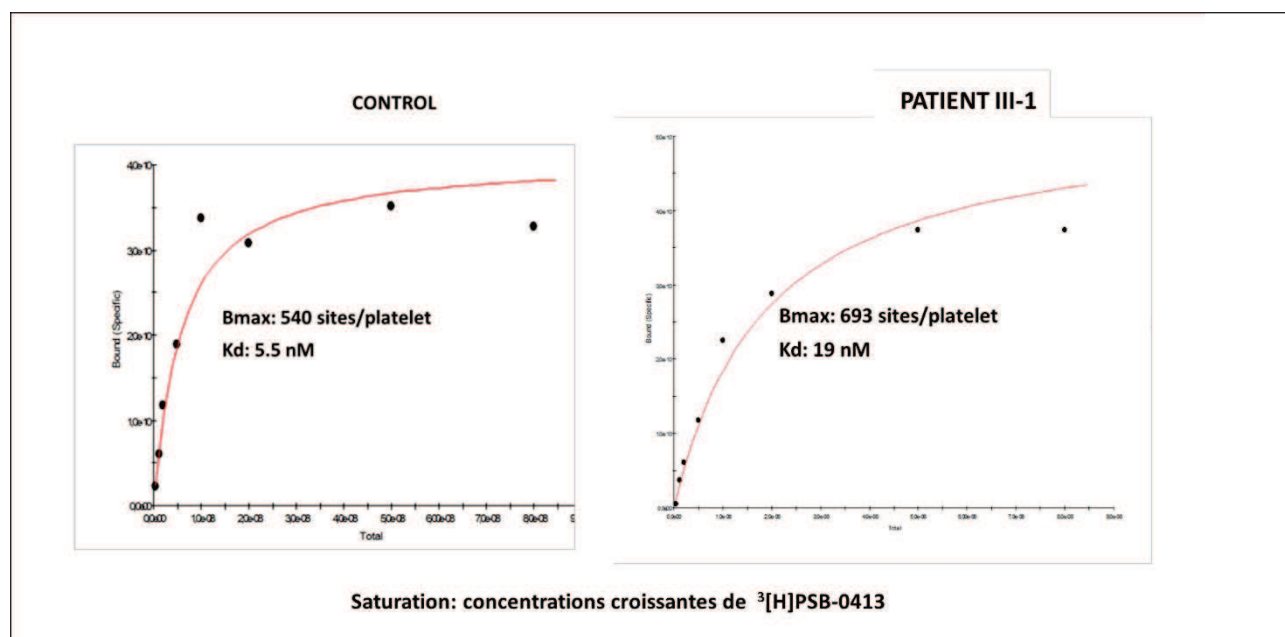


Figure 23: *Expérience de saturation effectuée sur des plaquettes témoin (à gauche) et sur des plaquettes du patient III-1 (à droite)*

Les expériences ont été réalisées en présence d'une concentration fixe d'ADP (1 mM) et de concentrations croissantes de [3H]PSB-0413 (0,4 nM à 80 nM). La constante de dissociation (K_d) permet d'évaluer l'affinité du récepteur pour le radio ligand. La liaison maximale (B_{max}) permet de quantifier le nombre de sites de liaison du [3H]PSB-0413 à la surface des plaquettes.

Les expériences de compétition entre le radioligand et des concentrations croissantes de ligands froids (ADP ou de 2-MeSADP) ont permis d'évaluer l'affinité des ligands pour ce récepteur. L'augmentation des coefficients d'inhibition (K_i) de l'ADP ($K_{i\text{témoin}} = 34,1 \mu\text{M}$, $K_{i\text{patient}} = 174,7 \mu\text{M}$) et du 2-MeSADP ($K_{i\text{témoin}} = 23,6 \text{ nM}$, $K_{i\text{patient}} = 186 \text{ nM}$) pour le récepteur $P2Y_{12}$ mesurés sur les plaquettes du patient par rapport aux plaquettes témoin confirme une diminution d'affinité des ligands pour le récepteur (Figure 24).

Les données obtenues sur les plaquettes du patient au cours des expériences de saturation et compétition montrent donc que la mutation c.847T>A est responsable d'une diminution d'affinité du récepteur pour l'ADP et le 2MeSADP sans déficit d'expression du récepteur sur la membrane des plaquettes. Ces résultats semblent donc confirmer les données cristallographiques quant à l'implication de l'histidine 187 dans la stabilisation de l'interaction des ligands dans le site de liaison du récepteur $P2Y_{12}$.

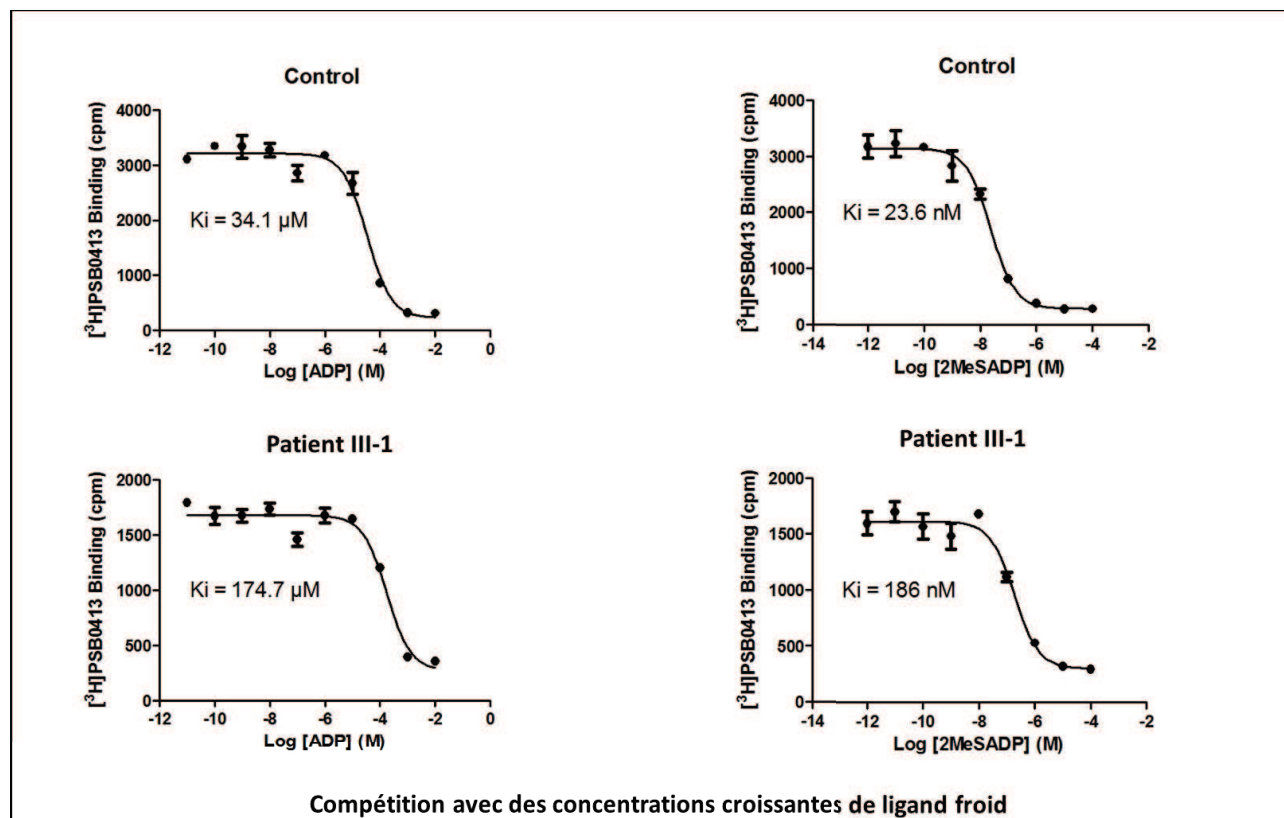


Figure 24 : Expérience de compétition entre une concentration fixe de $[^3\text{H}]\text{PSB-0413}$ (20 nM) et des concentrations croissantes d'ADP (à gauche) ou de 2MeSADP (à droite)
 Les coefficients d'inhibition mesurés reflètent l'affinité du récepteur pour chaque ligand. Pour l'ADP et le 2MeSADP, on note une diminution d'affinité du récepteur pour le ligand étudié lors des expériences réalisées sur les plaquettes du patient (en bas) en comparaison des plaquettes témoin (en haut).

2.5.1.2 Reproduction de la mutation *p.His187Gln* dans un modèle cellulaire adapté : cellules 1321N1

Afin de montrer que la mutation *p.His187Gln* du récepteur P2Y₁₂ est bien responsable de la diminution de l'affinité du récepteur pour ses ligands et que celle-ci abolit la transduction du signal en aval du récepteur, nous avons reproduit la mutation dans des cellules 1321N1 issues d'astrocytome humain et dépourvues de récepteur P2Y₁₂ à l'état natif. Nous avons ainsi généré deux clones de cellules : un clone exprimant le récepteur sauvage (cellules WTD12) et un clone exprimant le récepteur muté (cellules CATC3) (Figure 25). Le protocole de transfection est détaillé dans l'annexe 4 de ce document.

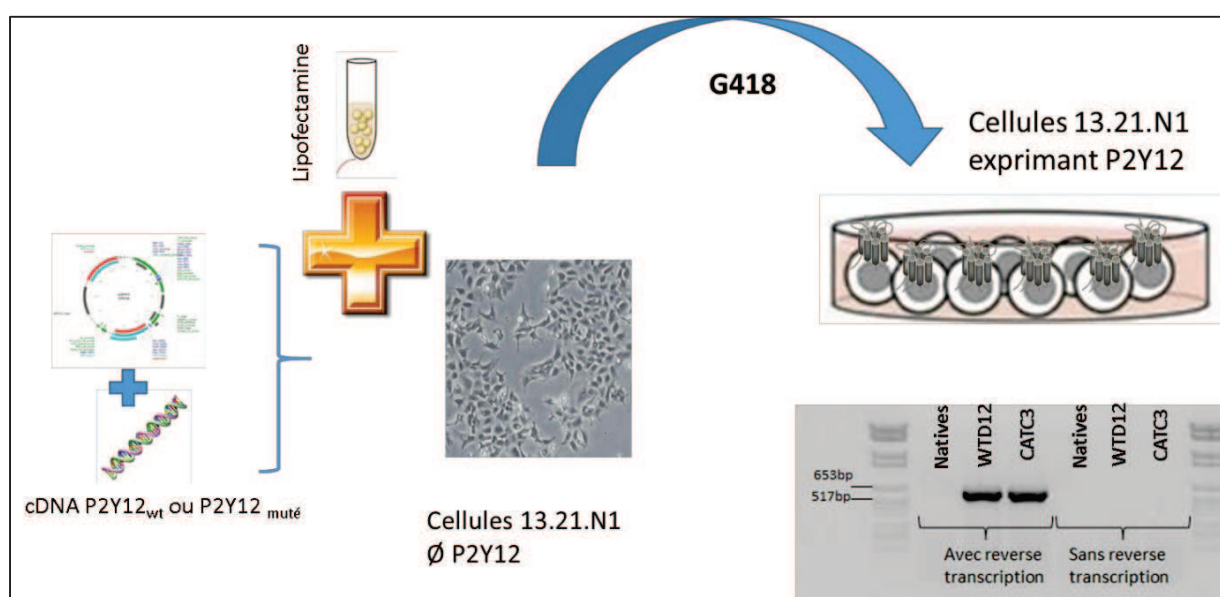


Figure 25 : Méthode de transfection permettant l'obtention de cellules 1321N1 ayant incorporé le plasmide pcDNA3 portant le cDNA du récepteur P2Y₁₂ sauvage (cellules WTD12) ou muté (cellules CATC3). La présence de l'ARN messager a été vérifiée par RT-PCR en utilisant des amorces spécifiques de l'ARNm du récepteur P2Y₁₂ (NES1 et NES2) présentées en annexe 4.

En l'absence d'anticorps monoclonaux anti-P2Y₁₂ disponibles et validés, l'expression du récepteur à la membrane des cellules 1321N1 ne peut être étudiée que grâce à des expériences de saturation décrites dans l'annexe 2 de ce document. Les tests réalisés montrent que le récepteur d'intérêt (sauvage ou muté) est bien présent à la surface des cellules transfectées. La quantification permet de préciser que les niveaux d'expression du récepteur sont de l'ordre de 8500 sites pour les récepteurs sauvages et 3400 sites pour les récepteurs mutés (Figure 26). Cependant aucune différence d'affinité du radioligand pour les deux types de récepteurs étudiés n'a été mise en évidence au cours de cette expérimentation. Pour mémoire, lors des études plaquettaires la différence d'affinité du radioligand pour le récepteur sauvage était environ 4 fois supérieure à l'affinité du

radioligand pour le récepteur muté. Par ailleurs, le K_d de ce radioligand pour le récepteur est généralement comprise entre 3 et 10 nM en fonction du système utilisé (Ohlmann et al., 2013).

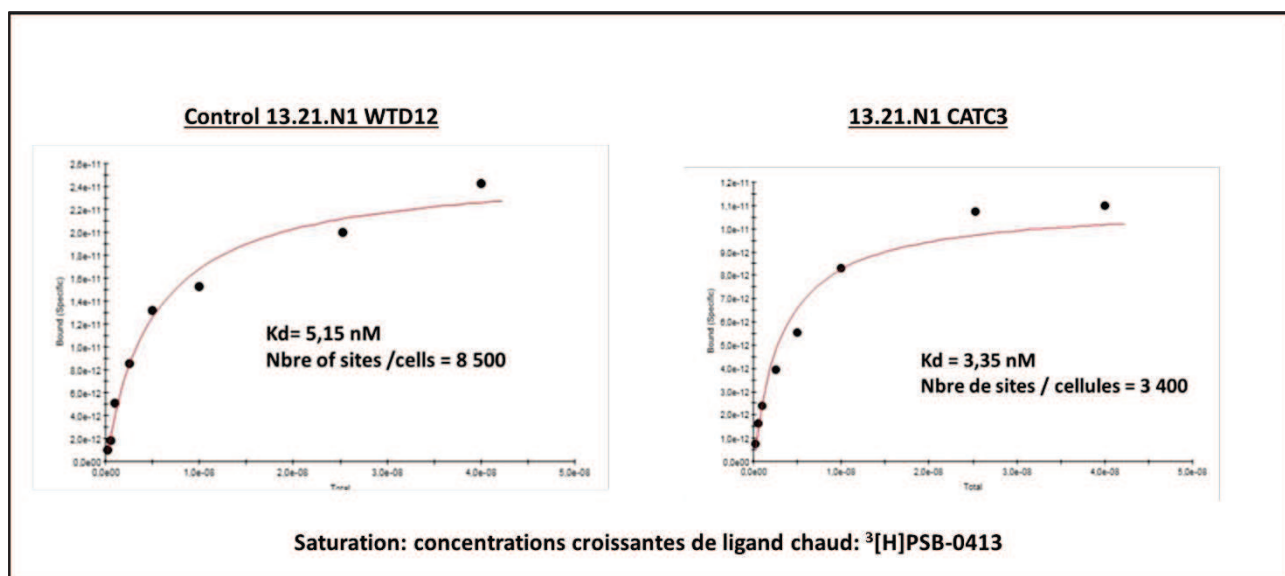


Figure 26 : *Expérience de saturation effectuée sur des cellules 1321N1 transfectées avec le récepteur P2Y₁₂ sauvage (à gauche) et sur des cellules 1321N1 transfectées avec le récepteur muté (à droite)*
Les expériences ont été réalisées en présence d'une concentration fixe d'ADP (1 mM) et de concentrations croissantes de [3H]PSB-0413 (0,4 nM à 80 nM). Ces tests montrent que les cellules transfectées avec le récepteur sauvage (WTD12) ou avec le récepteur muté (CATC3) expriment bien le récepteur d'intérêt à la membrane.

Afin de confirmer les résultats obtenus sur les plaquettes des patients et montrer que la présence de la mutation c.847T>A entraîne bien une diminution d'affinité des ligands (ADP et 2MeSADP) pour le récepteur, nous avons réalisé des expériences de compétition. Les résultats obtenus sur trois expérimentations différentes confirment les données obtenues sur les plaquettes fraîches du patient III-1. En effet, on note une diminution d'affinité modérée de l'ADP pour le récepteur comme le montre l'augmentation du K_i obtenu sur les cellules transfectées avec le récepteur muté ($K_i = 6,3 \mu\text{M}$) en comparaison du K_i obtenu sur les cellules transfectées avec le récepteur sauvage ($K_i = 2,3 \mu\text{M}$). Cette différence est bien plus marquée pour le 2MeSADP puisqu'elle est de 10000 fois. (Figure 27). L'affinité du 2MeSADP pour le récepteur muté semble donc bien inférieure à son affinité pour le récepteur sauvage. Les raisons précises des différences observées entre les plaquettes et les cellules transfectées ne sont cependant pas tout à fait comprises et peuvent être liées à des différences d'environnement membranaire et de protéines associées.

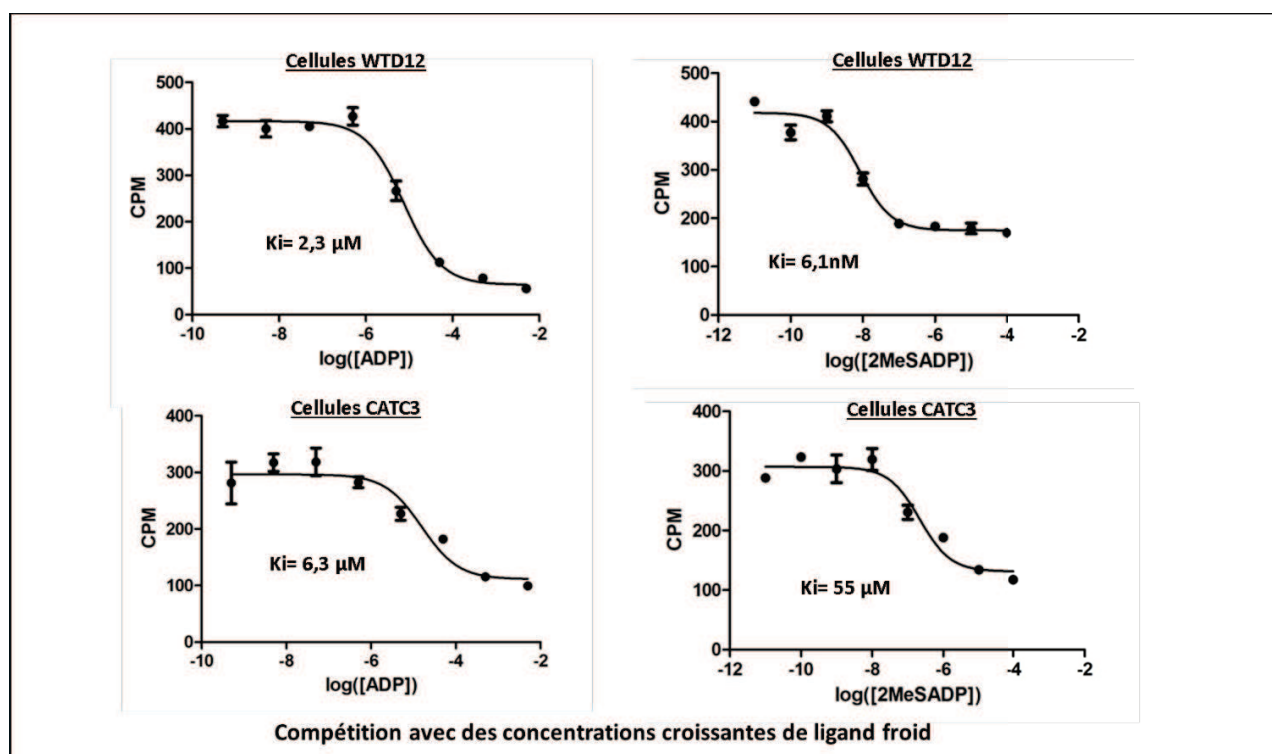


Figure 27 : Expérience de compétition entre une concentration fixe de [^3H]PSB-0413 (20 nM) et des concentrations croissantes d'ADP (à gauche) ou de 2MeSADP (à droite) ($N=3$)
 Les coefficients d'inhibition mesurés reflètent l'affinité du récepteur pour chaque ligand. Pour l'ADP et le 2MeSADP, on note une diminution d'affinité du récepteur pour le ligand étudié lors des expériences réalisées sur les cellules 1321N1 transfectées avec le récepteur muté (Cellules CATC3, en bas) en comparaison des cellules 1321N1 transfectées avec le récepteur sauvage (Cellules WTD12 en haut).

Pour compléter les investigations, nous avons souhaité vérifier l'effet de la mutation sur la transduction du signal en aval du récepteur. Nous avons donc réalisé une étude de l'inhibition de la synthèse d'AMPC dans les cellules transfectées après activation de l'adénylate cyclase par la forskoline puis inhibition de celle-ci en stimulant les cellules par l'ADP en présence ou en absence d'un antagoniste sélectif du récepteur P2Y_{12} : l'AR-C69931MX.

Les résultats présentés dans la figure 28 confirment l'absence de transduction du signal en aval du récepteur muté après action de l'ADP. En effet, l'inhibition de synthèse d'AMPC observée sur les cellules exprimant le récepteur sauvage et son blocage par l'antagoniste sélectif ne sont pas retrouvés sur les cellules portant le récepteur muté.

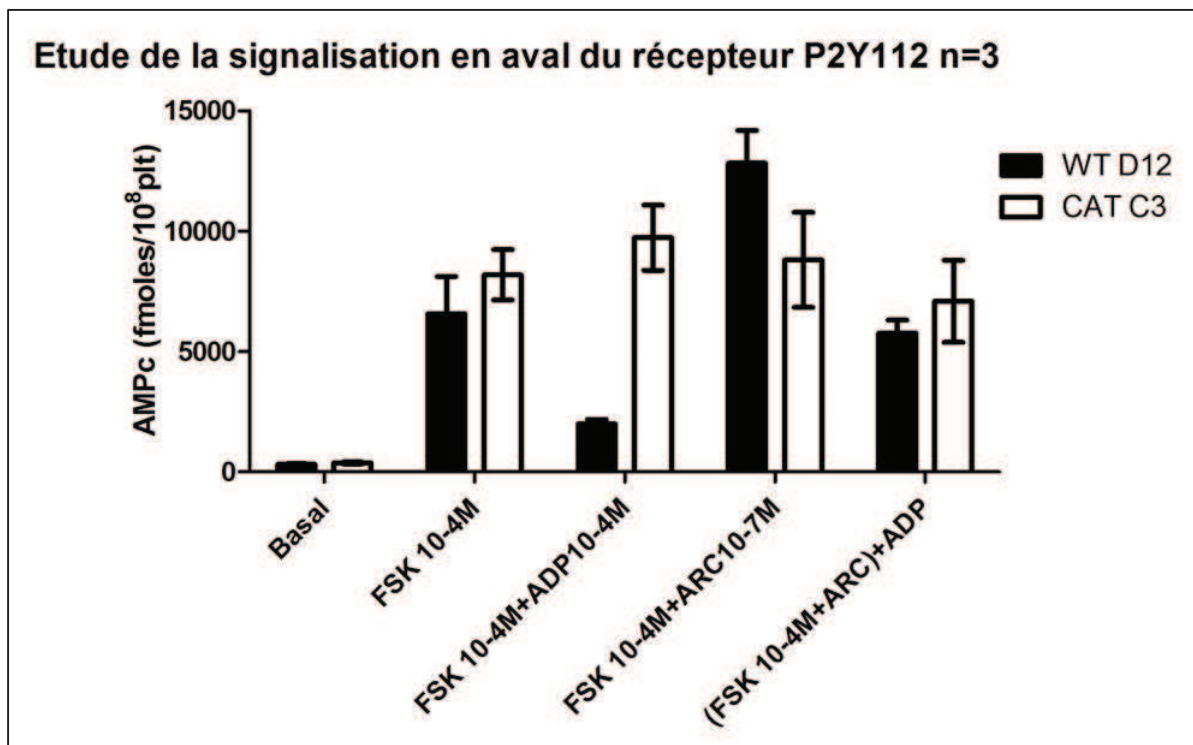


Figure 28 : Quantification de l'AMPc en radioimmunologie sur des cellules 1321N1 WTD12 transfectées avec le récepteur P2Y₁₂ sauvage (noir) et sur des cellules 1321N1 CATC3 transfectées avec le récepteur P2Y₁₂ muté (blanc)

En présence de forskoline, on remarque une augmentation de l'AMPc dans les deux types de cellules. Après stimulation des cellules par l'ADP, la quantité d'AMPc s'effondre uniquement dans les cellules transfectées avec le récepteur sauvage. En présence d'un inhibiteur du récepteur P2Y₁₂ (AR-C69931MX) et après stimulation par l'ADP, on retrouve sur les deux types cellulaires une concentration d'AMPc équivalente à la condition forskoline seule. Pour chaque condition, le dosage de l'AMPc en radioimmunologie a été réalisé à l'aide du kit commercial : cAMP [¹²⁵I] RIA KIT (Institute of isotope, Budapest, Hongrie) selon les recommandations du fabricant.

2.5.1.3 Etude de la mutation p.His187Gln : conclusion

Nous avons donc mis en évidence la présence d'une mutation homozygote du récepteur P2Y₁₂ qui entraîne chez les patients un syndrome hémorragique modéré caractérisé de manière biologique par une diminution très importante de l'amplitude des agrégations induites par l'ADP à toutes les concentrations testées. Cette mutation diminue fortement les capacités de liaison des ligands testés (ADP et 2MeSADP surtout) au récepteur muté et entraîne une absence de transduction du signal en aval du récepteur après stimulation de celui-ci par son ligand naturel : l'ADP. Ces résultats obtenus à la fois sur les plaquettes du patient III-1 et sur des cellules 1321N1 transfectées avec le récepteur muté suggèrent également un rôle de l'histidine 187 dans le changement de conformation nécessaire à l'activation de la protéine Gi associée au récepteur. Les données obtenues au cours de la reproduction de la mutation dans les cellules 1321N1 font l'objet d'un manuscrit en cours de rédaction.

2.5.2 Mutation p.Tyr259Cys du récepteur P2Y₁₂

2.5.2.1 Etude plaquettaire chez le propositus : patient CJP

Nous avons étudié au laboratoire le cas d'un patient de 37 ans ayant présenté un syndrome hémorragique modéré d'apparition récente caractérisé par la survenue récidivante et spontanée d'un hématome du gros orteil. Ce propositus (CJP) rapporte également au cours de sa vie l'apparition fréquente d'épistaxis qui n'ont cependant jamais motivé de prise en charge particulière. Lors de l'exploration biologique, la numération plaquettaire (358 000 plt/ μ L, VPM= 8.7 fL) et l'observation du frottis sanguin coloré au MGG étaient sans anomalie particulière. Le bilan de coagulation et l'exploration du facteur Willebrand étaient également dans les valeurs normales. Le temps d'occlusion plaquettaire réalisé sur PFA-100 était sans anomalie après utilisation des cartouches ADP et adrénaline. Le temps de saignement réalisé avec la technique Ivy était cependant allongé à 15 minutes (valeur normale inférieure à 8 min).

Les agrégations plaquettaires réalisées en PRPc chez ce patient mettent en évidence une diminution importante de l'amplitude d'agrégation avec présence de désagrégation en cas de stimulation des plaquettes par l'ADP quelle que soit la concentration d'agoniste utilisée. Les agrégations induites par les autres inducteurs étaient sans anomalie. Les agrégations réalisées en plaquettes lavées montrent également une diminution très importante de l'amplitude d'agrégation chez le patient après stimulation par l'ADP aux concentrations de 5, 10 et 20 μ M (Figure 29).

En l'absence de plaquettes fraîches en quantité suffisante pour réaliser une étude de l'AMPc, les résultats des tests d'agrégation obtenus chez ce patient ont motivé le séquençage du gène *P2RY12*. Le séquençage du gène nous a permis de mettre en évidence la présence d'une mutation hétérozygote c.1076A>G actuellement non décrite dans les bases de données internationales telles que ENSEMBL ou PUBMED. Cette mutation faux-sens entraîne la substitution de la tyrosine 259 par une cystéine (p.Tyr259Cys) (Figure 20). D'après les études cristallographiques effectuées récemment par Zhang et al (Zhang et al., 2014a), cette tyrosine serait un des résidus indispensables à la stabilisation de la liaison des groupements phosphates au cours de l'activation du récepteur P2Y₁₂ par ses agonistes tels que l'ADP et le 2MeSADP. Nous avons donc réalisé lors d'une deuxième consultation du patient, une quantification du récepteur P2Y₁₂ à la surface des plaquettes à l'aide des expériences de saturation détaillées en annexe 2. Les données obtenues mettent en évidence une diminution d'environ 50% du nombre de récepteurs à la surface des plaquettes du patient CJP (282 récepteurs par plaquette) en comparaison des plaquettes témoin (573 récepteurs par plaquette). (Figure 30)

Comme le montrent les K_d obtenus, aucune différence d'affinité du radioligand pour le récepteur n'a pu être mise en évidence entre les plaquettes du patient et les plaquettes témoin. Ces données suggèrent que la mutation p.Tyr259Cys entraîne soit une absence d'expression du récepteur muté à la membrane cellulaire, soit une incapacité du récepteur muté à lier le [³H]PSB-0413 utilisé dans cette expérience. Dans les deux cas, il semble

logique qu'une mutation hétérozygote entraîne une expression résiduelle du récepteur d'environ 50% en comparaison de plaquettes témoin

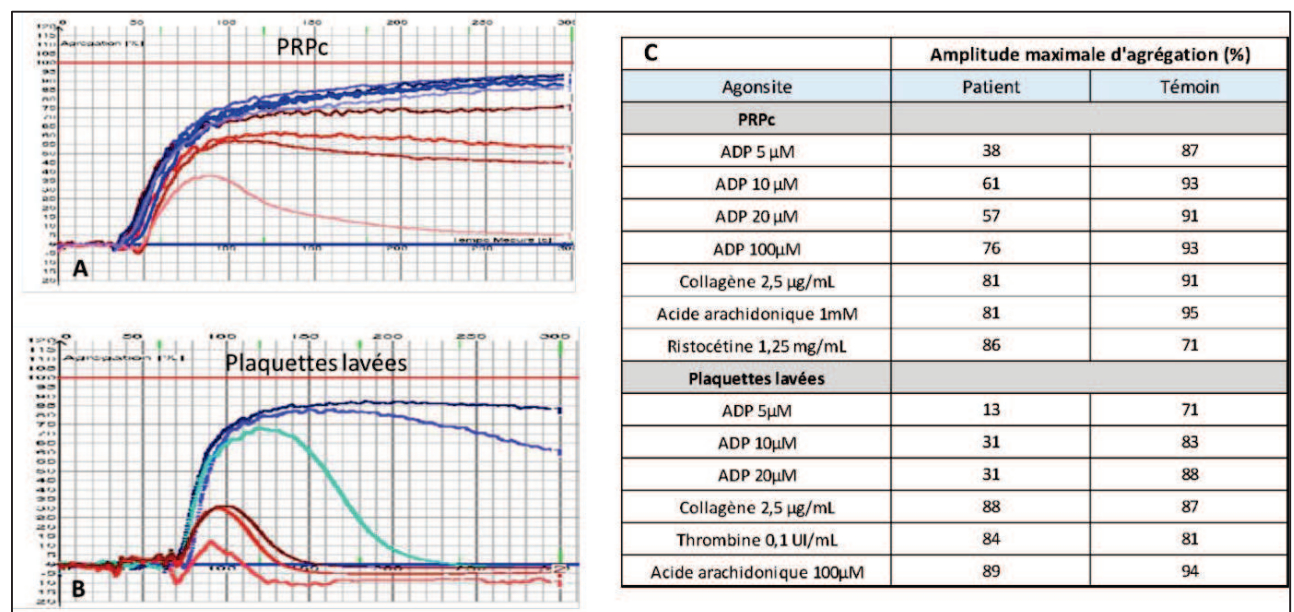


Figure 29 : Agrégations plaquettaires réalisées chez le patient CJP et chez un témoin du jour
 A : agrégations plaquettaires réalisées en PRPc après stimulation par l'ADP (5, 10, 20 et 100 μ M) chez le patient CJP (courbes rouges) et un témoin du jour (courbes bleues). B : agrégations plaquettaires réalisées en plaquettes lavées après stimulation par l'ADP (5, 10 et 20 μ M) chez le patient CJP (courbes rouges) et un témoin du jour (courbes bleues). C : amplitudes maximales d'agrégation obtenues après stimulation des plaquettes du patient CJP ou du témoin du jour par l'ADP, le collagène, l'acide arachidonique, la ristocétine et la thrombine.

En présence d'une population hétérogène de récepteurs (50% muté, 50% sauvage), ou en l'absence de récepteur muté exprimé à la membrane, les tests de déplacement effectués lors de la caractérisation de la mutation p.His187Gln sont plus difficiles à interpréter. En effet, si nous sommes en présence d'un déficit d'expression, les expériences de déplacement évalueraient uniquement le récepteur sauvage issu de l'allèle normal. Si nous sommes en présence d'une population hétérogène, le [3 H]PSB-0413 se lierait avec une affinité différente aux deux populations de récepteurs. Dans ce dernier cas, un coefficient de Hill (n_H , classiquement égal à 1 dans les expériences de liaison en présence d'une seule population de sites liant le ligand, voir annexe 2) proche de deux confirmerait l'hypothèse d'une double population de récepteurs.

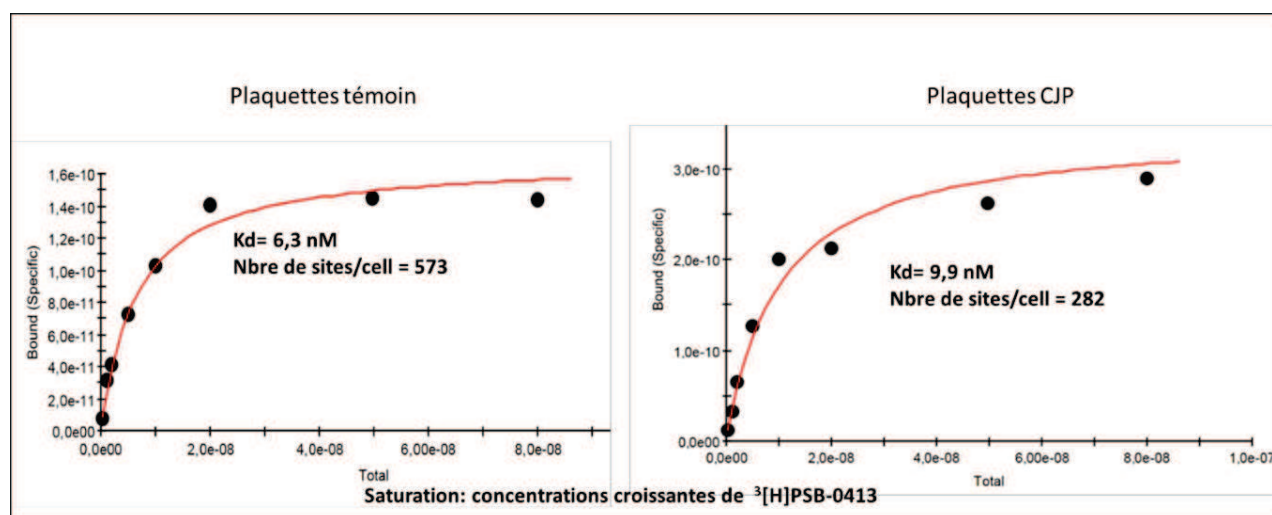


Figure 30 : Expérience de saturation effectuée sur des plaquettes témoin (à gauche) et sur des plaquettes de CJP (à droite)

Les expériences ont été réalisées en présence d'une concentration fixe d'ADP (1 mM) et de concentrations croissantes de ^3H PSB-0413 (0,4 nM à 80 nM). On note une diminution d'environ 50% du nombre de récepteurs à la surface des plaquettes du patient en comparaison du témoin du jour.

Nous avons par la suite poursuivi la caractérisation des plaquettes du patient en étudiant la signalisation en aval du récepteur. Nous avons réalisé des tests VASP ainsi qu'une étude de la synthèse d'AMPc selon les protocoles décrits dans le chapitre précédent. Le test VASP réalisé à deux reprises ne montre aucune anomalie particulière. En effet, l'indice de réactivité plaquettaire mesuré n'est pas perturbé et est supérieur à 80%. Ce résultat suggère donc que la mutation présente à l'état hétérozygote est incapable de perturber significativement la modification de la phosphorylation de la protéine VASP après stimulation des plaquettes par l'ADP. Afin de mettre en évidence une anomalie modérée de transduction du signal, nous avons par ailleurs réalisé une quantification de l'AMPc après stimulation des plaquettes par l'ADP à différentes concentrations (1, 2.5, 5 et 20 μM). Les résultats obtenus présentés dans la figure 31 mettent en évidence une diminution modérée de l'inhibition de l'adénylate cyclase sur les plaquettes du patient. En effet, après stimulation des plaquettes par l'ADP aux concentrations de 1, 2.5 et 5 μM , on note une réduction de l'inhibition de synthèse de l'AMPc d'environ 30%. Cette différence avec les plaquettes témoin semble plus modérée après stimulation des plaquettes par de l'ADP à plus forte concentration (20 μM). Dans tous les cas, l'ajout d'un antagoniste du récepteur P2Y_{12} (AR-C69931MX) restaure le taux basal élevé d'AMPc obtenue en stimulant sa production par la PGE_1 seule (Figure 31).

L'ensemble de ces résultats suggère que la mutation p.Tyr259Cys présente à l'état hétérozygote limite la transduction du signal en aval du récepteur P2Y_{12} de manière très modérée. Dans ce contexte, une stimulation intense du récepteur P2Y_{12} avec de fortes concentrations d'ADP ne permet pas de mettre en évidence une anomalie de signalisation en aval du récepteur avec les méthodes classiquement utilisées.

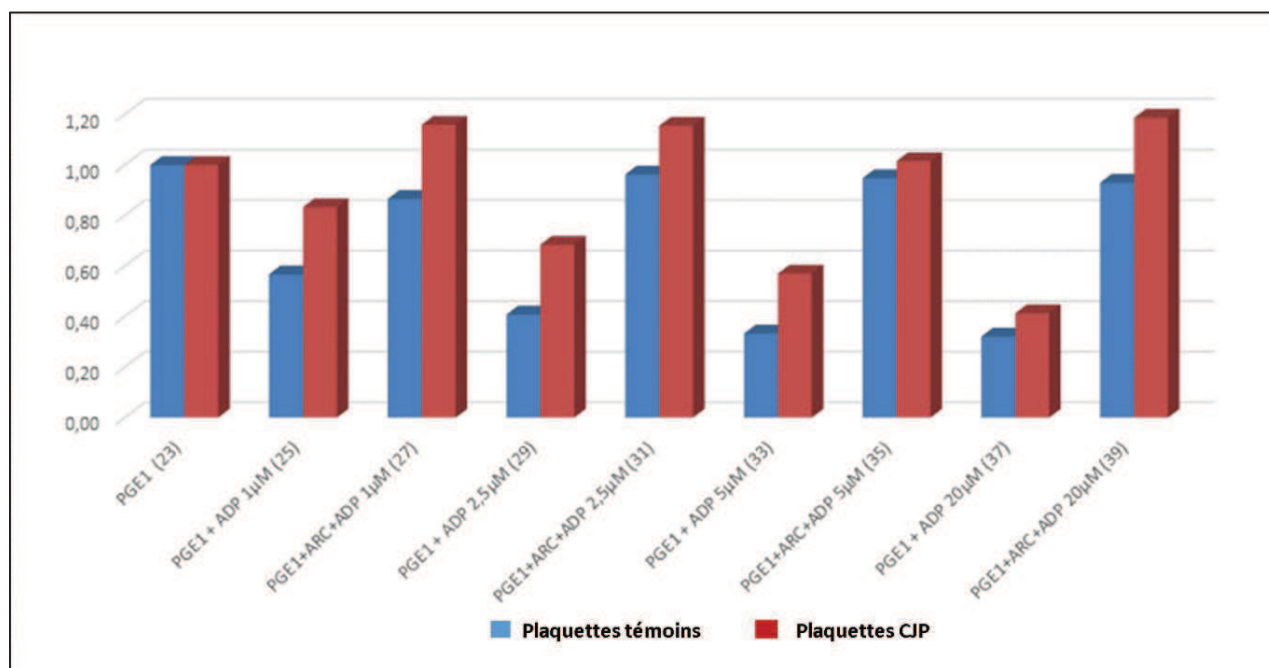


Figure 31 : Quantification de l'AMPc dans les plaquettes du patient (en rouge) et dans les plaquettes témoins (en bleu)

Les résultats sont exprimés sous la forme d'un ratio : AMPc dans les plaquettes stimulées(en présence de PGE₁ + ADP +/- AR-C69931MX)/ AMPc dans les plaquettes inhibées (PGE₁ uniquement).

2.5.2.2 Reproduction de la mutation p.Tyr259Cys dans un modèle cellulaire adapté : cellules 1321N1

Nous avons par la suite tenté de reproduire la mutation dans le modèle cellulaire 1321N1 décrit dans le chapitre précédent. La technique de transfection nous a permis d'obtenir des clones transfectés où l'ARNm du récepteur P2Y₁₂ est exprimé de manière stable. Cependant, comme nous pouvions nous y attendre d'après les expériences de saturation réalisées sur les plaquettes du patient, les techniques de saturation utilisant le [³H]PSB-0413 ne nous ont pas permis à ce jour de quantifier précisément l'expression du récepteur muté à la surface des cellules. Nous travaillons à une autre approche par la transfection de récepteur marqué à l'aide d'une séquence dite « tag » telle que celle de l'hémagglutinine du virus de la grippe (HA) contre laquelle des anticorps monoclonaux commerciaux validés peuvent se fixer pour permettre de repérer les récepteurs transfectés. En effet, l'ajout de cette séquence HA dans la partie extracellulaire du récepteur permettrait de vérifier en cytométrie en flux ou en immunofluorescence l'expression membranaire du récepteur muté ou, à l'inverse, son absence ou sa séquestration dans un compartiment cytoplasmique.

2.5.2.3 Etude de la mutation p.Tyr259Cys : conclusion

Nous avons mis en évidence chez un patient présentant un syndrome hémorragique modéré la mutation *p.Tyr259Cys* affectant un résidu essentiel pour la stabilisation de liaison du groupement phosphate des ligands du récepteur P2Y₁₂. Cette mutation présente à l'état hétérozygote entraîne une diminution du nombre de sites de liaison du [³H]PSB-0413 d'environ 50% sur les plaquettes du patient. La diminution du nombre de site de liaison à cet antagoniste peut être due à une absence de récepteur muté exprimé à la surface des cellules ou à une incapacité de l'antagoniste à se lier au récepteur. La poursuite de l'étude passera par la transfection de récepteur comportant un tag HA dans la partie N-terminale de la protéine et permettra de conclure sur l'origine de la diminution du nombre de site de liaison du [³H]PSB-0413 à la surface des plaquettes du patient et confirmer l'implication de cette anomalie sur les capacités du récepteur muté à inhiber de l'adénylate cyclase.

2.5.3 Mutation p.Phe95Ser du récepteur P2Y₁₂

Nous avons mis en évidence au laboratoire une troisième mutation du récepteur P2Y₁₂ présente à l'état hétérozygote chez une jeune fille suisse de 17 ans (KC) ayant consulté suite à l'apparition d'hématomes spontanés. Les signes cliniques comportaient des gingivorragies fréquentes, des hématomes post-traumatiques très importants, quelques hématomes spontanés ainsi que des menstruations anormalement longues et abondantes. L'exploration réalisée au laboratoire montrait une numération plaquettaire sans anomalie (288000 plt/ μ L), avec présence d'une anisocytose plaquettaire modérée (VPM non évaluable par l'automate) sans plaquette géante. L'analyse morphologique des plaquettes effectuée en microscopie électronique à transmission a confirmé d'ailleurs la présence de grosses plaquettes de forme atypique sans anomalie de répartition des granules. La numération globulaire mettait en évidence une anémie modérée microcytaire en faveur d'un trait thalassémique transmis par la mère de la jeune femme. Le temps d'occlusion plaquettaire était allongé pour les cartouches ADP (141s) et adrénaline (288s). Les tests d'agrégation plaquettaire réalisés en PRPc ont mis en évidence une diminution d'amplitude d'agrégation induite par l'ADP uniquement à la concentration de 5 μ M qui se normalisait aux concentrations supérieures (10 et 20 μ M). Les agrégations effectuées en plaquettes lavées ont mis en évidence une anomalie d'agrégation après stimulation par l'ADP à toutes les concentrations testées (5, 10, 20 et 100 μ M) (figure 32).

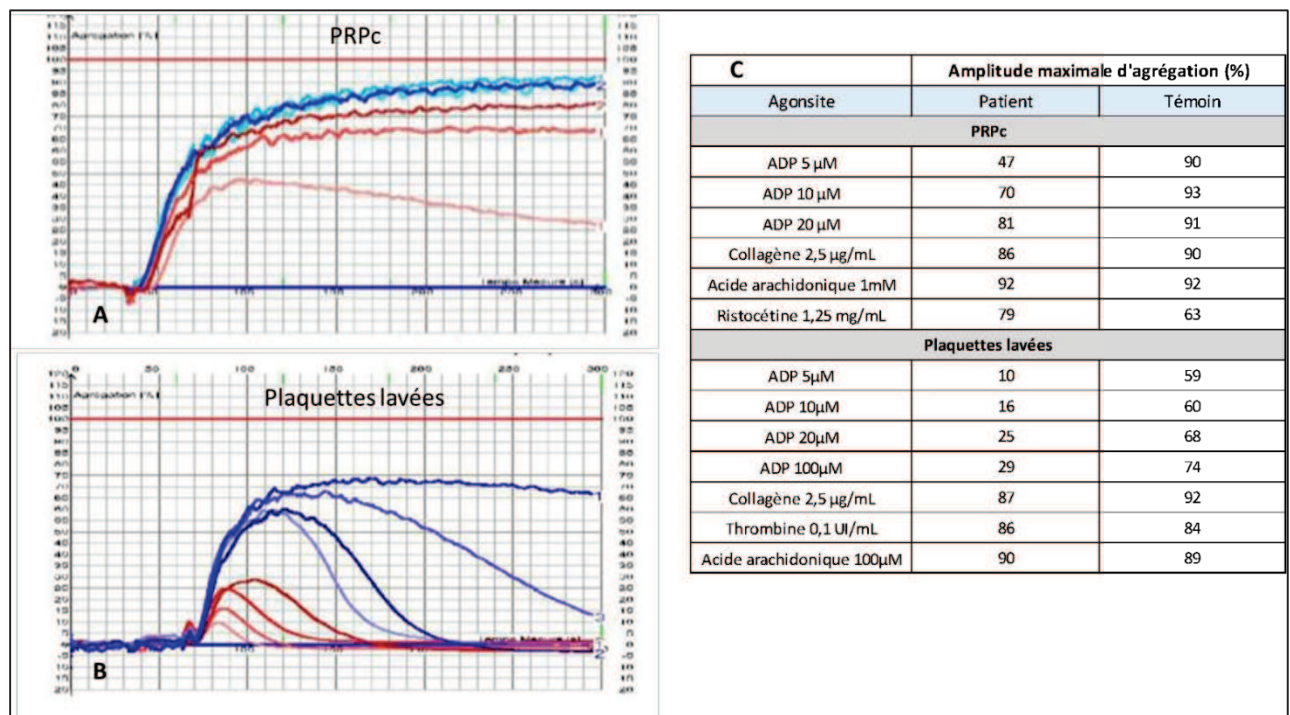


Figure 32 : Agrégations plaquettaires réalisées chez la patiente KC et chez un témoin du jour
 A : agrégations plaquettaires réalisées en PRPc après stimulation par l'ADP (5, 10 et 20 μ M) chez la patiente KC (courbes rouges) et un témoin du jour (courbes bleues). B : agrégations plaquettaires réalisées en plaquettes lavées après stimulation par l'ADP (5, 10, 20 et 100 μ M) chez la patiente KC (courbes rouges) et un témoin du jour (courbes bleues). C : présentation des amplitudes maximales d'agrégation obtenues après stimulation des plaquettes de la patiente KC ou du témoin du jour par l'ADP, le collagène, l'acide arachidonique, la ristocétine et la thrombine.

La mère de la patiente (KT) également explorée ne présentait aucune anomalie plaquettaire particulière ni d'allongement du temps d'occlusion. Par contre, la même anomalie d'agrégation a été mise en évidence chez le père de KC (KM) lors des épreuves d'agrégation réalisées en plaquettes lavées : une diminution très importante de l'amplitude des agrégations induites par l'ADP à toutes les concentrations testées. La patiente a par ailleurs deux frères non explorés au laboratoire qui ne rapportent aucune diathèse hémorragique. Nous avons été informés récemment qu'un de ces deux frères a développé une leucémie aiguë lymphoblastique B (LAL B).

Devant les anomalies d'agrégation observées, nous avons par la suite quantifié les récepteurs P2Y₁₂ présents à la surface des plaquettes chez la patiente (KC) et chez ses parents (KM et KT). Les résultats obtenus montrent une diminution modérée du nombre de sites capables de lier le [³H]PSB-0413 à la surface des plaquettes de la patiente KC (57% du témoin du jour) ainsi que chez son père KM (71% du témoin du jour) (Figure 33). Ce déficit peut paraître extrêmement modéré en comparaison du témoin du jour, mais il est important de noter que ce témoin comportait un nombre de récepteurs P2Y₁₂ (380 sites) à la limite inférieure des valeurs normales

(425 +/- 50 sites par plaquettes). Par ailleurs, aucune diminution d'affinité du radioligand pour les récepteurs présents n'a pu être mise en évidence au cours de ces expérimentations.

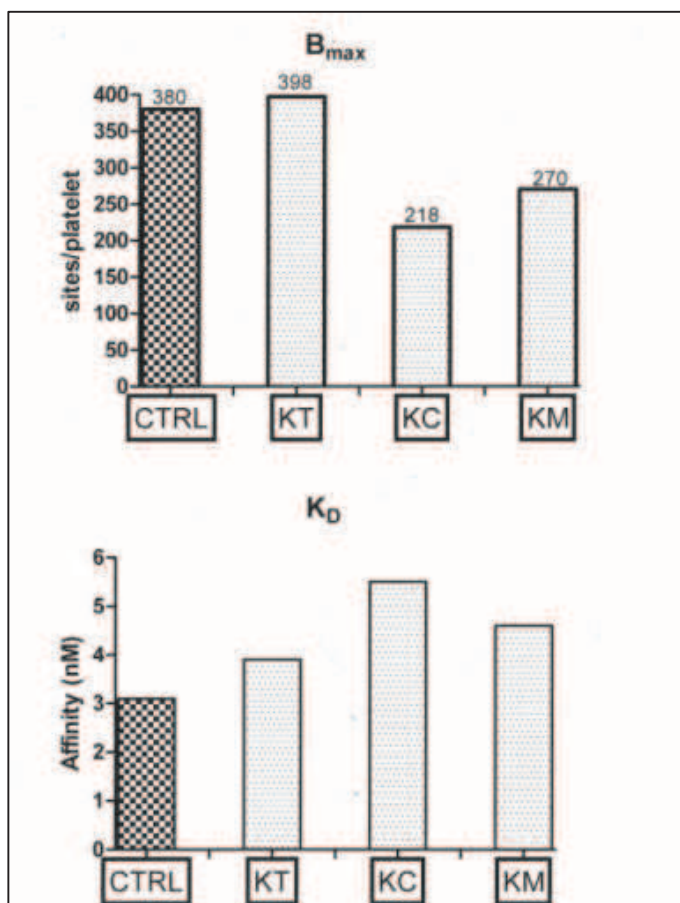


Figure 33 : Evaluation de l'affinité [3H]PSB-0413 pour le récepteur $P2Y_{12}$ du quantification des récepteurs plaquettaires chez la patiente KC, son père KM et sa mère KT

Les expériences de saturation ont été réalisées en présence d'une concentration fixe d'ADP (1 mM) et de concentrations croissantes de [3H]PSB-0413 (0,4 nM à 80 nM). On note une diminution d'environ 50% du nombre de récepteurs à la surface des plaquettes de la patiente en comparaison du témoin du jour.

L'évaluation de la signalisation en aval a été réalisée uniquement à l'aide des tests VASP mais les indices de réactivité plaquettaire étaient sans anomalie chez les trois membres de la famille (VASP > 70 %).

Suite à la mise en évidence d'anomalies d'agrégation très marquées lors de l'exploration réalisée en plaquettes lavées et de la diminution modérée du nombre de sites liant le [3H]PSB-0413 chez KC et son père, nous avons séquencé le gène $P2RY12$ chez les trois membres de la famille. Une mutation hétérozygote c.584T>C a ainsi été mise en évidence uniquement chez KC et son père KM. Cette mutation faux-sens entraîne la substitution de la phénylalanine en position 95 par une sérine. Au cours de l'étude cristallographique du récepteur $P2Y_{12}$, le résidu 95 n'a pas été décrit comme étant un acide aminé indispensable à la liaison des ligands. Cependant,

cet acide aminé est presque adjacent à la cystéine 97 et l'arginine 93. La cystéine 97 a été précédemment étudiée pour son rôle indispensable pour l'action anti-agrégante des thienopyridines et en particulier du clopidogrel (Savi et al., 2006) (Savi et al., 2000) alors que l'arginine 93 fait partie des acides aminés impliqués dans la stabilisation de liaison du groupement phosphate des agonistes nucléotidiques (Zhang et al., 2014a). Le [³H]PSB-0413 étant un dérivé tritié d'un analogue de l'ATP : l'AR-C767085MX, il semble plausible que la mutation de la phénylalanine 95 perturbe la liaison du radioligand au récepteur. Cette hypothèse expliquerait la diminution de 50 % du nombre de sites capables de lier le [³H]PSB-0413 en présence d'une mutation hétérozygote du résidu en position 95. Dans ce cas, l'étude de la mutation p.Phe95Ser passera obligatoirement par la reproduction de cette anomalie dans notre modèle cellulaire 1321N1 en utilisant un récepteur « étiqueté » avec la séquence HA. L'utilisation d'anticorps anti-HA permettra alors de vérifier l'adressage membranaire du récepteur et la quantification de l'AMPc après stimulation des cellules autorisera l'évaluation de transduction du signal en aval du récepteur.

Par ailleurs, les anomalies plaquettaires observées dans cette famille ne semblent pas être liées uniquement à une mutation hétérozygote du gène codant le récepteur P2Y₁₂. En effet, l'association d'une β-thalassémie (chez KT et KC), d'une macrocytose plaquettaire (KT et KC au minimum) et de l'apparition d'une LAL B chez le frère de KC (lui aussi porteur de la mutation p.Phe95Ser) suggère la présence d'autres anomalies des plaquettes. Bien que le phénotype ne soit pas complètement en faveur d'une thrombopathie XLTL, le séquençage du gène GATA-1 a été effectué chez KC. Cependant, aucune mutation n'a été mise en évidence. Dans le cas de cette famille, le séquençage d'un panel de gènes connus ou possiblement impliqués dans des pathologies plaquettaires serait un outil essentiel pour détecter ou exclure une anomalie associée à la mutation du récepteur P2Y₁₂ déjà mise en évidence.

2.6 Diagnostic et caractérisation des anomalies du récepteur P2Y₁₂ : discussion

En nous basant sur la mise en évidence de défauts majeurs d'agrégations induites par l'ADP, nous avons mis en évidence au laboratoire trois nouveaux variants du récepteur P2Y₁₂ dans trois familles différentes non apparentées. Il semble donc indispensable actuellement de réaliser un séquençage systématique du gène *P2RY12* chez les patients atteints de syndrome hémorragique modéré et porteurs de ce défaut fonctionnel isolé et facilement identifiable. En cas de mutation non décrite, il est également nécessaire de réaliser une confirmation de l'imputabilité de cette anomalie dans le déficit fonctionnel observé. En l'absence d'anticorps anti-P2Y₁₂ validés, cette caractérisation passe par la réalisation d'expériences de liaison qui permettent d'évaluer l'expression du récepteur muté ainsi que sa capacité à lier les ligands. Par ailleurs, l'utilisation de plaquettes de patient étant limitée, la reproduction des mutations dans un système cellulaire adapté est indispensable pour confirmer les anomalies de signalisation en aval du récepteur. Autant que possible et afin de ne pas perturber les propriétés fonctionnelles du récepteur, la reproduction des mutations devrait être effectuée sans modification structurale du récepteur potentiellement induite par l'ajout d'un « tag ». C'est la stratégie que nous avons adoptée pour la caractérisation de la mutation *p.His187Gln*. Les études réalisées ont permis de montrer que cette mutation entraînait une diminution d'affinité des ligands nucléotidiques (2MeSADP) pour le récepteur et qu'elle abolissait complètement la transduction du signal en aval de celui-ci. Les données obtenues sont d'ailleurs en accord avec les travaux de Zhang et al. (Zhang et al., 2014a) qui précisent que l'histidine 187 est indispensable à la stabilisation du noyau ribose dans la poche de liaison du récepteur. Cependant cette étude cristallographique ne conclut pas quant à l'implication de ce résidu dans la transduction du signal qui a été observée au cours de notre étude.

Cependant, pour certaines mutations comme celles touchant les résidus impliqués dans la stabilisation de la liaison des groupements phosphates (p.Phe95Ser et p.Tyr259Cys) les techniques de transfection devront nécessairement utiliser des récepteurs marqués par une séquence de type HA. En effet, ces mutations semblent abolir la liaison de notre radioligand spécifique du récepteur P2Y₁₂ et empêchent l'évaluation de l'expression du récepteur à la surface des cellules transfectées. L'utilisation de construction « étiquetées » permet alors de quantifier les récepteurs à la fois à la surface des cellules et dans le milieu intra-cellulaire avant d'envisager des études de signalisation. Cependant, il sera au préalable indispensable de vérifier que l'introduction de la séquence HA dans la partie N-terminale de la protéine ne perturbe ni la liaison des ligands au récepteur ni la transduction du signal en aval de celui-ci.

Enfin, la mise en évidence dans deux familles différentes de syndromes hémorragiques corrélés avec la présence de mutations hétérozygotes du récepteur P2Y₁₂ (p.Phe95Ser et p.Tyr259Cys) repose la question du mode de transmission de ce type de thrombopathie. En effet, les anomalies du récepteur P2Y₁₂ sont considérées comme des thrombopathies à transmission autosomique récessive. Cependant, les données obtenues au

laboratoire montrent que la pathologie peut s'exprimer dès la présence d'une mutation à l'état hétérozygote. Cette hypothèse est confortée par les travaux que M. Cattaneo avait effectués dès 1997. Il avait entre autre montré que les patients porteurs d'un déficit modéré de liaison du 2MeSADP (identifié plus tard comme étant des porteurs de mutations hétérozygotes du récepteur P2Y₁₂), étaient également caractérisés par un déficit de sécrétion (Cattaneo et al., 1997). Par ailleurs, dans un contexte où au moins 50% des thrombopathies restent non diagnostiquées ou non étiquetées, il n'est pas exclu que les patients porteurs d'une mutation hétérozygote du récepteur P2Y₁₂ et rapportant une diathèse hémorragique soient également porteurs d'une autre anomalie de l'hémostase primaire voire de la coagulation. Cependant, en l'absence de dépistage systématique de ces pathologies, la présence de mutation hétérozygote du gène *P2RY12* doit être considérée au cours de la prise en charge de ces patients. En particulier, il est indispensable de réduire au maximum les facteurs de risques thérapeutiques qui pourraient entraîner une majoration du syndrome hémorragique. L'utilisation des antiagrégants plaquettaires et des anti-inflammatoires non stéroïdiens doit particulièrement être contrôlée. Pour exemple, nous avons eu la possibilité d'étudier au laboratoire le patient CJP après une prise d'aspirine. Les agrégations plaquettaires réalisées en PRPc étaient quasi nulles après stimulation par l'ADP, le collagène et l'acide arachidonique ce qui confirme la très faible capacité d'activation des plaquettes dans une telle situation. En situation traumatique, un tel phénotype plaquettaire aurait probablement conduit à une hémorragie. Dans ce contexte, le dépistage des patients porteurs d'une mutation hétérozygote est indispensable. Il permet de pouvoir sensibiliser les patients sur la conduite à tenir en cas d'hémorragie, de prévenir les cliniciens en cas d'intervention chirurgicale programmée ou urgente, et de limiter la prise de médicaments risquant de potentialiser le syndrome hémorragique.

3 Recherche des gènes impliqués dans les maladies du pool vide non syndromiques (δ -SPD)

3.1 Définition des δ -SPD et stratégie diagnostique

Les maladies du pool vide liées aux granules denses correspondent à un groupe de thrombopathies hétérogènes caractérisé par un déficit quantitatif ou qualitatif en ces granules. Quel que soit le type d'anomalie, ces entités sont identifiables par un déficit fonctionnel plaquettaire lié à la diminution de la sécrétion des petites molécules présentes dans les granules δ . En particulier, la diminution de sécrétion d'ADP entraîne une réduction de l'amplification de l'activation plaquettaire dépendante du récepteur P2Y₁₂. Bien qu'environ 25% des patients atteints de δ -SPD ne présentent pas d'anomalie lors des tests d'agrégation plaquettaire (Nieuwenhuis et al., 1987), le profil d'agrégation classiquement observé en PRPc chez les patients met en évidence :

- une absence de deuxième vague d'agrégation lors de la stimulation des plaquettes par l'ADP (5 μ M).
- une absence ou une diminution de l'amplitude d'agrégation associée à un allongement du temps de latence après stimulation des plaquettes par le collagène et en particulier quand une faible concentration est utilisée (1.25 μ g/mL) (Ingerman et al., 1978).
- des agrégations induites par l'acide arachidonique normales ou d'amplitude diminuée en fonction de l'intensité du déficit en ADP (Michelson, 2013) (Chapter 50).

En plaquettes lavées, les anomalies observées en PRPc après stimulation des plaquettes par l'ADP ne sont pas retrouvées. En effet, l'ADP n'entraîne ni la dégranulation des plaquettes ni la génération de TXA₂ en présence de calcium à la concentration de 2 mM (Kinlough-Rathbone et al., 1977) (Cazenave et al., 2004) et l'agrégation est par définition réversible. Par contre, les anomalies d'agrégation induites par le collagène (1.25 μ g/mL) sont classiquement présentes. Le diagnostic repose alors sur la mise en évidence d'une diminution de la quantité des petites molécules (ADP et/ou sérotonine) contenues normalement dans ces granules, associée ou non à une absence de granule δ en microscopie électronique. Enfin, l'étude de la sécrétion permet de compléter la caractérisation du défaut fonctionnel observé en agrégation et éventuellement mettre en évidence une anomalie des capacités sécrétoires des plaquettes sans déficit granulaire proprement dit. Les explorations de la sécrétion passent alors par l'étude de l'incorporation et de la sécrétion de sérotonine radiomarquée ou par l'étude de la sécrétion d'ATP en lumi-agrégométrie.

3.2 La découverte des δ -SPD

Le syndrome d'Hermansky-Pudlak, qui associe un déficit quantitatif en granules denses (White and Gerrard, 1976) à un déficit immunitaire et à un albinisme oculo-cutané a été la première entité à être décrite dès 1959 (Hermansky and Pudlak, 1959).

Par la suite, la mise en évidence en 1969 par Holm Holmsen (Holmsen et al., 1969) de deux pools distincts de nucléotides plaquettaires ayant des fonctions différentes (un pool impliqué dans le métabolisme plaquettaire et un pool sécrété impliqué dans l'agrégation plaquettaire) permit l'identification d'une deuxième entité de δ -SPD. En effet, les déficits dans le pool de nucléotides sécrétés furent rapidement corrélés à l'existence de δ -SPD sans présentation syndromique c'est à dire à minima sans albinisme oculo-cutané associé. Les entités non syndromiques sont caractérisées par des anomalies plaquettaires isolées liées à un déficit en ADP ainsi qu'à un déficit en sérotonine retrouvé de manière inconstante (Holmsen and Weiss, 1972). La description d'un troisième type de δ -SPD identifiable grâce à un déficit en ADP et en sérotonine sans absence de granules denses (White et al., 1975) complexifie encore la description historique de ces pathologies.

La classification proposée à l'époque qui différenciait les formes syndromiques des formes non syndromiques a relativement peu évolué aujourd'hui. Les formes syndromiques sont aisément identifiables cliniquement en raison de la présence d'un albinisme oculo-cutané et de déficits immunitaires associés à la thrombopathie. L'étude des patients atteints de syndromes d'Hermansky-Pudlak ou de maladie de Chediak-Higashi a d'ailleurs conduit à l'identification des gènes responsables de ces pathologies. A l'inverse, les formes non syndromiques dont le diagnostic reste actuellement difficile, regroupent des pathologies hétérogènes qui peuvent associer ou non une absence de granules denses, un déficit en ADP, un déficit en sérotonine voire des anomalies de sécrétion. A ce jour, l'origine génétique de ces thrombopathies non syndromiques reste inconnue.

3.3 Biogénèse et sécrétion des granules denses plaquettaires

3.3.1 Biogénèse des granules denses

A l'inverse des granules α dont l'origine est essentiellement liée à l'appareil de Golgi des mégacaryocytes, les granules denses plaquettaires semblent trouver leur origine plutôt dans le système endosomal de leur précurseur médullaire (Michelson, 2013) Chapter 18). Les travaux réalisés chez les patients atteints de syndrome d'Hermansky-Pudlak ont mis en évidence des anomalies au niveau des complexes protéiques BLOCs (Biogenesis of lysosome-related organelle complexes) et AP-3 (Adaptator protéin 3) impliqués dans la biogénèse des organelles dérivées des lysosomes. Trois complexes BLOC ont ainsi été identifiés : BLOC-1, BLOC-2 et BLOC-3. Le complexe BLOC-1 est composé d'au moins huit protéines : Cappucino, Muted, Dysbindin, Snapin, BLOS-1, BLOS-2, BLOS-3 et la pallidine (Starcevic and Dell'Angelica, 2004). Cette

dernière est connue pour interagir avec la syntaxine 13 (Huang et al., 1999), un t-SNARE (Soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment protein Receptor) essentiel à la fusion des membranes au cours du processus d'exocytose. Le complexe BLOC-2 est formé de trois protéines (HPS3, 5 et 6) et participerait au transport et à la maturation des organelles en formation en coopération avec les GTPases RAB32 et RAB38 (Bultema et al., 2012). Le complexe BLOC-3 est lui composé de deux protéines (HPS1 et 4) et interagirait également avec les GTPases RAB32 et RAB38 en tant que facteur d'échange du GDP (Gerondopoulos et al., 2012). Par ailleurs, les travaux de Ambrosio et al (Ambrosio et al., 2012) effectués sur une lignée mégacaryocytaire (MEG-01) suggèrent que le complexe AP-3 permet l'orientation de structures dérivées des endosomes tardifs et exprimant les transporteurs VMAT2 et MRP4 vers un compartiment tubulaire dédié à la maturation des granules denses. Les études effectuées par cette équipe ont également confirmé le rôle des GTPases RAB32 et RAB38 dans la maturation des granules. Bien que les mécanismes exacts soient encore inconnus, ces travaux récents permettent petit à petit une identification des différents acteurs impliqués dans de la biogénèse et la maturation des granules δ .

De la même manière, les processus de chargement des petites molécules fortement concentrées dans ces organelles sont également largement débattus. La sérotonine circulante, produite par les cellules entérochromaffines de l'intestin est rapidement captée par les plaquettes sanguines via le récepteur membranaire SERT puis incorporée dans les granules δ plaquettaires grâce au transporteur VMAT2 (Carneiro et al., 2008). Par contre, les mécanismes conduisant à la concentration du calcium dans les granules δ ne sont pas connus. Enfin, le transporteur MRP4 a récemment été décrit comme étant présent sur la membrane des granules δ et est supposé participer au transport des nucléotides vers l'intérieur de ces organelles (Jedlitschky et al., 2012). Toutefois, les travaux récents de Decouture et al (Decouture et al., 2015) sur des souris déficientes pour MRP4 suggèrent plutôt que le transporteur MRP4 participe essentiellement à la séquestration de l'AMPc dans les granules δ au cours de l'activation plaquettaire.

3.3.2 Sécrétion des granules denses au cours de l'agrégation plaquettaire

Le phénomène d'exocytose nécessite la fusion des membranes granulaires et cellulaires grâce à des interactions entre des protéines de la famille des SNARE, présentes sur la membrane des granules (v-SNARE) ainsi que sur la membrane plasmique de la plaquette (t-SNARE) (Masliah-Planchon et al., 2013). Le modèle actuel propose qu'un complexe formé essentiellement de trois SNAREs (VAMP8, SNAP-23 et STX11) est nécessaire à la fusion des membranes granulaires et plasmiques (Golebiewska and Poole, 2015). Cependant, le mécanisme exact de fusion des membranes n'est pas encore complètement élucidé. En effet, de nouveaux acteurs, comme la syntaxine-8 (Golebiewska et al., 2015) ont encore récemment été identifiés comme participant aux complexes SNARE permettant l'exocytose. Enfin, le développement d'un modèle murin KO pour la protéine RAB27 et présentant un syndrome hémorragique associé à un déficit relatif en granules denses suggère que la GTPase RAB27 est aussi impliquée dans la sécrétion des granules δ (Jancic et al., 2007).

Il n'existe actuellement que peu de certitudes concernant les mécanismes moléculaires impliqués dans la physiologie des granules denses plaquettaires. Cependant, la caractérisation des patients atteints de δ -SPD (essentiellement syndromiques) a permis d'identifier certains des principaux acteurs protéiques indispensables à la formation et à la sécrétion de ces organelles. De plus, la culture des mégacaryocytes *in vitro* et l'établissement de lignées cellulaires associées autorisent dorénavant l'étude de ces protéines dont les fonctions exactes restent à ce jour souvent indéterminées.

3.4 Les différents types de maladies du pool vide

Comme nous l'avons vu précédemment, les δ -SPD peuvent être à minima divisés en deux grands types de thrombopathies : les formes syndromiques qui ne touchent pas uniquement les plaquettes, et les formes non syndromiques dont le phénotype se limite à la lignée mégacaryocytaire.

3.4.1 Les δ -SPD syndromiques

Trois pathologies ont été décrites à ce jour comme faisant partie des δ -SPD syndromiques : la maladie de Chediak-Higashi, les syndromes d'Hermansky-Pudlak et les syndromes de Griscelli.

La maladie de Chediak-Higashi est une pathologie autosomique récessive (OMIM : 214500) due à une mutation du gène *LYST* (localisé en 1q42.3) (Barbosa et al., 1996) qui conduit à des anomalies du trafic vésiculaire et à la formation de granules géants essentiellement dans les mélanocytes et les leucocytes. La fonction de la protéine *LYST* reste mal connue, mais les travaux récents de Sepulveda et al (Sepulveda et al., 2015) suggèrent que cette protéine participe à l'aiguillage correct et à l'assemblage des endosomes tardifs et des lysosomes. La pathologie associe une thrombopathie de type δ -SPD modérément hémorragique à une hypo-pigmentation de la peau et un déficit immunitaire. Elle conduit généralement au décès des patients avant l'âge de 10 ans suite au développement d'une lymphohistiocytose majeure.

Les syndromes d'Hermansky-Pudlak sont des pathologies à transmission autosomique récessive qui affectent plusieurs types d'organelles cellulaires : les mélanomes, les lysosomes et les granules denses plaquettaires. En conséquence, le phénotype syndromique observé chez les patients associe un syndrome hémorragique modéré, un albinisme occulo-cutané, une immunodéficience et parfois une fibrose pulmonaire évolutive. La thrombopathie est liée à une quasi absence de granules denses plaquettaires objectivable en microscopie électronique. Ces pathologies sont dues à des mutations des gènes codant les protéines des complexes BLOC 1, 2, 3 et AP-3 présentés dans le chapitre précédent. Au moins neuf gènes (*HPS1*, *HPS4* (Martina et al., 2003), *AP3B1* (Feng et al., 1999), *HPS3*, *HPS5*, *HPS6* (Di Pietro et al., 2004), *DTNBPI* (Li et al., 2003), *BLOC1S3* (Morgan et al., 2006), *BLOC1S6* (Cullinane et al., 2011) ont ainsi été décrits pour être impliqués dans ces syndromes et la sévérité de la maladie dépend du gène affecté. En particulier, les syndromes dus à des

mutations de *HPS1* sont considérés comme les formes les plus graves en raison de la fréquence élevée des fibroses pulmonaires associées.

Enfin, les mutations du gène codant pour la GTPase RAB27 sont responsables du syndrome de Griscelli (OMIM : 607624) (Griscelli et al., 1978). Cette pathologie à transmission autosomique récessive associe un syndrome hémorragique lié à une diminution du nombre de granules denses plaquettaires, un albinisme, une atteinte neurologique et un déficit immunitaire (Westbroek et al., 2008).

3.4.2 Les formes non syndromiques

Les δ -SPD non syndromiques sont des thrombopathies dont le phénotype hémorragique cutanéomuqueux est souvent considéré comme modéré en conditions non traumatiques. En cas d'intervention chirurgicale ou d'accident, ces patients ont pourtant un risque non négligeable de saignements importants engageant parfois le pronostic vital. En réalité, en raison des caractéristiques biologiques hétérogènes des δ -SPD non syndromiques, le diagnostic de cette pathologie reste difficile et peu standardisé (Mumford et al., 2015). C'est pourquoi la fréquence de la maladie est à ce jour inconnue mais certaines études suggèrent que les δ -SPD non syndromiques pourraient correspondre au type de thrombopathie congénitale le plus fréquent (Quiroga et al., 2007) (Mezzano et al., 2009). Les δ -SPD non syndromiques peuvent être dus à une absence ou diminution du nombre de granules δ , à une anomalie qualitative de ces organelles ou à une association de ces deux déficits. Mais dans tous les cas les mécanismes physiopathologiques et moléculaires qui conduisent à ces anomalies ne sont à ce jour pas connus. Par ailleurs, chez quelques patients, la diminution du nombre de granules δ est associée à un déficit en granules α et donne naissance à une pathologie appelée $\alpha\delta$ -SPD qui serait liée à une dégranulation des plaquettes en l'absence d'activation de celles-ci (White et al., 2007).

Selon l'expérience de notre laboratoire, la majorité des δ -SPD non syndromiques semblent due à un déficit isolé en agonistes solubles et en particulier en ADP. Dans ce cas, des transporteurs de nucléotides comme MRP4 sont actuellement suspectés d'être responsables de la pathologie. En effet, une localisation anormale de la protéine a été mise en évidence chez certains patients porteurs de δ -SPD (Jedlitschky et al., 2010). Cependant, aucune équipe n'a pu, à ce jour, mettre en évidence de mutation du gène *ABCC4* codant la protéine MRP4.

Le diagnostic de ces thrombopathies non syndromiques repose sur des anomalies fonctionnelles objectivables lors des tests d'agréations, sur la recherche d'un déficit quantitatif en granules denses en microscopie électronique et sur la mise en évidence de déficits en petites molécules contenues dans ces granules. En suivant cette méthodologie diagnostique, le laboratoire cherche actuellement à identifier des profils biologiques similaires chez des patients porteurs de la pathologie afin de rechercher des anomalies génétiques responsables des δ -SPD observés et bien caractérisés.

3.5 Recherche des gènes impliqués dans les maladies du pool vide non syndromiques avec déficit isolé en ADP

3.5.1 Exploration de la famille S et du propositus SJ

En décembre 2012, nous avons exploré au laboratoire d'hémostase spécialisé de l'EFS Alsace un jeune homme de 18 ans (SJ) suivi depuis l'enfance pour de nombreux épisodes d'épistaxis ayant parfois nécessité une cautérisation ainsi que pour l'apparition d'hématomes spontanés ou disproportionnés en cas de traumatismes minimes. Ce patient a été adressé au laboratoire à la suite d'une triple fracture du crâne compliquée d'un hématome et associée à des saignements majeurs et difficilement contrôlables. La prise en charge a nécessité une hospitalisation de six semaines ainsi que deux reprises chirurgicales complétées par de multiples transfusions plaquettaires et par des injections de concentrés de facteur VII activé (Novoseven®). Cet accident a laissé plusieurs séquelles neurologiques chez le patient : une hémiparésie, un strabisme et une fragilité psychologique qui sera par la suite traitée par antidépresseurs tricycliques. Les explorations biologiques réalisées au cours de l'épisode traumatique puis à distance de l'évènement n'ont mis en évidence aucune anomalie de la numération plaquettaire (230 000 plt/ μ L, VPM= 9.9 fL), ni d'anomalie de la coagulation (Temps de Quick, Temps de céphaline activée, exploration du facteur Willebrand dans les limites des valeurs normales).

Les tests de dépistage des anomalies de l'hémostase primaire étaient également sans particularité. Les temps d'occlusion plaquettaire n'étaient pas allongés avec les cartouches ADP et adrénaline et le temps de saignement réalisé par technique Ivy trois points durant l'enfance était inférieur à cinq minutes. La recherche d'anticorps anti-plaquettes était également négative. Les tests d'agrégation plaquettaire réalisés en PRPc plusieurs mois après l'accident ont mis en évidence une absence de deuxième vague d'agrégation après stimulation par l'ADP (2.5 et 5 μ M). Les agrégations induites par le collagène (2.5 μ g/mL), l'acide arachidonique (1mM) et la ristocétine (1.25 mg/mL) n'étaient pas perturbées (Figure 34).

Devant cette anomalie limitée, potentiellement liée à une absence de dégranulation des plaquettes après stimulation par l'ADP, un dosage des nucléotides et de la sérotonine plaquettaire a été effectué. Un déficit majeur en ADP a alors été mis en évidence chez le propositus conduisant à un rapport ATP/ADP supérieur à 5 (valeurs normales du laboratoire : $1.2 < \text{ATP/ADP} < 2.2$). Un déficit en sérotonine a par ailleurs été objectivé chez le patient, mais le traitement par antidépresseurs tricycliques dont le mécanisme d'action passe par l'inhibition de la recapture de la sérotonine est un facteur confondant qui peut expliquer cette donnée.

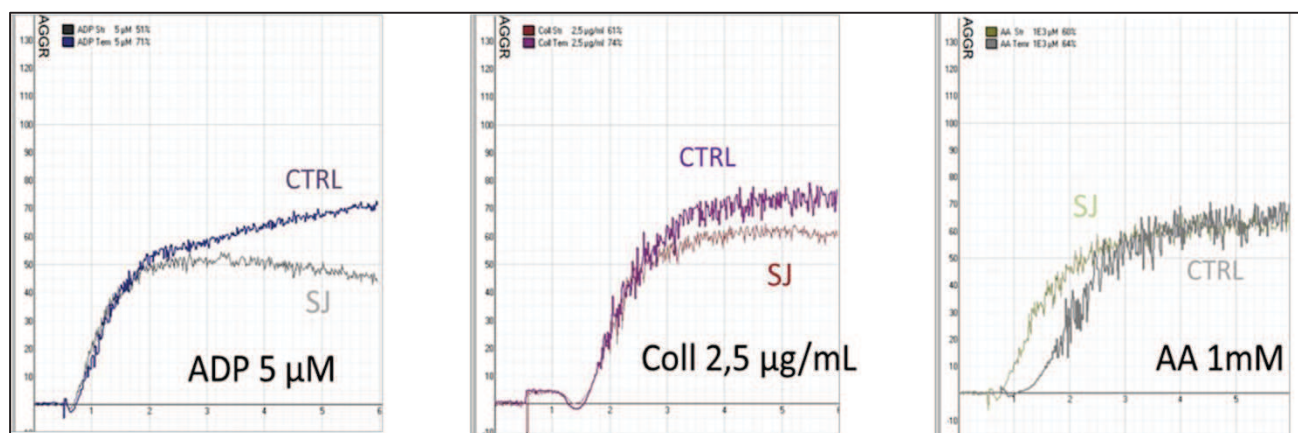


Figure 34 : Agrégations plaquettaires réalisées en PRPc chez le propistus (SJ) et chez un témoin du jour (CTRL)

A gauche, la stimulation des plaquettes du propositus par l'ADP (5 µM n'entraîne pas de deuxième vague d'agrégation. Au centre et à droite, les agrégations induites respectivement par le collagène (2.5 µg/mL) et l'acide arachidonique (1 mM) ne montrent pas d'anomalie particulière.

A la suite de la mise en évidence du déficit en ADP dans les granules denses chez ce patient, nous avons pu explorer l'ensemble des membres de sa famille à savoir ses trois frères et sœurs ainsi que ses parents. La mère du propositus rapporte un syndrome hémorragique dans l'enfance essentiellement sous la forme d'épistaxis alors que les autres membres de la famille ne présentent à priori pas de manifestation hémorragique particulière. L'étude en plaquettes lavées réalisée chez le propositus a alors mis en évidence une diminution modérée d'amplitude d'agrégation induite par le collagène à 2.5 µg/mL fortement majorée en présence de faible concentration d'agoniste (1.25 µg/mL). Aucune anomalie d'agrégation induite par l'acide arachidonique n'a pu être observée le jour de l'exploration (Figure 35). Par ailleurs, chez la mère du propositus (SH), son frère (SM) et une de ses sœurs (SCH), les tests d'agrégation plaquettaires effectués en PRPc ont également montré une absence de deuxième vague induite par l'ADP (5 µM) alors que chez le père (SF) et chez sa deuxième sœur (SCA), aucune anomalie n'a été mise en évidence.

Un dosage des nucléotides et de la sérotonine plaquettaire a été réalisé chez les six membres de la famille. Le déficit en ADP associé à un rapport ATP/ADP > 5 a été confirmé chez le propositus. La même anomalie a été mise en évidence chez les membres de la famille présentant une absence de deuxième vague d'agrégation à l'ADP (Figure 36). Les dosages de sérotonine effectués ne montraient aucun déficit chez l'ensemble des membres de la famille (valeurs normales : 200 – 1200 ng/mL pour 10⁹ plaquettes) hormis chez notre propositus qui était toujours traité par antidépresseurs tricycliques (valeurs obtenue : 50 ng/mL pour 10⁹ plaquettes).

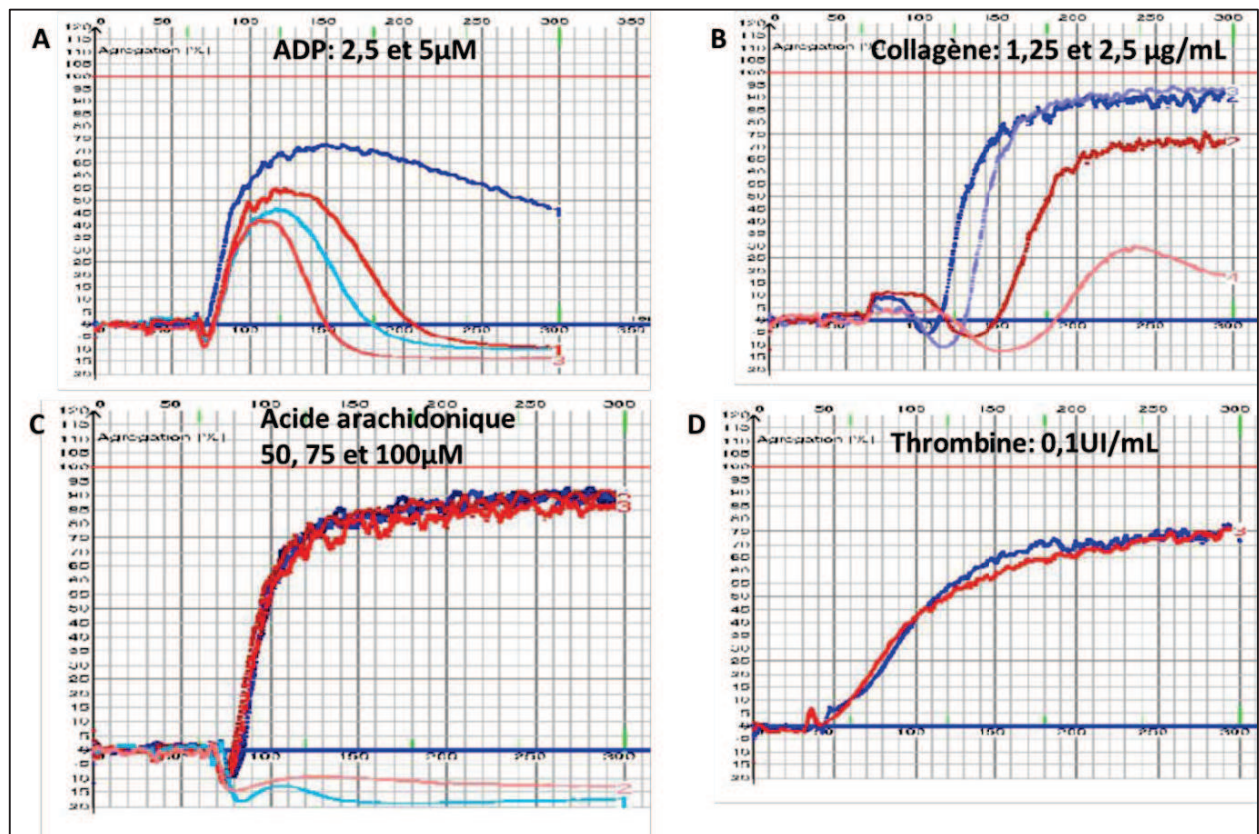


Figure 35 : Agrégations plaquettaires réalisées en plaquettes lavées chez le propositus (SJ, courbes rouges) et chez un témoin du jour (courbes bleues)
 (A) : agrégations après stimulation par l'ADP (2.5 μ M et 5 μ M) (B) : agrégations après stimulation des plaquettes par le collagène (1.25 μ g/mL et 2.5 μ g/mL). (C) : agrégations induites par l'acide arachidonique (50, 75 et 100 μ M). (D) : Agrégations induites par la thrombine 0.1 UI/mL. Sur chaque graphique, les courbes dont les couleurs sont les plus claires correspondent aux concentrations en agoniste les plus basses, les couleurs les plus foncées correspondent aux concentrations en agoniste les plus élevées.

L'observation des plaquettes de SJ en microscopie électronique à transmission n'a montré aucune anomalie morphologique plaquettaire et en particulier la présence de granules denses en quantité normale et d'aspect comparable aux plaquettes témoins (Figure 37).

L'ensemble des données cliniques et biologiques récoltées a ainsi permis de poser le diagnostic de maladie du pool vide non syndromique avec déficit isolé en ADP chez trois membres de cette famille de six personnes : SJ, SCH et SM.

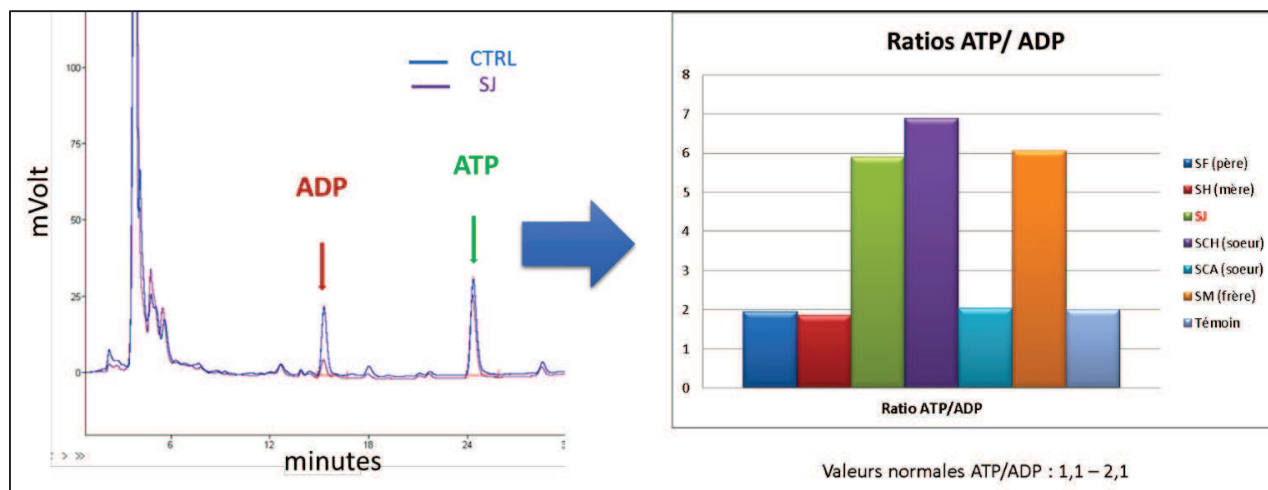


Figure 36 : Dosage des nucléotides plaquettaires

A gauche, chromatogramme du dosage de l'ADP et de l'ATP obtenu en HPLC chez le propositus SJ. A droite : ratio ATP/ADP obtenu après dosage des nucléotides en HPLC chez les 6 membres de la famille. On note un déficit majeur en ADP chez le propositus (SJ), une de ses sœurs (SCH) et son frère (SM) conduisant à des rapports de concentration d'ATP/ADP fortement augmentés (>4).

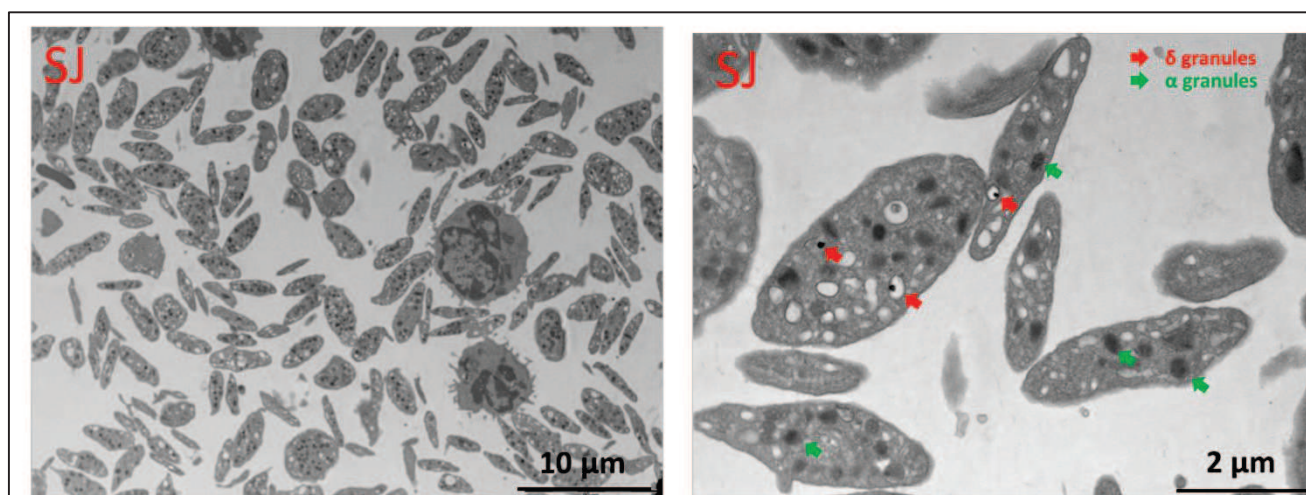


Figure 37 : Plaquettes du propositus (SJ) observées en microscopie électronique à transmission

On ne note aucune anomalie ultrastructurale particulière avec la présence de granules α et δ en quantités normales.

3.5.2 Recherche des gènes impliqués dans la maladie du pool vide non syndromique diagnostiquée chez certains membres de la famille S

3.5.2.1 Séquençage d'exome et hypothèses de transmission de la pathologie

La mise en évidence chez trois membres de la famille S (Figure 38) d'une anomalie biologique similaire et caractéristique d'un type de δ -SPD non syndromique nous a conduits à la réalisation du séquençage de l'exome de tous les membres de la famille (Boycott et al., 2013).

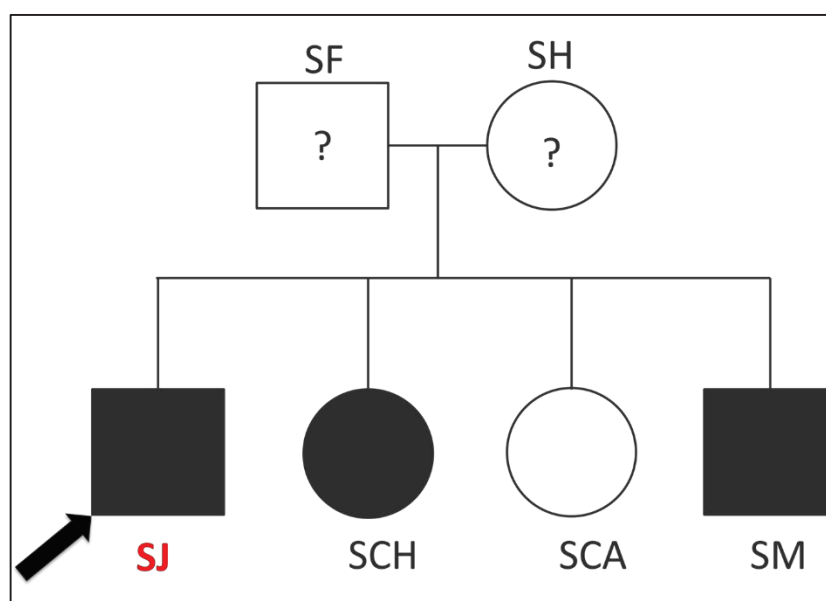


Figure 38 : Arbre généalogique de la famille S

Trois membres sont porteurs d'une maladie du pool vide non syndromique avec déficit en ADP : le propositus SJ, SCH et SM.

En effet, l'identification de la pathologie chez trois enfants sur quatre permet d'envisager une comparaison des séquences codantes de l'ensemble des gènes de chaque individu afin de rechercher des mutations corrélées avec la présence de la thrombopathie. Compte tenu de l'arbre généalogique réalisé, plusieurs hypothèses de transmission de la thrombopathie peuvent être envisagées :

- Une transmission autosomique dominante liée à une mutation germinale dite « *de novo* » d'un seul gène provenant indifféremment du père ou de la mère. Dans ce cas, seuls SJ, SM et SCH seraient porteurs de la mutation.
- Une transmission autosomique récessive : les parents (non consanguins) seraient alors porteurs d'une mutation mono-allélique et possiblement différente du même gène. Les deux mutations devraient alors

être trouvées chez les trois enfants atteints (patients hétérozygotes composites). Le quatrième enfant (SCA) serait alors porteur d'une mutation mono-allélique provenant indifféremment du père ou de la mère, ou ne porterait aucune mutation du gène candidat.

- Un digénisme (Schaffer, 2013): la pathologie serait liée à deux mutations de deux gènes distincts codant des protéines qui interagiraient directement ou indirectement l'une avec l'autre au cours du même mécanisme physiologique. Dans ce cas, les deux mutations devraient être trouvées chez les enfants atteints. Une mutation serait supposée provenir de la mère et l'autre du père. Le quatrième enfant pourrait alors porter indifféremment une anomalie isolée d'un des gènes ou bien aucune anomalie.

Le séquençage des exomes complets des six membres de la famille et les analyses bio-informatiques associées ont été réalisées en collaboration avec nos collègues du laboratoire de génétique du CHU de Strasbourg (Professeur Hélène Dollfus et son équipe, Unité INSERM 1112). Le séquençage en lui-même a été confié à la société Integrangen© qui a effectué ce travail sur un séquenceur Haut Débit Illumina HiSeq 2000. Les détails de la méthode de séquençage sont fournis dans l'annexe technique (Annexe 4) de ce document. L'annotation de l'exome et la validation de la qualité du séquençage ont été effectuées à l'aide du logiciel Illumina RTA (Real Time Analysis) v1.14. En particulier, les séquences retenues devaient posséder sur chaque base un score de qualité Q suffisamment élevé ($Q > 25$) pour attester de manière statistique que la base proposée est bien celle qui est présente à cet emplacement dans le génome (si $Q > 25$, la probabilité pour que cette base soit la bonne est supérieure à 99%). Par la suite, l'ensemble des séquences validées ont été alignées sur le génome de référence (version hg19/GRCh37) à l'aide du logiciel CASAVA 1.8. Ce logiciel fourni par Illumina© permet l'annotation des différents polymorphismes mis en évidence ainsi que l'identification des mutations de type insertion/délétion (INDEL). Cette approche nous a permis de mettre en évidence plus de 230 000 variants dans l'ensemble des six exomes analysés. Ces variants ont ensuite été filtrés et annotés à l'aide d'une approche utilisée par l'équipe du Pr Hélène Dollfus : Alamut HT (Interactive Biosoftware©) qui permet d'inclure dans l'analyse les annotations du génome ainsi que les effets potentiels des variants à la fois au niveau nucléotidique et au niveau protéique. La combinaison des informations obtenues avec les données disponibles dans les différentes bases de données internationales en termes de fréquence des variants décrits dans la population générale a permis de classer les mutations identifiées en fonction de leur potentiel délétère.

Une fois l'analyse bio-informatique réalisée, nous avons pu appliquer les différentes hypothèses de transmission de la pathologie précédemment citées. Mais avant cela, nous nous sommes immédiatement intéressés au gène *ABCC4* codant pour la protéine MRP4 actuellement supposée être impliquée dans les δ -SPD non syndromiques. Malheureusement, aucune mutation n'a été mise en évidence chez aucun membre de notre famille. Ce résultat ne permet cependant pas de conclure définitivement quant à l'absence d'implication de la protéine MRP4 dans notre cas de δ -SPD car les séquences régulatrices situées hors des exons du gène *ABCC4* n'ont pas été séquencées.

Les scénarios de transmission basés sur l'atteinte d'un seul gène ne nous ont pas permis de sélectionner de gènes candidats codant pour des protéines plaquettaires dont la fonction pouvait être en rapport avec la thrombopathie observée. L'hypothèse d'une transmission autosomique dominante associée à une mutation *de novo* nous a orientés vers une quinzaine de gènes mais aucun n'était impliqué dans la physiologie plaquettaire. De la même manière, les quarante gènes candidats sélectionnés en émettant l'hypothèse d'une transmission autosomique récessive avec apparition d'hétérozygotes composites chez enfants atteints n'ont pas permis d'identifier de protéine candidate potentiellement liée à la pathologie observée (Figure 39).

Devant l'absence de mutation d'un seul gène codant une protéine impliquée dans la physiologie plaquettaire, nous nous sommes orientés vers une hypothèse de digénisme. En effet, dans la majorité des cas, les techniques de séquençage à haut débit ne permettent pas, à elles seules, à l'aide de simples alignements de séquences, l'identification d'anomalies multigéniques responsables de pathologies complexes (Schaffer, 2013). En complément, la prise en compte des principales protéines connues pour être impliquées dans la physiologie impactée par la pathologie est indispensable. Dans le cas de famille S, le déficit en ADP mis en évidence, nous oriente prioritairement vers la recherche d'une anomalie d'un transporteur de nucléotides localisé sur la membrane des granules denses plaquettaires.

L'identification récente du transporteur de nucléotides VNUT sur la membrane des granules denses plaquettaires (Hiasa et al., 2014) nous a permis d'orienter la suite de nos investigations. En effet une mutation faux-sens hétérozygote du gène *SLC17A9* a été mise en évidence à la fois chez notre propositus (SJ) et chez sa mère (SH) qui rapporte également une histoire hémorragique ponctuée d'épistaxis récurrentes. Cette mutation c.1190C>T conduit à la substitution de la thréonine 397 (localisée dans le 13^{ème} exon) par une méthionine. Ce polymorphisme est décrit dans environ 4% de la population d'après la base de donnée « 1000 génomes ». La fréquence relativement élevée d'apparition de ce polymorphisme n'est cependant pas en contradiction avec la fréquence des δ -SPD qui sont considérées comme les thrombopathies les plus fréquentes dans la population. Par ailleurs, la thréonine 397 est au centre d'une séquence de 6 acides aminés (ET**T**GSW) intégralement conservée dans de nombreuses espèces : l'Homme, le singe rhésus, la souris, le chien, l'éléphant et le poulet, ce qui suggère un rôle fondamental de cette séquence dans la fonction du transporteur. Malheureusement, le modèle de prédiction fonctionnelle de cette séquence extrêmement conservée (via le site internet Interpro (Interpro) ne fournit aucune information sur son rôle supposé.

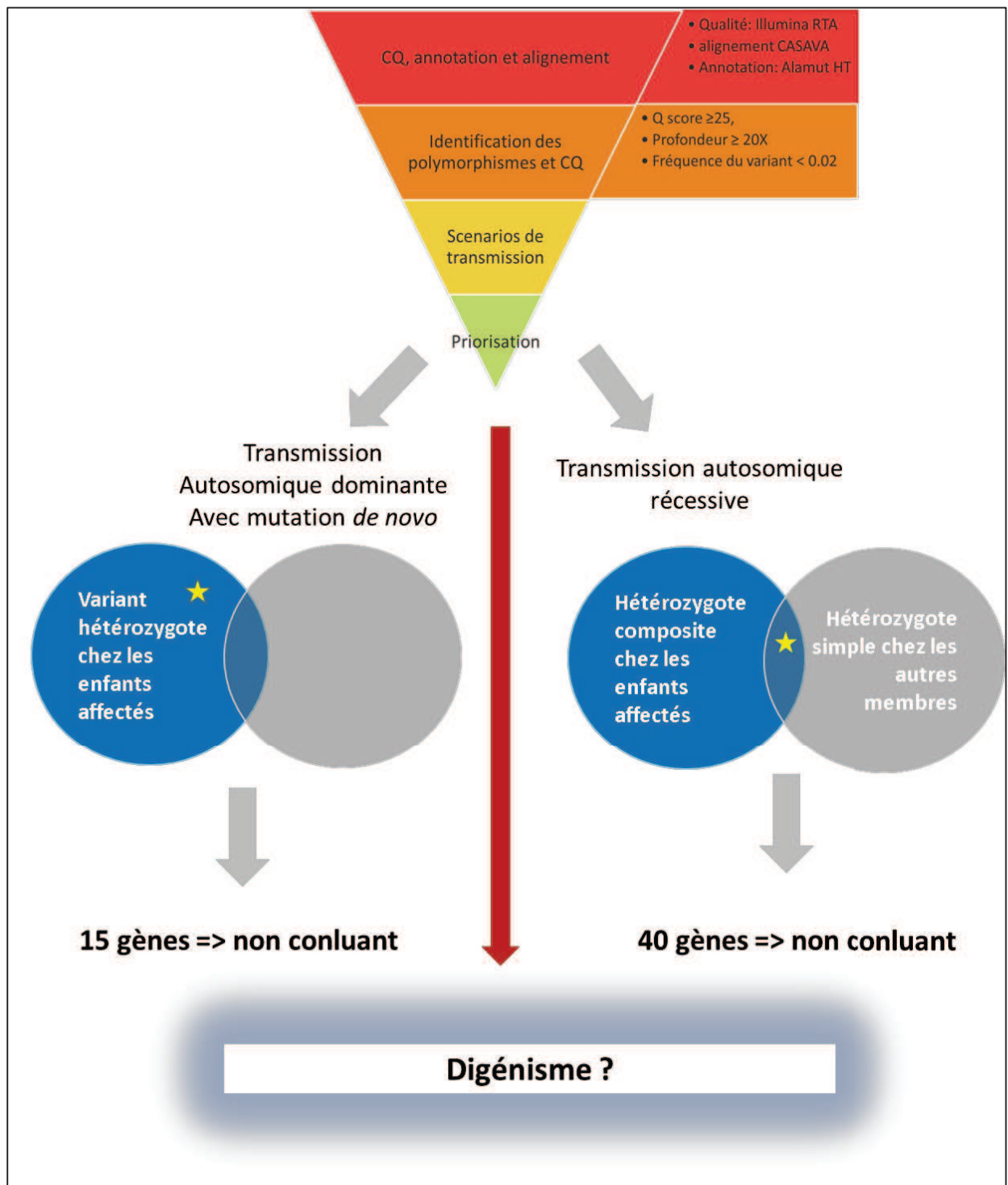


Figure 39 : Schéma résumé de la stratégie d'analyse bio-informatique et des scénarios de transmission appliqués à la suite du séquençage d'exome de la famille S

Les données générées par le séquençage d'exome ont été retraitées successivement à l'aide de trois logiciels : RTA, CASAVA et Alamut HT. L'exome de chaque individu a été annoté et l'ensemble des mutations identifiées ont été classées en fonction de leur potentiel délétère. Les différents scénarios de transmission (mutation de novo à transmission autosomique dominante, transmission autosomique récessive ou digénisme) ont ensuite été appliqués pour sélectionner les gènes candidats.

3.5.2.2 Etude du transporteur VNUT chez le patient SJ

VNUT (vesicular nucleotides transporter) est une protéine à douze domaines transmembranaires codée par le gène *SLC17A9* localisé sur le bras long du chromosome 20 (20q13.33). La protéine a été caractérisée pour la première fois en 2008 par l'équipe de Sawada (Sawada et al., 2008) qui a isolé le transporteur dans de nombreux tissus chez la souris mais dont l'expression majoritaire était essentiellement localisée dans le cerveau, les glandes surrénales et la thyroïde. Cette équipe a également montré que VNUT est un transporteur actif de nucléotides et en particulier de l'ATP qui utilise comme force motrice le gradient électrochimique créé par la concentration des protons dans les vésicules cellulaires acides (Figure 40). Les travaux de Sakamoto et al (Sakamoto et al., 2014) ont par la suite montré grâce à un modèle de souris KO que le transporteur VNUT participait à la régulation de la sécrétion d'insuline par les cellules β des îlots de Langerhans.

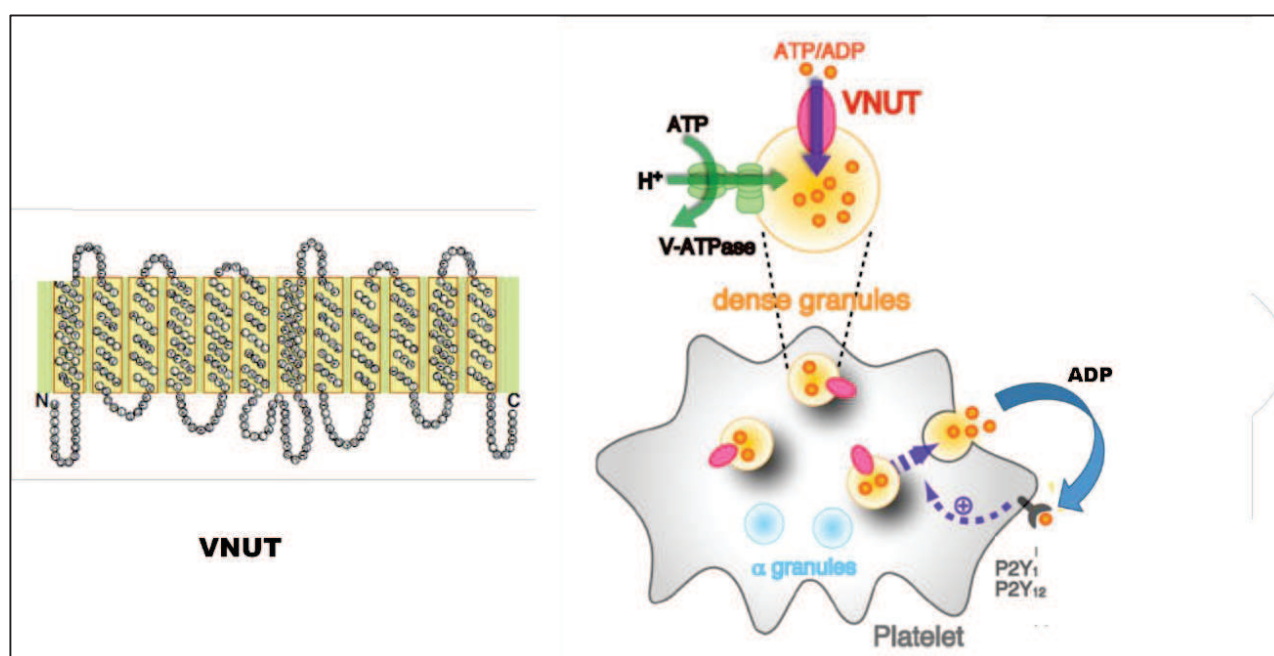


Figure 40 : Le transporteur de nucléotides VNUT

A gauche représentation schématique des 12 domaines transmembranaires de la protéine VNUT. A droite, présentation du rôle supposé du transporteur VNUT dans l'incorporation des nucléotides dans les granules δ plaquettaires. Le transport actif des nucléotides est effectué grâce à la protéine VNUT qui utilise comme force motrice le gradient électrochimique généré par l'entrée des protons dans les granules. Les nucléotides se concentrent dans les granules et seront sécrétés au cours du processus d'activation des plaquettes. (D'après Sawada et al (Sawada et al., 2008), et Hiasa et al (Hiasa et al., 2014),)

Enfin, la mise en évidence de l'expression de VNUT sur les granules denses plaquettaires par Hiasa et al (Hiasa et al., 2014) suggèrent un rôle de ce transporteur de nucléotides dans la concentration de l'ATP dans ces organelles. Cependant, ces travaux ne permettent pas de conclure sur l'origine de la concentration d'ADP dans

les granules δ . En effet, VNUT transporterait indifféremment l'ADP et l'ATP. Or l'ADP plaquettaire est presque intégralement localisé dans les granules denses plaquettaires ce qui suggère :

- soit la présence un transporteur spécifique de l'ADP qui concentrerait ce nucléotide dans les granules δ au dépend du milieu intra-cellulaire,
- soit un autre mécanisme qui permettrait la synthèse de l'ADP directement dans les granules δ . Dans ce cas l'ADP pourrait provenir de la dégradation de l'ATP suite à l'action d'une enzyme de type nucléotidase.

Nous avons poursuivi les investigations pour savoir si l'expression et/ou la localisation de la protéine VNUT étai(en)t perturbée(s) chez le propositus (SJ). Les immunoempreintes (Western blot) réalisées sur le lysat plaquettaire de notre patient n'ont cependant mis en évidence aucune anomalie de taille ou d'expression de la protéine (Figure 41).

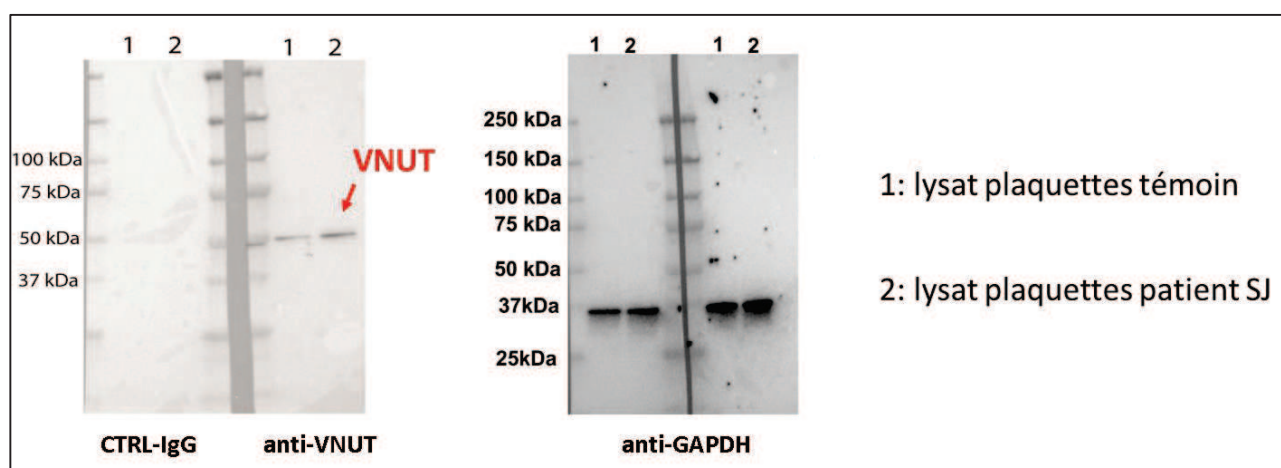


Figure 41 : Immuno-empreintes (Western blot) réalisées sur un lysat de plaquettes témoin ou de plaquettes du patients SJ

A gauche, on retrouve la présence de la protéine VNUT (55 KDa) sur le lysat de plaquettes témoin et chez le patient. A droite, l'utilisation d'un anticorps dirigé contre la Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) permet de montrer que l'expression de la protéine VNUT n'est pas diminuée chez le patient SJ.

En plus de l'étude de l'expression de la protéine VNUT, nous travaillons actuellement à l'étude de la localisation de la protéine en microscopie électronique à transmission. La mise au point des immuno-marquages utilisant l'anticorps anti-VNUT couplé à des billes d'or devrait permettre d'identifier rapidement une éventuelle localisation atypique de la protéine.

Enfin, nous avons sollicité l'équipe de Sakamoto (Sakamoto et al., 2014) qui a généré récemment des souris KO pour la protéine VNUT, afin d'obtenir quelques animaux au laboratoire. Cette équipe ne fait pas mention d'un quelconque phénotype hémorragique chez ces souris, et il serait simple et rapide d'effectuer des

agrégations plaquettaires et un dosage de nucléotides chez ces animaux pour conclure à l'implication de VNUT chez la souris, dans le stockage de l'ADP dans les granules denses plaquettaires.

3.5.2.3 Recherche d'un deuxième gène candidat

L'hypothèse de digénisme et la mise en évidence d'une mutation du gène *SLC17A9* chez notre propositus et chez sa mère nous a conduits à rechercher une mutation présente chez le père du propositus et transmise aux trois enfants atteints. En appliquant cette hypothèse de transmission et en sélectionnant les gènes codant des protéines impliquées dans le métabolisme plaquettaire, nous avons pu identifier 24 gènes candidats qui sont actuellement en cours d'exploration (Figure 42).

ADAMTS20	PCDHA2	PIK3R1	ATP8A1
C4orf17	PCDHAC2	RAB3A	COL4A3
LAMA5	ANKRD36C	CALR3	FGB
ARHGAP24	BANK1	LYST	NETO1
ANKRD52	POTED	ADAMTS1	PLCB4
ENTPD2	PILRB	ADAMTS16	ASB2

Figure 42 : Liste des gènes candidats qui présentent des mutations chez le père du propositus (SF) ainsi que chez les trois enfants atteints (SJ, SCH et SM)

Parmi ces gènes, deux retiennent particulièrement notre attention et feront l'objet d'une étude approfondie : *ENTPD2* qui code pour une ectonucléotidase qui dégrade l'ATP en ADP et l'ADP en AMP (Wink et al., 2006) et le gène *LYST* déjà présenté dans le cadre des syndromes de Chediak-Higashi.

L'étude du gène *ENTPD2* passera d'abord par un réséquençage complet du gène. Les mutations confirmées pourront alors être reproduites dans un vecteur plasmidique bactérien qui permettra l'expression des protéines sauvages ou mutées. Des expériences évaluant la cinétique de dégradation des nucléotides seront alors effectuées afin de mettre en évidence un éventuel déficit fonctionnel de cette nucléotidase.

L'étude du gène *LYST* passera également par un séquençage complet associé à une étude biochimique de la protéine directement sur les lysats plaquettaires provenant des patients. Des immunomarquages en microscopie électronique seront également réalisés sur le matériel actuellement disponible à l'EFS Alsace afin d'étudier la localisation de la protéine.

3.6 Recherche des gènes impliqués dans la maladie du pool vide non syndromique : conclusion/discussion

Nous avons donc identifié au cours de cette étude une famille dont trois membres sont porteurs d'une maladie du pool vide avec déficit isolé en ADP. Le séquençage d'exomes réalisé chez tous les membres de la famille a permis de mettre en évidence une mutation hétérozygote faux-sens dans une partie très conservée du gène codant pour le transporteur de nucléotides VNUT. Cette mutation a été trouvée chez notre propositus et chez sa mère. Dans l'hypothèse d'un digénisme, un autre gène candidat est actuellement recherché pour expliquer le phénotype observé chez les membres de la famille porteurs de δ -SPD. Deux gènes candidats retiennent actuellement notre attention : *ENTPD2* qui code pour une nucléotidase et *LYST* qui code pour une protéine peu connue impliquée dans le trafic des organelles cellulaires. Une anomalie fonctionnelle de la nucléotidase (*ENTPD2*) pourrait permettre d'expliquer le phénotype observé. En effet, une anomalie du transport des nucléotides VNUT (ATP et ADP) lié à une mutation de *SLC17A9* associée à un déficit de dégradation d'ATP en ADP au sein des granules δ expliquerait le déficit profond en ADP retrouvé chez les patients. Le deuxième gène candidat particulièrement intéressant est le gène *LYST*. En effet, les mutations homozygotes du gène *LYST* ont été identifiées dans les maladies de Chediak-Higashi. Il nous paraît donc indispensable de vérifier qu'une mutation hétérozygote du gène *LYST* n'est pas impliquée dans certaines formes non syndromiques de δ -SPD comme celle identifiée dans la famille S.

Cependant, compte tenu du rôle supposé de la protéine VNUT dans la concentration des nucléotides dans les granules δ , la recherche d'une autre anomalie génétique du gène *SLC17A9* qui n'aurait pas été trouvée au cours du séquençage d'exome doit être envisagée. Le séquençage complet par méthode de Sanger a été récemment réalisé chez tous les membres de la famille S mais n'a pas mis en évidence de mutation supplémentaire dans la séquence codante du gène *SLC17A9*. L'étude génétique sera donc poursuivie par la recherche d'anomalie dans les introns du gène et dans les séquences régulatrices. Dans ce but, l'utilisation de technique d'hybridation génomique comparative sera un outil déterminant. Enfin, nous venons d'identifier une nouvelle famille dont au moins quatre membres répartis sur trois générations sont atteints d'une maladie du pool vide de présentation similaire à la famille S. Le séquençage du gène *SLC17A9* sera réalisé prochainement. En l'absence d'anomalie de VNUT dans cette nouvelle famille, un séquençage d'exome sera également réalisé et les données obtenues seront croisées avec celles provenant de la famille S. La compilation des données de séquençage provenant des deux familles pourra nous permettre de sélectionner de nouveaux gènes candidats qui n'auraient pas pu être soupçonnés avec les données obtenues uniquement chez la famille S.

4 Diagnostic et caractérisation des thrombopathies : discussion et perspectives

Ce mémoire de thèse d'université a pour objectif principal de discuter des stratégies actuellement utilisées dans les laboratoires et les unités de recherche pour identifier et caractériser les thrombopathies non étiquetées ainsi que pour rechercher les nouveaux gènes impliqués dans la physiopathologie de ces maladies. Le travail présenté dans ce manuscrit a été réalisé au laboratoire d'hémostase spécialisé de l'EFS Alsace qui possède une convention avec les Hôpitaux Universitaires de Strasbourg pour le diagnostic des maladies plaquettaires ainsi qu'au sein de l'unité INSERM UMR S949. Le laboratoire d'hémostase spécialisé de l'EFS Alsace est également associé au CHU de Nancy dans le cadre du Centre de Compétences des Pathologies Plaquettaires (CCPP) pour l'exploration et le suivi des patients atteints de thrombopathies. Grâce à cette démarche coopérative, nous avons pu explorer depuis 2013, environ 480 patients suspectés d'être atteints d'anomalies plaquettaires responsables de syndromes hémorragiques de sévérité variable. Au cours de ces explorations, aucune anomalie plaquettaire n'a pu être mise en évidence chez environ 40% des patients. A l'inverse, 25% des patients étudiés présentaient des déficits fonctionnels correspondant à des pathologies connues : maladie de Glanzmann, maladie de Bernard-Soulier, syndrome MYH9. Cependant pour environ 35% des patients explorés, aucun diagnostic précis n'a encore pu être établi bien que des anomalies fonctionnelles et/ou morphologiques aient été mises en évidence. Ces pathologies, qui englobent de nombreux cas de thrombopénie familiale avec ou sans macrocytose plaquettaire ainsi que des anomalies fonctionnelles variées, sont actuellement en cours de caractérisation au laboratoire.

Nous avons choisi de présenter dans ce mémoire de doctorat les travaux les plus avancés concernant d'une part trois nouvelles mutations du récepteur P2Y₁₂ et d'autre part l'étude d'une famille dont trois membres sont atteints d'une maladie du pool vide non syndromique.

L'étude et la caractérisation de la mutation p.His187Gln du récepteur P2Y₁₂ a été réalisée à la fois sur des plaquettes fraîches et sur des cellules d'astrocytome humain (n'exprimant pas le récepteur de manière native) transfectées avec le récepteur muté ou sauvage. Cette étude a également permis de confirmer le rôle essentiel des expériences de liaison utilisant un nouveau ligand radiomarqué et sélectif du récepteur P2Y₁₂ [³H]PSB-0413. Cependant les deux autres mutations identifiées au laboratoire (p.Tyr259Cys et p.Phe95Ser) nous rappellent que ces expériences de liaison ne sont applicables à la caractérisation du récepteur P2Y₁₂ que si le [³H]PSB-0413 peut effectivement interagir avec son site de liaison au sein du récepteur. En effet, ces deux mutations touchant des acides aminés essentiels pour la liaison des ligands nucléotidiques au récepteur P2Y₁₂ n'ont pas encore pu être caractérisées dans notre modèle cellulaire car l'expression membranaire du récepteur sur les cellules transfectées n'a pu être confirmée. En l'absence de mutation entraînant un déficit majeur d'expression du récepteur (par insertion d'un codon STOP par exemple), la poursuite des investigations sur ces deux mutations nécessitera la transfection de récepteurs (sauvages et mutés) marqués par une séquence

HA permettant une utilisation d'anticorps monoclonaux dirigés contre la séquence HA à la fois en cytométrie en flux et en immunofluorescence. Après avoir vérifié l'absence d'effet de l'insertion de cette séquence HA sur la fonction du récepteur sauvage, nous pourrions étudier l'expression, la localisation et la signalisation associée à ces récepteur variants.

L'identification de ces nouveaux variants chez des patients présentant des syndromes hémorragiques assez modérés nous amène également à une réflexion sur le potentiel hémorragique réellement lié à la présence des anomalies du récepteur chez les patients. En effet, il apparait clairement, d'après les données obtenues chez deux patients étudiés en détails (l'un au laboratoire, patient III-1, l'autre chez nos collègues italiens et allemands) que la présence d'une mutation homozygote abolissant complètement la transduction du signal en aval du récepteur est responsable d'une histoire hémorragique constamment présente et parfois sévère. Le phénotype observé en présence de la mutation homozygote p.His187Gln est similaire à celui des patients précédemment décrits pour être porteurs de mutation entraînant une absence d'expression du récepteur (Hollopeter et al., 2001) (Conley, 2001). Le dépistage et le diagnostic précis des anomalies du récepteur P2Y₁₂ est donc indispensable chez les patients présentant un déficit sévère afin de prévoir une prise en charge médicale adaptée à leur pathologie. Cependant, en cas de mutation hétérozygote, le potentiel hémorragique lié à cette anomalie est mal connu. D'après notre expérience, dans certains cas, le syndrome hémorragique est suffisamment important pour motiver une consultation spécialisée et une étude poussée des fonctions plaquettaires. Par ailleurs, même si les patients porteurs d'une mutation hétérozygote ne présentent qu'un phénotype hémorragique modéré, l'addition de facteurs de risques supplémentaires (congénitaux ou acquis) tendra à majorer fortement le phénotype. C'est le cas chez le patient CJP pour lequel les anomalies fonctionnelles associées à la mutation hétérozygote p.Tyr259Cys sont fortement majorées par la prise d'un traitement antiplaquettaire de type aspirine. En présence de ce type de traitement, il est probable que des hémorragies provoquées chez ces patients pourraient devenir importantes et difficiles à contrôler. Enfin, la fréquence des anomalies du récepteur P2Y₁₂ dans la population générale n'est pas connue à ce jour et il est envisageable que de nombreuses personnes soient porteuses de mutations qui n'entraînent pas de syndrome hémorragique suffisant pour motiver une consultation spécialisée aboutissant à la mise en évidence ces variants. L'expression de la pathologie nécessiterait alors un deuxième facteur de risque constitutionnel ou environnemental pour déclencher des hémorragies anormalement importantes. Afin de connaître le vrai potentiel hémorragique associé à la présence de variants du récepteur, des études épidémiologiques seraient nécessaires pour évaluer la fréquence de ces variants et du risque hémorragique qui leur est associé dans la population générale.

Nous avons également présenté le travail réalisé dans le cadre de la recherche des gènes impliqués dans les maladies du pool vide sans présentation syndromique. Le séquençage d'exomes effectué chez six membres d'une famille dont trois membres sont porteurs de la pathologie nous a permis de mettre en évidence une mutation faux-sens du gène *SLC17A9* codant pour le transporteur de nucléotides VNUT récemment identifié sur la membrane des granules denses plaquettaires. Cette mutation présente chez le propositus et chez son père

n'explique pas complètement le phénotype observé chez trois des quatre enfants de la famille (famille S). Nous recherchons donc actuellement d'une part une autre mutation du gène *SLC17A9* dans les séquences non couvertes par l'analyse d'exome, et d'autre part un autre gène candidat qui potentialiserait l'anomalie fonctionnelle de la protéine VNUT liée à la mutation déjà découverte. Par ailleurs, nous venons d'identifier au laboratoire une deuxième famille (famille H) dont au moins quatre membres sont atteints d'une maladie du pool vide de présentation similaire à la pathologie observée dans la famille S. Le séquençage du gène *SLC17A9* sera d'une importance cruciale pour confirmer l'hypothèse selon laquelle le transporteur VNUT serait impliqué dans la pathologie. Enfin, le séquençage d'exome qui sera réalisé chez l'intégralité des membres de cette nouvelle famille nous permettra de compiler les données de séquençage obtenues chez nos deux familles afin de renforcer ou infirmer nos hypothèses actuelles.

Comme nous avons pu le voir, les δ -SPD correspondent à une entité de thrombopathies très hétérogène. Les travaux qui débutent actuellement au laboratoire sur une nouvelle famille confirment cette complexité. En effet, dans le cadre des réunions du CCPP de la partie Est de la France, nous avons exploré une jeune femme de 23 ans présentant un syndrome hémorragique ayant nécessité à plusieurs reprises une couverture plaquettaire lors d'interventions chirurgicales. L'étude des plaquettes de la patiente a permis de diagnostiquer une maladie du pool vide associée à un déficit majeur en ADP (rapport ATP/ADP > 10) et à une absence complète de granules denses ou à la présence de granules δ extrêmement dystrophiques dans les plaquettes (Figure 43).

Contrairement aux membres atteints des familles S et H, cette patiente semble donc porteuse d'un δ -SPD caractérisé par une absence de granules δ ou par des anomalies morphologiques majeures des granules δ . Le dosage de la sérotonine et les tests d'incorporation/sécrétion de sérotonine radiomarquée qui seront effectués permettront de poursuivre la caractérisation de la pathologie chez notre propositus. La collaboration avec les cliniciens de l'interrégion Est nous permet actuellement de reconstruire l'arbre généalogique de la famille. En effet, une partie des individus est suivie à Besançon alors que l'autre partie consulte vers Dijon. La collaboration actuelle dans le cadre du Centre de Compétences des Pathologies Plaquettaires et l'harmonisation des techniques de dépistage de cette pathologie permettra d'identifier précisément les patients porteurs de l'anomalie fonctionnelle et cela sans faire déplacer les patients à Strasbourg. Une fois l'identification précise des patients réalisée, un séquençage d'exome pourra être effectué afin de rechercher les gènes impliqués dans cette forme de δ -SPD.

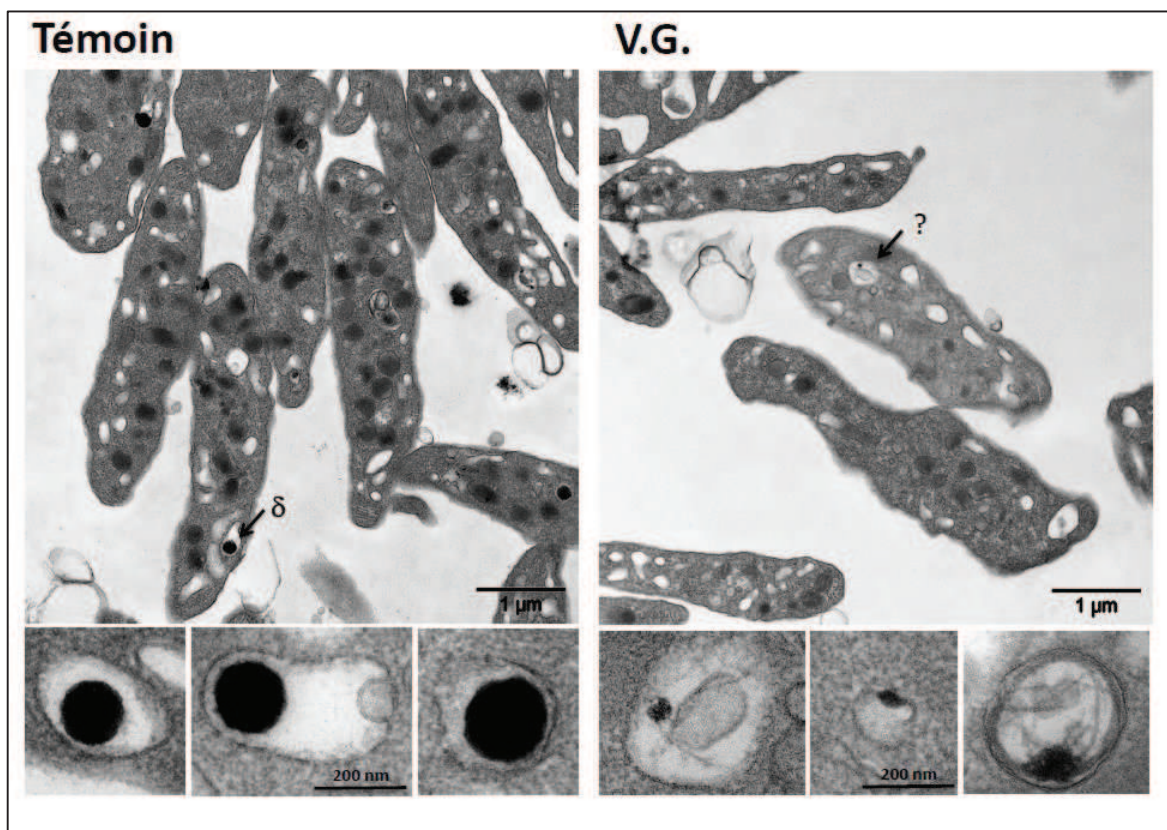


Figure 43 : Observation en microscopie électronique des plaquettes d'une patiente atteinte d'une maladie du pool vide non syndromique avec rapport ATP/ADP > 10

On note une quasi absence de granules denses ou la présence de granules denses très fortement dystrophiques où l'on ne peut plus mettre en évidence la zone centrale normalement opaque aux électrons contenant une très forte concentration de calcium.

De nombreuses autres thrombopathies sont explorées dans le cadre du centre de compétence Grand-Est. Nous avons en particulier mis en évidence ces trois dernières années deux cas de déficit en GPVI chez deux patients différents. Les explorations morphologiques et fonctionnelles ont été effectuées à Strasbourg alors que les études protéiques ont été prises en charge par l'équipe du Professeur Martine Jandrot-Perrus à l'Hôpital Bichat (INSERM UMR 1148). Un des patients explorés présentait un syndrome des plaquettes grises découvert il y a plusieurs années. Devant la présence d'un syndrome hémorragique majeur observé suite à un traitement par aspirine, nous avons mis en évidence une absence complète d'agrégation induite par le collagène et la convulxine associée à diminution très importante d'expression de la GPVI objectivée en cytométrie en flux. Les immunoempreintes réalisées à Strasbourg et à Paris ont mis en évidence une diminution environ 80 % de l'expression de la GPVI, de son fragment intra-cytoplasmique et de la chaîne γ du récepteur au fragment Fc des immunoglobulines (Figure 44).

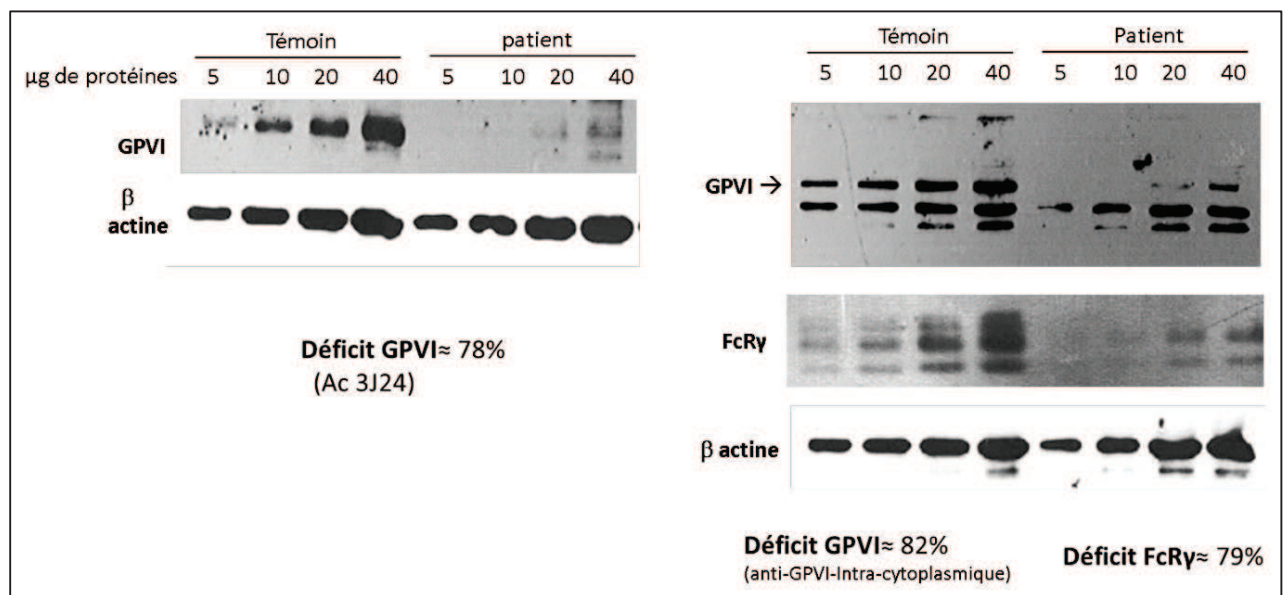


Figure 44 : Immunomarquages réalisés sur des lysats de plaquettes d'un témoin ou d'un patient atteint d'un syndrome des plaquettes grises associé à un déficit en GPVI

A gauche, l'utilisation d'un anticorps (3J24) dirigé contre la partie extracellulaire de la GPVI met en évidence un déficit d'environ 80 % d'expression de la protéine. A droite, l'utilisation d'un anticorps dirigé contre la partie intracytoplasmique de la protéine confirme le déficit en GPVI alors que l'anticorps dirigé contre la chaîne γ du récepteur au fragment Fc des immunoglobulines montre que cette chaîne normalement associée à la GPVI est également absente.

La diminution homogène de la GPVI et de la chaîne associée évoquerait soit un processus d'internalisation conjoint soit un défaut d'expression conjoint. Ce cas proche de celui publié par Nurden P et al (Nurden et al., 2004) est actuellement en cours de caractérisation. L'analyse de biologie moléculaire est effectuée chez le Dr Remi Favier alors que l'étude du mécanisme conduisant à un déficit en GPVI dans le cadre d'un syndrome des plaquettes grises sera effectuée à Strasbourg.

Par ailleurs, nous avons saisi l'opportunité d'être localisés dans un centre de transfusion sanguine pour évaluer la prévalence de certains gènes impliqués dans des thrombopénies congénitales. En effet, les sites de prélèvements des différents établissements de transfusion sanguine (ETS) sont régulièrement amenés à mettre en évidence des thrombopénies modérées et récurrentes dans la population des donneurs de sang. Cependant, la prévalence des anomalies génétiques conduisant à ces thrombopénies est encore inconnue dans la population générale et en particulier chez les donneurs volontaires. Dans ce contexte, trois ETS régionaux (Alsace, Centre Atlantique (Pr Py) et Bretagne (Pr Férec, Dr Guéguen)) se sont associés pour conduire une étude ayant pour objectif d'identifier la prévalence des mutations de 17 gènes connus pour être impliqués dans des thrombopénies dans la population des donneurs de sang. L'ADN des donneurs thrombopéniques sera obtenu par l'intermédiaire d'un prélèvement salivaire qui sera transféré au laboratoire de génétique de Brest pour

extraction et séquençage. Les données épidémiologiques seront compilées par le Professeur Py et les études fonctionnelles plaquettaires seront réalisées préférentiellement à Strasbourg. Cette étude dite ABC (pour Alsace, Bretagne, Centre Atlantique) a été déclarée aux instances nationales réglementaires et est enregistrée auprès de l'Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé (ANSM) sous le numéro RCB : 2014-A00002-45.

Bien que le laboratoire dispose déjà de nombreux outils qui nous permettent de conduire des projets de recherche variés, la mise en place d'un séquenceur à haut débit nous permettrait de répondre à la demande croissante nécessaire au diagnostic des thrombopathies. En effet, les techniques de séquençage par méthode de Sanger sont de moins en moins adaptées à notre besoin de séquençage pour les gènes de grande taille (*MYH9* et *NBEAL2* par exemple) ou pour des panels de gènes. L'utilisation de cette technologie nécessiterait alors de définir un panel de gènes impliqués dans les thrombopathies connues. Cet outil pourrait être utilisé de deux manières différentes :

- en regroupant les patients en attente de séquençage de gènes connus en limitant l'analyse bio-informatique associée au gène concerné
- en recherchant les anomalies de plusieurs gènes candidats dans le cadre de l'exploration de thrombopathies pour lesquelles un gène unique ne peut être suspecté. C'est le cas notamment pour les macrothrombopénies familiales pour lesquelles des anomalies fonctionnelles sont rarement mises en évidence et qui nécessitent donc la recherche de mutation des plusieurs gènes incluant *ACTN1*, *MYH9*, *TUBB1*, *FLNA*, *NBEAL2* et *GFI1B*.

Compte tenu du cout relativement modéré et de la possibilité de séquencer plusieurs mégabases chez plusieurs individus en une seule manipulation, les séquençages réalisés sur des séquenceurs à haut débit nous permettraient de pouvoir mettre en évidence de manière très rapide de nombreuses mutations présentes sur des gènes déjà identifiés dans les thrombopathies. Cependant, la réalisation de séquençages d'exomes complets ou de génomes complets particulièrement adaptée à la recherche de nouveaux gènes impliqués dans les thrombopathies, nécessite, en plus de l'investissement initial important, des compétences bio-informatiques poussées pour le traitement des giga-octets de données générées durant les analyses. Afin d'optimiser l'utilisation de ces machines et des compétences nécessaires à l'analyse des données brutes, il apparaît indispensable de s'adresser aux grandes plateformes de séquençage existantes (le Génoscope à Evry, l'Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire à Illkirch, ou des sociétés privées comme Integragen®).

En parallèle, la mise en commun des données obtenues lors des explorations plaquettaires complexes nécessaires à la caractérisation des thrombopathies non étiquetées permet d'identifier des anomalies fonctionnelles similaires chez des patients non apparentés et dispersés géographiquement. Cette force collaborative est actuellement indispensable à la compréhension de la physiopathologie des maladies plaquettaires et à l'établissement de recommandations pour le diagnostic de ces nouvelles entités dont nous ne connaissons pas la fréquence. En effet, comme nous l'avons évoqué précédemment, les différents laboratoires

spécialisés dans l'étude des thrombopathies manquent encore de standardisation dans leur démarche diagnostique (Gresele et al., 2014). L'ordre dans lequel sont réalisés les examens au cours des visites successives des patients, le type d'examens, le type et les concentrations d'agonistes utilisés au cours des épreuves d'agrégation plaquettaire ou de cytométrie en flux sont autant de facteurs qui influencent les profils des anomalies plaquettaires observées chez les patients. Plusieurs équipes, tentent actuellement de proposer une démarche générale et cohérente applicable dans tous les laboratoires (Cattaneo et al., 2013) (Carubbi et al., 2014) (Gresele and Subcommittee on Platelet, 2015). Le CRPP avait déjà proposé dès 2008, des protocoles d'exploration recommandés pour la standardisation de la réalisation des agrégations plaquettaires en PRPc. Mais ces deux documents uniquement focalisés sur les tests d'agrégation méritent une mise à jour et doivent être complétés en accord avec les consensus internationaux établis. Très récemment, P. Gresele (Gresele and Subcommittee on Platelet, 2015) représentant le comité de standardisation de l'ISTH a proposé une suite d'examens de première, deuxième et troisième intention permettant le diagnostic des thrombopathies. Cependant, ces recommandations peuvent paraître irréalisables pour certains laboratoires en particulier si l'on considère que les examens de microscopie électronique doivent être effectués dès la deuxième visite du patient. Dans ce cas, l'immense majorité des laboratoires ne pourrait pas fournir l'ensemble des informations nécessaires à la caractérisation optimale des thrombopathies. Par ailleurs, comme avait tenté de le faire le CRPP en 2008-2009, il n'y a pas seulement une nécessité à donner une hiérarchisation des examens à effectuer mais surtout à standardiser les techniques utilisées. En ce sens, le document proposé par P. Gresele ne répond pas à la problématique des laboratoires qui sont confrontés quotidiennement à l'identification difficile des thrombopathies. Concernant les agrégations plaquettaires, une définition des agonistes principaux et des concentrations utilisées est indispensable. De la même manière, les clones des anticorps utilisés en cytométrie en flux ainsi que les conditions de stimulation des plaquettes durant les tests d'activation devraient être homogénéisés. L'harmonisation de ces techniques permettrait ainsi d'identifier les thrombopathies de manière consensuelle afin d'orienter les examens complémentaires de manière efficace vers les centres spécialisés. Par ailleurs, le développement des examens réalisables à distance autorise l'étude morphologique des plaquettes sans que le patient ait à se déplacer. Ainsi, nous travaillons, en collaboration avec le Dr Bordet (CHU de Lyon) à l'utilisation d'une technique de fixation des plaquettes en PRPc qui permet l'envoi de matériel vers les centres équipés de ces microscopes très coûteux et difficiles à manier. Cette possibilité devrait permettre de construire rapidement un véritable atlas de la morphologie des plaquettes de l'ensemble des thrombopathies diagnostiquées.

Cette démarche globale incluant des études fonctionnelles standardisées et réalisées sur des plaquettes fraîches en agrégométrie et en cytométrie en flux ainsi qu'une étude morphologique poussée en microscopie optique et électronique permettra d'orienter le diagnostic des thrombopathies de manière précise et consensuelle. En nous appuyant sur la faisabilité des différents examens dans le contexte actuel, et compte tenu du travail présenté


```

graph TD
    A[Anomalies d'agrégation à l'ADP] --> B[Agrégation présente mais réversible]
    A --> C[Absence ou quasi absence d'agrégation]
    
    B --> D[Dosage du contenu des granules δ /lumi-agrégométrie]
    D --> E[Absence de déficit]
    D --> F[Déficit 5-HT]
    D --> G[Déficit en nucléotides et 5-HT]
    D --> H[Déficit isolé en nucléotides]
    
    E --> I[Etude de sécrétion  
Autres?]
    F --> J[Incorporation / sécrétion de  
sérotonine]
    G --> J
    H --> K[Génotypage VNUT +  
autre gène?]
    
    J --- L[TEM]
    J --- K
    
    L --- M[Maladies du Pool Vide]
    K --- M
    
    C --> N[génotypage P2RY12]
    N --> O[Mutation inconnue]
    N --> P[Mutation connue]
    N --> Q[Absence de mutation]
    
    O --> R[Caractérisation  
de la mutation]
    P --> S[Pathologie  
identifiée]
    Q --> T[Etude de la  
signalisation en  
aval du récepteur]
  
```

Contrairement aux recommandations de P. Gresele et de l'ISTH et en prenant en compte la facilité et le faible coût d'un séquençage du gène *P2RY12* nous proposons entre autre d'effectuer le génotypage du gène chez tous les patients présentant une anomalie majeure de l'agrégation plaquettaire induite par l'ADP. L'ensemble des tests complémentaires permettant la caractérisation des pathologies devra néanmoins être réalisé dans des centres spécialisés.

103

hémorragiques de la patiente et à sa numération plaquettaire au moment de l'accouchement. Une deuxième étude qui porte sur l'évaluation du risque hémorragique aux cours des interventions chirurgicales chez les patients atteints de déficit fonctionnel plaquettaire a fait l'objet d'une présentation lors du dernier congrès de la société européenne d'hématologie. Cette étude encore non publiée confirme que le risque hémorragique est corrélé au type de thrombopathie identifiée et au score hémorragique initial. Une troisième étude internationale venant de commencer a pour objectif d'effectuer le suivi des épisodes hémorragiques et des traitements associés chez les patients atteints de thrombopathie congénitale.

Nous avons essayé dans ce mémoire de thèse d'université de donner un aperçu des connaissances actuelles sur la physiopathologie des thrombopathies étiquetées. Ces thrombopathies correspondent à des pathologies dont le phénotype est relativement simple et souvent limité à un syndrome hémorragique mais dont l'origine est souvent complexe. Ainsi, des dizaines de gènes et de protéines associées peuvent être responsables d'une anomalie fonctionnelle ou morphologique laquelle sera responsable d'un déficit de l'hémostase primaire. Enfin, l'étude des patients présentant un défaut fonctionnel plaquettaire est une source d'information indispensable pour la compréhension de la physiopathologie des thrombopathies et la mise en évidence des principaux acteurs de la physiologie plaquettaire dite normale.

Apport des modèles murins dans les thrombopénies constitutionnelles

Contribution of mouse models in constitutional thrombocytopenia

Catherine Léon, Arnaud Dupuis, Christian Gachet, François Lanza
UMR S949, Inserm, Strasbourg, F-67065, France
Etablissement français du sang-Alsace (EFS-Alsace), Strasbourg, F-67065, France
Université de Strasbourg, Strasbourg, F-67000, France
Fédération de médecine translationnelle de Strasbourg (FMTS), Strasbourg, F-67065, France

<catherine.leon@efs.sante.fr>

Résumé

Les thrombopénies constitutionnelles résultent d'anomalies de production des plaquettes sanguines (thrombopoïèse) d'origine héréditaire. Les connaissances autour de ces maladies, longtemps mal diagnostiquées et peu étudiées, ont considérablement augmenté ces vingt dernières années. L'essor des techniques de biologie moléculaire permettant l'identification des mutations et la culture de mégacaryocytes provenant de patients, permise par la découverte de la thrombopoïétine, ont grandement contribué à ces progrès. Parallèlement, la manipulation des gènes dans la souris (transgénèse, inactivation totale ou conditionnelle, création de mutations ponctuelles reproduisant les mutations humaines, mutagenèse chimique aléatoire) a permis de créer des modèles de maladies qui ont grandement contribué au décryptage des tableaux cliniques et biologiques présentés par les patients. La plupart des thrombopénies pour lesquelles le gène muté a été identifié ont maintenant un modèle d'étude murin. La mise en relation des données obtenues dans ces modèles et dans les cellules isolées de patients a abouti à une meilleure compréhension des pathologies et des mécanismes normaux de production des plaquettes. Il reste que près de la moitié des thrombopénies constitutionnelles sont encore non étiquetées. L'essor du séquençage à haut débit du génome devrait augmenter le nombre de gènes candidats que la génération de nouveaux modèles murins permettra de confirmer comme cause de la maladie.

■ **Mots clés** : thrombopénie héréditaire, mégacaryocytopoïèse, plaquettes, modèles murins

Abstract

Constitutional thrombocytopenia result from platelet production abnormalities of hereditary origin. Knowledge about these long misdiagnosed and poorly studied diseases has increased considerably in the last twenty years. Improved molecular biology techniques applied to identify mutations in patients and megakaryocyte culture, made possible by the discovery of thrombopoietin, have significantly contributed to this progress. In parallel, genetic manipulation in the mouse (transgenesis, total or conditional inactivation, introduction of point mutations, or random chemical mutagenesis) allowed the generation of disease models in order to decipher patient clinical and laboratory features. Almost all of the thrombocytopenias where the mutated genes have been identified have now a murine model counterpart, either in the form of total gene inactivation or after introduction of the human mutation. Data obtained in these models, together with those from isolated patients' cells, have increased our understanding of the corresponding diseases and also of the normal mechanisms of platelet production. At present, the genetic determinants of thrombocytopenia remain unknown in 40 to 50% of the

Hématologie

Tirés à part : C. Léon

Pour citer cet article : Léon C, Dupuis A, Gachet C, Lanza F. Apport des modèles murins dans les thrombopénies constitutionnelles. *Hématologie* 2015 ; 21 : 262-279. doi : 10.1684/hma.2015.1067

cases. Currently available high-speed sequencing techniques, allowing in particular sequencing of complete genomes or exomes will undoubtedly help in the identification of new candidate genes. These will in turn allow generation of murine models to confirm and further study the abnormal phenotype.

■ **Keywords:** hereditary thrombocytopenia, megakaryocytopoiesis, platelets, mouse models

Les thrombopénies constitutionnelles résultent de mutations génétiques affectant la production des plaquettes. Ces pathologies rares sont encore sous-diagnostiquées, en particulier chez l'adulte, car elles restent peu connues et d'expression très variable. Le diagnostic de thrombopénie auto-immune est encore souvent retenu à tort, conduisant à une prise en charge inadaptée des patients avec, parfois, une splénectomie inappropriée. Le diagnostic des thrombopénies congénitales passe par une analyse cytologique et fonctionnelle des plaquettes réalisées presque uniquement dans des laboratoires spécialisés. Par ailleurs, environ 50 % des thrombopénies associées ou non à une thrombopathie restent à ce jour non étiquetées [1]. Dans les cas où les études plaquettaires orientent le diagnostic vers une pathologie connue, la mise en évidence de mutations dans la séquence des gènes suspectés confirme alors la pathologie.

La compréhension des mécanismes physiopathologiques conduisant aux thrombopénies congénitales a longtemps reposé uniquement sur l'observation des mégacaryocytes présents dans la moelle osseuse. La nécessité de prélèvements médullaires invasifs et la rareté de ces cellules (moins de 1 % des cellules de la moelle) ont longtemps freiné les études. La culture de mégacaryocytes à partir de progéniteurs hématopoïétiques circulants est maintenant possible mais reste confinée aux laboratoires de recherche et seuls quelques rares patients ont été explorés de cette manière. Le développement récent de la reprogrammation génétique de cellules souches pluripotentes induites (iPS) et de leur différenciation mégacaryocytaire a permis des avancées, mais ces systèmes *in vitro* restent imparfaits et ne reproduisent pas fidèlement l'ensemble des étapes conduisant à la formation des plaquettes. Le développement d'outils permettant de manipuler génétiquement la souris permet maintenant de disposer de modèles *in vivo* mimant ces différentes pathologies et permettant l'évaluation de l'impact des mutations sur la production et les fonctions plaquettaires.

L'objectif de cette revue est de faire le point sur l'apport des modèles de souris existants dans la compréhension et le traitement de ces maladies.

Les modèles murins

Les modèles transgéniques

Avec plus de soixante-dix ans d'étude génétique classique, la souris représente un excellent modèle des maladies héréditaires humaines. Les progrès de la génétique et des techniques de biologie moléculaire réalisés ces trente dernières années permettent de créer quasiment « à façon » des modèles de souris mimant les maladies humaines. À travers la mutagenèse ciblée et la transgénèse, on dispose maintenant de toute une panoplie de souris :

- **les souris knock-out total** sont générées par inactivation du gène dans la totalité de l'organisme,
- **les souris knock-out conditionnel** permettent l'inactivation du gène dans un tissu donné ou à un moment précis du développement, grâce à l'utilisation d'enzymes de recombinaison d'ADN, le plus souvent une cre recombinase, exprimée sous contrôle du promoteur d'intérêt.

Dans le cas de l'étude des thrombopénies, le système Mx-Cre est le plus utilisé pour exciser une portion d'ADN à un stade choisi du développement. La cre recombinase est sous contrôle du promoteur ubiquitaire de la protéine Mx1 (*MyXovirus resistance 1*) inducible par l'interféron. L'administration d'interféron α ou β permet d'induire la recombinaison dans tous les tissus à n'importe quel stade du développement. Le degré de délétion du gène varie selon le tissu, probablement en raison du nombre de cellules sensibles à l'interféron qui sont présentes ou de la diffusion de l'interféron dans chaque organe. Pour obtenir une délétion spécifique de la lignée mégacaryocytaire, le système Pf4-Cre développé par le groupe de Radek Skoda est quasiment le seul à avoir été utilisé [2]. La recombinase est sous contrôle du promoteur *Pf4*, permettant la recombinaison dans la lignée mégacaryocytaire, dès le stade I de différenciation des mégacaryocytes, avec un retentissement dans toutes les plaquettes circulantes [2, 3]. Cette recombinaison est observée essentiellement dans la lignée mégacaryocytaire, avec toutefois une recombinaison possible dans certains leucocytes, dépendant de l'état inflammatoire des souris, dont il faut tenir compte pour une interprétation correcte des données [3],

– les souris knock-in permettent l'introduction de mutations ponctuelles ou de petites insertions/délétions par recombinaison homologue au locus d'intérêt. Ces modèles reproduisent fidèlement la mutation présente chez l'homme et représentent la meilleure approche pour modéliser la pathologie. Bien évidemment ces différentes approches, et tout particulièrement le knock-in, sont basées sur la conservation des gènes et de la fonction entre l'homme et la souris.

Les modèles avec mutations spontanées ou provoquées

Comme l'homme, la souris est une espèce sujette aux mutations spontanées. Toutefois, les mutations spontanées étant des événements rares et non prévisibles, les stratégies augmentant la fréquence des mutations accroissent statistiquement la possibilité d'induire des anomalies dans les gènes d'intérêt. Dans ce but, plusieurs programmes de mutagenèse chimique par traitement des gamètes à la N-nitroso-N-éthyl-urée, suivie de méthodes de criblages phénotypiques systématiques ont été mis en place. Associée au séquençage ADN à haut débit, cette technologie a permis récemment l'identification de nouveaux gènes impliqués dans le processus de formation des plaquettes [4-7]. Cette approche pourrait permettre d'orienter le criblage vers de nouveaux gènes chez les patients présentant des thrombopénies congénitales non étiquetées.

Les modèles de souris représentent ainsi une approche incontournable pour approfondir la compréhension des mécanismes mis en jeu dans le processus de formation des plaquettes. Ainsi le nombre de modèles disponibles a-t-il considérablement augmenté depuis dix ans [8]. Tout en restant complémentaires des études faites chez les patients, les souris mutantes constituent des outils précieux pour clarifier les processus physiologiques de base et servir de modèles pour des études expérimentales et des essais précliniques pouvant conduire au développement de nouveaux traitements.

Dans le cadre de cette revue, nous évoquerons brièvement les étapes et les points clés de la formation des plaquettes en mettant l'accent sur le rôle de certaines protéines sièges des mutations impliquées dans les thrombopénies congénitales. Nous développerons ensuite les différentes thrombopénies constitutionnelles pour lesquelles l'apport des modèles animaux a été essentiel dans la compréhension et/ou le traitement. Pour une description plus approfondie de la pathologie humaine, le lecteur est invité à se référer à d'excellentes revues [9-11] ainsi qu'à la banque de données OMIM¹ (numéro d'entrée dans le *tableau 1*).

¹ Online Mendelian Inheritance in Man

La formation des plaquettes

Différenciation et maturation du mégacaryocyte

Chez l'homme comme chez la souris, les plaquettes sanguines sont formées majoritairement à partir des cellules souches hématopoïétiques multipotentes (CSH) localisées au sein de la moelle osseuse. Le processus est complexe et passe par une succession d'étapes de prolifération, de différenciation et de maturation des mégacaryocytes à partir des CSH. Au cours de la maturation, les progéniteurs mégacaryocytaires subissent plusieurs cycles d'endomitose aboutissant à la formation de cellules géantes (> 50 µm) et de polyploïdes (pouvant aller jusqu'à 128N). En parallèle, le cytoplasme s'agrandit considérablement et un réseau de membranes internes extrêmement complexe et structuré se développe. Ce réseau, appelé système de membranes de démarcation (DMS pour *demarcation membrane system*), sert de réserve membranaire pour la formation de longues projections, appelées proplaquettes, qui, après libération dans la circulation, se remodeleront pour former les plaquettes (*figure 1*) [12, 13]. Les protéines du cytosquelette jouent un rôle clé dans l'extension des proplaquettes et la formation des plaquettes. C'est le cas des microtubules dont la polymérisation et le glissement conditionnent l'élongation des proplaquettes et la formation de plaquettes discoïdes [14-16]. L'actomyosine joue également un rôle clé dans la différenciation mégacaryocytaire et le nombre de proplaquettes libérées par mégacaryocyte [17-19]. Plusieurs types de thrombopénies congénitales résultent ainsi de mutations dans des gènes affectant directement ou indirectement le cytosquelette (*tableau 1*).

Régulation de la mégacaryopoïèse

La mégacaryopoïèse est régulée tout au long de ces différentes étapes, ce qui permet de contrôler la prolifération des progéniteurs, leur engagement et leur différenciation en mégacaryocytes matures et la libération des plaquettes. Ceci implique l'action concertée d'un certain nombre de facteurs parmi lesquels des cytokines et facteurs de croissance, dont la thrombopoïétine (TPO), qui joue un rôle majeur, ainsi qu'un certain nombre de facteurs de transcription (*figure 2*). Plusieurs de ces acteurs sont la cible de mutations responsables de thrombopénie (*tableau 1*). La TPO agit via le récepteur MPL, dont la signalisation aboutit à la modulation de l'expression des gènes impliqués en différents points du processus de différenciation/maturation mégacaryocytaire. Elle joue un rôle dans la survie des CSH, leur engagement et leur différenciation vers la voie mégacaryocytaire [20]. Il n'est donc pas étonnant que les patients présentant des mutations

Maladie (abréviation)	Transmission# N°OMIM	Gène (chromosome)	Symptômes (chiffre plaquettaire ± SD)(x10 ⁹ /L)	modèles murins
Anomalies du cytosquelette				
Maladies liées au MYH9 (MYH9-RD)	AD	MYH9 (22q12-13)	Plaquettes géantes (35 ± 25,9) Inclusions dans les leucocytes et/ou néphropathie, cataracte, surdité	Inactivation totale [27, 28] Inactivation tissu-spécifique [30] Knock-in [33, 34]
Syndrome Bernard-Soulier - Biallélique (AR) - Monoallélique(AD)	#231200 AR AD	GP1BA (17p13) GP1BB (22q11) GP9 (3q21)	Plaquettes géantes (41 ± 34,6) Grosses plaquettes (87 ± 30,2)	Inactivation totale <i>Gp1ba</i> [41] Inactivation totale <i>Gp1bb</i> [42, 43] Knock-in <i>Gp1ba</i> avec partie extracellulaire IL4R [46]
Syndrome Wiskott-Aldrich	Lié à l'X #301000 #313900	WAS (Xp11)	Petites plaquettes (61 ± 64,7) Immunodéficience sévère	Inactivation totale [59-61] Knock-in Y293 [53]
Thrombopénie liée à la filamine A	Liée à l'X #nd	FLNA (Xq28)	Grosses plaquettes (34 ± 12,7)	Inactivation tissu-spécifique [74]
Thrombopénie liée à la tubuline β1	AD #nd	TUBB1 (6p21.3)	Plaquettes géantes (82 ± 44,7)	Inactivation totale [77]
Thrombopénie liée à l'α-actinine	AD #nd	ACTN1 (14q24)	Grosses plaquettes (87 ± 31,7)	Pas de modèle murin
Mutations affectant la voie TPO-cMPL				
Thrombopénie congénitale amégacaryocytaire (CAMT)	AR #604498	MPL (1p34)	Plaquettes taille normale (13 ± 4,7) Evolution vers aplasie médullaire	Inactivation totale [83, 84] Inactivation tissu-spécifique [93]
Mutations affectant les facteurs de transcription				
Thrombopénies liées à GATA1	liées à l'X #300367 #314050	GATA1 (Xp11)	Grosses plaquettes (24 ± 9,8) Anémie	Inactivation totale [99] Knock-in d'une partie du promoteur (<i>Gata</i> ^{low}) [102]
Amégacaryocytose avec synostose radiocubitale	AD #605432	HOXA11 (7p15-14)	Plaquettes taille normale (30) Synostose radio-ulnaire ± autres défauts	Inactivation totale [111, 112]
Maladie familiale plaquettaire avec prédisposition à la leucémie myéloïde aiguë (FPD/AML)	AD #601399	RUNX1 (21q22)	Plaquettes de taille normale (103 ± 35,9) Développement possible de leucémie ou MDS	Inactivation totale [119, 120] Inactivation conditionnelle (<i>Mx-Cre</i>) [121-124] Inactivation conditionnelle (<i>Pf4-cre</i>) [128]
Syndrome de Paris-Trousseau Syndrome de Jacobsen	AD #188025 #600588 #147791	Délétion (11q23-ter) incluant <i>FLI-1</i>	Plaquettes de taille normale (49 ± 9,9)	Inactivation totale <i>Fli1</i> [131] Knock-in avec <i>Fli-1</i> tronqué [133]
Thrombopénie liée à <i>GF11B</i>	AD #nd	<i>GF11B</i> (9q34.13)	Grosses plaquettes (97 ± 24,7) Diminution du nombre de granules α	Inactivation totale [139] Inactivation conditionnelle (<i>Mx-cre</i>) [140] Inactivation conditionnelle (inductible par doxycycline) [140]
Autres mutations				
Syndrome des plaquettes grises	AR #139090	<i>NBEAL2</i> (3p21.1)	Thrombopénie qui s'aggrave avec l'âge (55 ± 21,3) Myélofibrose et splénomégalie	Inactivation totale [147-150]

(Suite)

Maladie (abréviation)	Transmission# N°OMIM	Gène (chromosome)	Symptômes (chiffre plaquettaire ± SD)(x10 ⁹ /L)	modèles murins
Thrombopénie liée à ANKRD26 / Thrombopénie familiale 2 (THC2)	AD #313900	ANKRD26 (10p2)	Plaquettes taille normale (43 ± 28,4) Développement possible de leucémie ou MDS	Inactivation totale [154, 156]
Thrombopénie avec absence de radius (TAR)	AR #274000	RBM8A (1q21.1)	Thrombopénie qui tend à se normaliser chez l'adulte (19) Plaquettes de taille normale Aplasie radiale bilatérale ± autres malformations	Pas de modèle murin

affectant la voie TPO-MPL développent soit une thrombopénie sévère, soit une thrombocytose, selon que la mutation entraîne une perte ou un gain de fonction. Les facteurs de transcription jouent un rôle essentiel tout au long de la mégacaryopoïèse, à la fois dans l'engagement des progéniteurs vers leur lignage et dans la régulation du programme transcriptionnel déterminant la maturation des mégacaryocytes [21]. Les mégacaryocytes dérivent d'un progéniteur bipotent mégacaryocytaire-érythrocytaire (MEP), nécessitant l'activation coordonnée de gènes spécifiquement mégacaryocytaires et l'inactivation des facteurs de transcription sélectifs de la lignée érythroïde (figure 2). Parmi les facteurs de transcription clés mutés dans certaines thrombopénies congénitales, on peut citer :

- GATA1 : les membres de la famille GATA qui sont des protéines à doigt de zinc, forment un complexe avec le facteur commun FOG1 (*friend of GATA1*). Un certain nombre de thrombopénies résultent de mutations dans le gène codant GATA1, et une mutation ponctuelle dans le site de liaison de GATA1 au niveau du promoteur du gène codant la GPIIb β (*GPIBB*) entraîne une forme de syndrome de Bernard et Soulier [22],
- RUNX1 (AML1), un facteur de transcription de la famille RUNT qui agit avec son cofacteur CBF β (*core-binding factor, β subunit*), joue également un rôle important dans la différenciation mégacaryocytaire à travers son rôle dans la régulation de l'expression de protéines du cytosquelette et de constituants plaquettaires. Certaines mutations dans

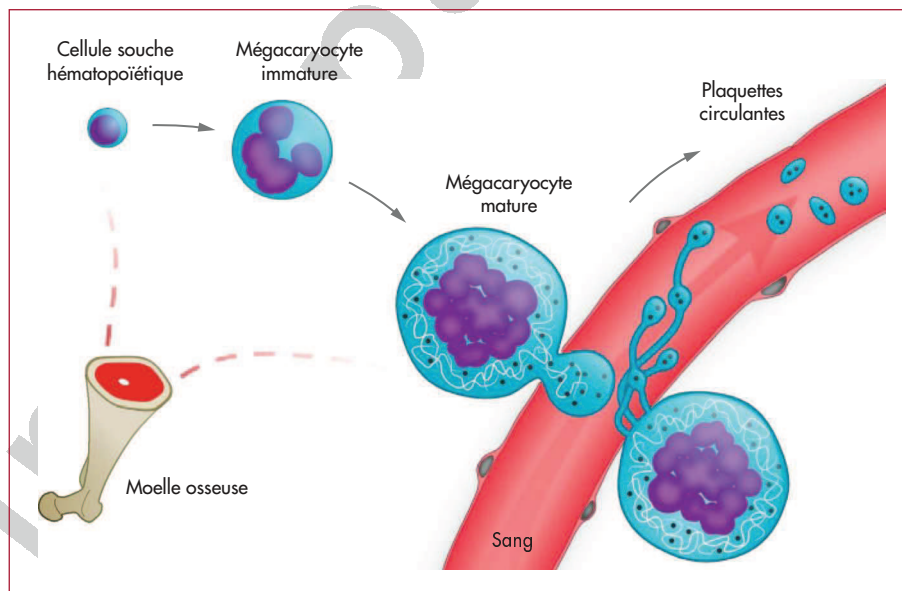


Figure 1. Schéma récapitulant les principales étapes de la mégacaryocytopoïèse. Après différenciation à partir de la cellule souche hématopoïétique, le mégacaryocyte subit une série d'endomitoses aboutissant à une cellule géante polyploïde. Le cytoplasme subit également une phase de maturation au cours de laquelle les granules sont synthétisés ainsi que les membranes internes qui s'organisent en un réseau complexe. Aux stades ultimes, le mégacaryocyte étend des projections cytoplasmiques dans le vaisseau sinusoïde pour y libérer les plaquettes. (Schéma de Fabien Pertuy).

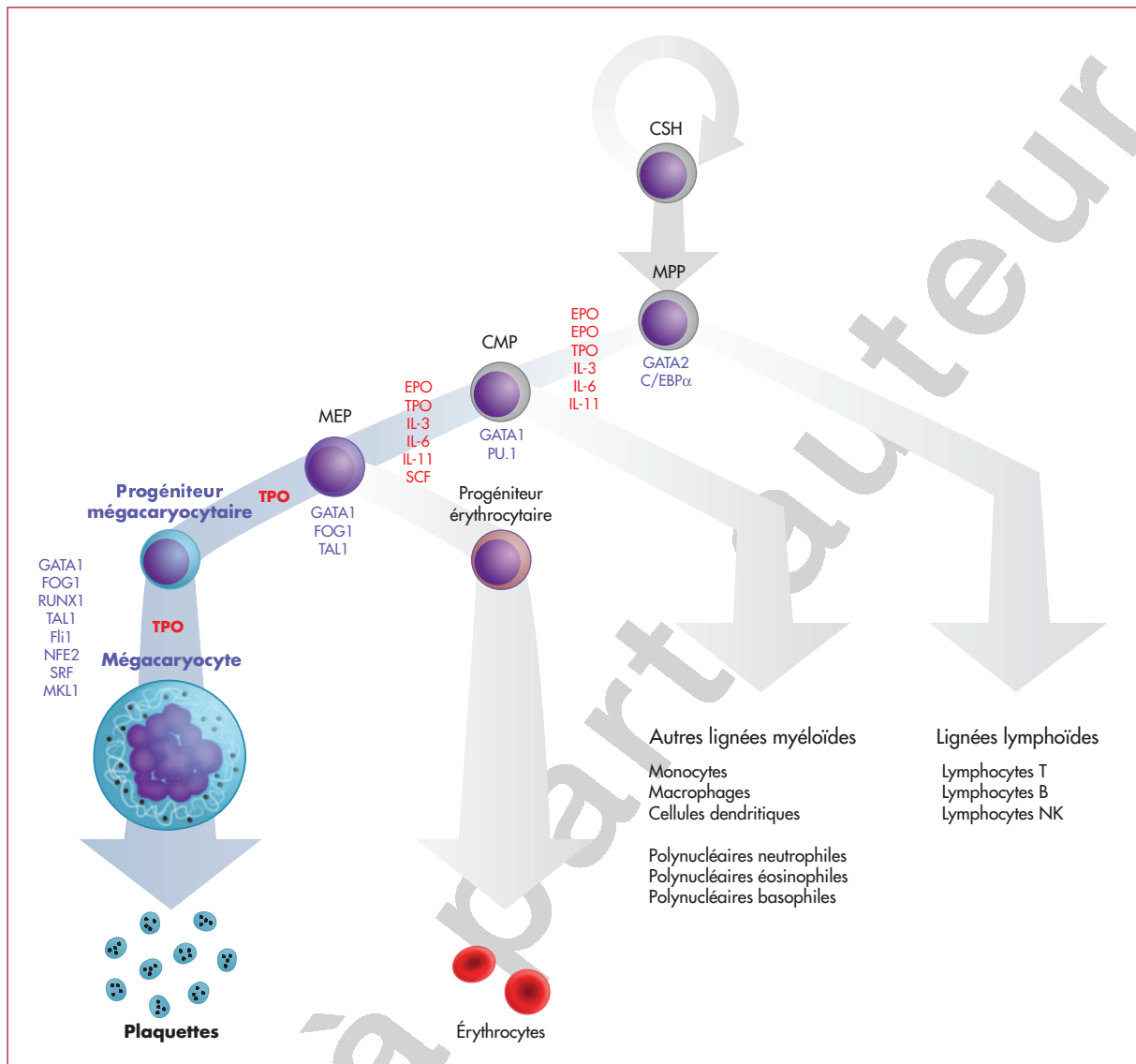


Figure 2. Hématopoïèse et engagement mégacaryocytaire. Schéma récapitulant les principales cytokines (rouge) et facteurs de transcription (bleu) régulant la mégacaryopoïèse, dont certains sont les cibles de mutations responsables de thrombopénie chez l'homme. MPP, MultiPotent Progenitor ; CMP, Common Myeloid Progenitor ; MEP, Megakaryocyte-Erythrocyte Progenitor. (Schéma de Fabien Pertuy).

RUNX1 aboutissent à une thrombopénie associée à un risque élevé de développer une myélodysplasie et une leucémie,

- *Fli-1*, un facteur de la famille ETS (*E26 transformation-specific or E-twenty six*) dont le site de liaison est présent dans la plupart des promoteurs mégacaryocytaires. Certaines mutations dans le gène *Fli-1* sont responsables des syndromes Paris-Trousseau et Jacobsen,
- *HOXA11*, membre de la famille des gènes homeobox, muté chez les patients présentant une amégacaryocytose avec synostose radio-cubitale.

Les gènes impliqués responsables de plusieurs thrombopénies ont ainsi été identifiés, et des modèles murins existent pour la plupart des maladies répertoriées à ce jour (tableau 1).

Mutations affectant le cytosquelette

Maladies liées au MYH9

Le gène *MYH9* code la chaîne lourde de la myosine non musculaire IIA (NMMHC-IIA, pour *non-muscle myosin*

heavy chain IIA) et les mutations présentes dans ce gène sont responsables de plusieurs syndromes comprenant l'anomalie de May-Hegglin, le syndrome de Sebastian, le syndrome de Fechtner, le syndrome d'Epstein et certaines présentations du syndrome d'Alport. Depuis le début des années deux mille, date de l'identification du gène responsable, ces maladies ont été collectivement renommées « syndrome MYH9 » et sont les causes les plus fréquentes de thrombopénies constitutionnelles. Il s'agit d'une maladie autosomale dominante, caractérisée par une thrombopénie associée à une macrocytose plaquettaire, et par la présence ou non de pseudo-corps de Döhle dans les leucocytes. Ces inclusions sont formées à partir d'agrégats de ribosomes et de myosine anormalement dimérisée. Selon le type de mutation, la macrothrombopénie peut s'accompagner de l'apparition progressive d'une insuffisance rénale, d'une cataracte et/ou d'une surdité neurosensorielle. La comparaison génotype-phénotype a permis de corréler la présence de mutations dans le domaine moteur N-terminal avec, d'une part, la probabilité de développer des manifestations non hématologiques et d'autre part avec la sévérité de la thrombopénie [23, 24]. Celle-ci est directement corrélée avec la sévérité des manifestations hémorragiques : faible dans la majorité des cas, mais pouvant aller, chez une minorité de patients, jusqu'à nécessiter une transfusion.

Il existe trois isoformes de myosine non musculaire de type II (IIA, IIB et IIC) mais seule la myosine IIA persiste dans les stades tardifs de différenciation mégacaryocytaire et dans les plaquettes, expliquant le phénotype plaquettaire congénital. Au cours de la différenciation mégacaryocytaire, l'expression de myosine IIB est normalement réprimée par le facteur de transcription RUNX1 [25]. La persistance de myosine IIB caractérise les patients thrombopéniques présentant des mutations dans RUNX1 [25, 26].

Plusieurs modèles de souris ont été développés pour étudier les maladies liées au MYH9 et le rôle possible de la myosine IIA dans leurs différentes manifestations. Les souris avec inactivation totale du gène *Myh9* (knock-out) ne sont pas viables à l'état homozygote et meurent au stade embryonnaire E7.5 malgré la présence de myosine IIB, confirmant un rôle unique des différentes isoformes de myosine II [27, 28]. L'absence de myosine IIA aux stades précoces du développement perturbe en particulier les jonctions serrées et les jonctions adhérentes, entraînant ainsi une désorganisation cellulaire de l'embryon [28]. Les souris hétérozygotes sont viables et se reproduisent quasi normalement [27, 28]. La macrothrombopénie n'est pas observée, ni le phénotype rénal, suggérant que l'haplo-insuffisance n'explique pas à elle seule la plupart des symptômes des patients. En revanche, un tiers des souris hétérozygotes développent une surdité mesurée par réponse auditive du tronc cérébral [27]. L'expression de

la myosine IIA dans l'oreille interne suggère un rôle de cette protéine dans le développement et le maintien de la fonction auditive [29].

L'inactivation du gène murin sélectivement dans la lignée mégacaryocyto-plaquettaire reproduit la macrothrombopénie présente chez les patients [30]. L'absence de myosine abolit le changement de forme contractile des plaquettes ainsi que la rétraction du caillot, avec pour conséquence *in vivo* une diminution de la stabilité du thrombus [30]. Par ailleurs, ce modèle a permis de proposer un certain nombre de pistes expliquant les anomalies de formation de plaquettes chez les patients MYH9. Une mortalité importante des mégacaryocytes au sein de la moelle ainsi qu'une anomalie de développement du système de démarcation membranaire (DMS pour *demarcation membrane system*) ne permettant pas une extension normale des proplaquettes expliquent vraisemblablement la thrombopénie [17, 18]. De manière moins attendue, ces souris ont également permis d'attribuer à la myosine un rôle dans la répartition des granules plaquettaires [31]. Enfin, une étude préclinique des effets à long terme du romiplostim, un agent thrombopoïétique de deuxième génération, a montré une augmentation de la myélofibrose secondaire au traitement chez les souris *Myh9*^{-/-} [32].

Le développement plus récent, par deux équipes indépendantes, de souris knock-in recréant des mutations présentes chez des patients permet maintenant de disposer de modèles se rapprochant davantage de la pathologie humaine [33, 34]. Dans les deux cas, les souris hétérozygotes développent, en sus de la macrothrombopénie, les manifestations non plaquettaires à savoir la présence d'agrégats intracytoplasmiques de myosine dans les leucocytes, une insuffisance rénale, une perte auditive et une cataracte. Toutefois, la corrélation génotype-phénotype observée chez l'homme n'est pas retrouvée dans ces modèles murins [33]. Malgré ces différences, ces souris restent d'excellents modèles pour étudier les mécanismes altérés dans les plaquettes des patients ainsi que les mécanismes physiopathologiques des défauts rénaux, auditifs et visuels.

Maladie de Bernard-Soulier

La maladie de Bernard-Soulier (BSS) est une maladie autosomale récessive dans sa forme classique, caractérisée par une thrombopénie et par la présence de plaquettes géantes. [35, 36]. Il existe également une forme mono-allélique dominante qui est habituellement plus modérée, avec une faible thrombopénie et des plaquettes de grande taille, mais pas ou peu de saignements [37]. La maladie résulte de mutations dans les gènes codant l'une des sous-unités du complexe GPIb-V-IX (*GP1BA*, *GP1BB*, ou *GP9*). Le complexe GPIb-V-IX est le récepteur du facteur Willebrand (vWF) qui joue un rôle clé dans les premières phases

d'adhésion des plaquettes au sous-endothélium lésé. Dans la forme classique biallélique, les mutations entraînent une quasi-absence d'expression du complexe en surface [36, 38], associant à la macrothrombopénie un défaut fonctionnel des plaquettes, d'où la sévérité de la maladie. La forme monoallélique entraîne une diminution d'expression d'environ 40 % et une altération modérée, voire nulle, de la fonction plaquettaire [37].

Alors que l'absence de complexe GPIb-V-IX explique le défaut fonctionnel des plaquettes, les mécanismes à l'origine de la macrothrombopénie ne sont pas totalement élucidés. Les études *in vitro* à partir de cultures de progéniteurs hématopoïétiques de patients mono- ou bialléliques suggèrent que la différenciation des mégacaryocytes n'est pas affectée. En revanche, la capacité de ces mégacaryocytes à former des proplaquettes est diminuée de 50 % dans la forme monoallélique [39], et une quasi-absence de proplaquettes est observée dans les cultures de progéniteurs de patients bialléliques, expliquant la thrombopénie [40].

Différents modèles de souris BSS ont été développés et ont permis d'avancer dans la compréhension des mécanismes sous-jacents qui mettraient en cause les protéines du cytosquelette. Parmi les modèles développés, l'inactivation totale du gène codant la GPIb α [41] ou la GPIb β [42, 43] reproduit le phénotype hémorragique ainsi que la macrothrombopénie et le défaut d'extension proplaquettaire. La diminution de formation des proplaquettes pourrait résulter en partie d'un défaut de maturation des mégacaryocytes, caractérisé notamment par des anomalies dans le développement du DMS observé dans les cellules *in situ* [41, 42, 44, 45]. Un troisième modèle murin a été généré par insertion d'un transgène correspondant à un récepteur chimérique composé d'une partie extracellulaire, le récepteur de l'interleukine 4 (IL-4), fusionnée à la partie transmembranaire et intracellulaire de la GPIb α [46]. Après croisement avec des souris déficientes en GPIb α , le complexe est capable de s'exprimer à la membrane. Le nombre de plaquettes circulantes est augmenté et la taille plaquettaire réduite en comparaison des souris *Gp1ba*^{-/-}. Ces données ont permis de suggérer un rôle important de la partie intracellulaire dans la régulation du nombre et de la taille des plaquettes, vraisemblablement par interaction avec le cytosquelette d'actine *via* la liaison de filamine A [46]. Des défauts d'organisation ou de dynamique du cytosquelette microtubulaire pourraient également rendre compte de la macrothrombopénie. En effet, l'absence du complexe entraîne une augmentation du nombre de microtubules dans les proplaquettes, ainsi qu'un surenroulement des spires de microtubules dans les plaquettes circulantes [45]. Enfin, les souris inactivées pour le gène *GP5* ont montré que cette sous-unité n'était pas nécessaire pour l'expression des autres sous-unités du complexe GPIb-IX ni pour ses fonctions principales, y compris la production

des plaquettes. Ceci explique probablement l'absence de patients BSS liés à un défaut de la GPV [47].

Les modèles de souris BSS ont également permis de réaliser des études précliniques. Les souris *Gp1bb*^{-/-} sont résistantes à la thrombose dans plusieurs modèles *in vitro* et *in vivo*, et la fonction procoagulante de leurs plaquettes est fortement diminuée [45, 48, 49]. Enfin, l'utilisation de souris *Gp1ba*^{-/-} et de souris transgéniques exprimant la GPIb α humaine a contribué à faire la preuve de concept qu'une maladie génétique plaquettaire pouvait être corrigée par thérapie génique [50, 51].

Syndrome de Wiskott-Aldrich et thrombopénie liée à l'X

Le syndrome de Wiskott-Aldrich (WAS) et la forme modérée dite « thrombopénie liée à l'X » (XLT pour *X-linked thrombocytopenia*) résultent de mutations mono- ou biallélique du gène *WAS*, localisé en Xp11.22, codant la protéine WASp (*Wiskott-Aldrich syndrome protein*). Les mutations non-sens, les insertions-délétions ou les mutations complexes aboutissent à une protéine tronquée, absente ou non fonctionnelle et entraînent un WAS sévère caractérisé par une thrombopénie associée à une apparition progressive de déficits immunitaires sévères et d'eczéma, et à une augmentation de l'incidence des maladies auto-immunes et malignes [52, 53]. Les mutations faux-sens aboutissent généralement au syndrome XLT [54, 55]. La protéine WASp est exprimée exclusivement dans les cellules hématopoïétiques et joue un rôle clé dans la régulation du cytosquelette intracellulaire. Son absence entraîne une thrombopénie sévère microcytaire (typiquement moins de 10 % de la numération plaquettaire normale), associée à des manifestations hémorragiques graves, les plus sévères étant des saignements intracrâniens, gastro-intestinaux et oraux, causes majeures de morbidité et de mortalité.

On a longtemps pensé que la thrombopénie résultait essentiellement d'une diminution de la durée de vie des plaquettes, qui est de moins de 24 h chez les patients et comparable à celle observée lors de la transfusion de plaquettes WAS chez des receveurs témoins [56, 57]. Le nombre des mégacaryocytes dans la moelle osseuse de patients est normal, voire augmenté, écartant l'hypothèse d'un défaut de production. Enfin, *in vitro*, les mégacaryocytes différenciés à partir de cellules CD34⁺ de patients ont une ultrastructure classique et une capacité à émettre des proplaquettes normales [58]. Les plaquettes produites en culture étant de taille normale, la microcytose observée chez les patients pourrait résulter de la réorganisation anormale du cytosquelette plaquettaire dans la circulation [58].

L'inactivation totale de *Was* dans la souris a permis d'éclaircir le rôle de Wasp et les conséquences de son

absence dans la formation des plaquettes. Le modèle murin reproduit la thrombopénie, modérée à sévère selon le fond génétique et les individus, bien que la microcytose soit absente [59-61]. Il a ainsi été montré que l'augmentation de la consommation plaquettaire en absence de la protéine résultait à la fois de facteurs intrinsèques aux plaquettes, et de facteurs extrinsèques en raison d'une susceptibilité accrue de ces souris à développer des anticorps anti-plaquettaires entraînant une phagocytose après opsonisation [59, 60].

En outre, l'absence de Wasp, en altérant la signalisation induite par l'interaction du collagène I avec l'intégrine $\alpha 2 \beta 1$, lève l'inhibition d'extension proplaquettaire médiée par le collagène I, ce qui aboutit à une libération ectopique des plaquettes dans le stroma médullaire [61]. Le développement de modèles murins knock-in a permis d'explorer les mécanismes d'activation et de stabilité de la protéine Wasp, à travers notamment le rôle important de la phosphorylation au site unique Y293 (l'équivalent murin du site Y291 chez l'homme) [53]. Ce site de phosphorylation joue un rôle critique dans l'activation de Wasp lors de nombreuses réponses cellulaires incluant la prolifération, la phagocytose et surtout l'assemblage de structures d'adhésion et la chimiotaxie [62]. La protéine Wasp, en relayant la signalisation induite par le collagène I et en favorisant la migration des mégacaryocytes vers les sinusoides, joue un rôle clé en prévenant la libération prématurée des plaquettes dans le compartiment médullaire.

Enfin, ces modèles de souris ont permis depuis une dizaine d'années de mener avec succès des essais précliniques de thérapie génique somatique, comme alternative à la transplantation. En effet, malgré les avancées dans le diagnostic, le pronostic des patients WAS reste sombre. Dans les cas modérés, une prise en charge par des transfusions en cas d'hémorragie sévère, associée à une splénectomie, peut suffire, mais l'allogreffe de CSH reste le traitement de choix pour les syndromes WAS/XLT. Des essais de transduction de CSH murins avec des vecteurs rétroviraux ou lentiviraux, codant la protéine Wasp, ont été effectués et suivis de transplantation en modèles murins *Was*^{-/-}. Les résultats ont montré une très bonne efficacité de transduction, une prise de greffe à long terme et l'expression du transgène dans les lignages lymphoïdes et myéloïdes. La greffe corrige notamment le déficit immunitaire, tout en diminuant la production d'autoanticorps [63-68]. Ces avancées, conjointement aux améliorations concernant les vecteurs et promoteurs de transcription, autorisent maintenant les premiers essais de thérapie génique comme traitement pour certains de ces patients [69, 70].

Thrombopénie liée à FLNA

La filamine A, codée par le gène *FLNA*, est une protéine de liaison à l'actine appartenant à la famille des filamines,

historiquement nommée ABP-280 (*actin-binding protein* 280). Les filamines sont de grosses protéines dimériques assurant le pontage et la stabilisation du réseau d'actine filamenteuse, l'ancrage de ce réseau aux glycoprotéines transmembranaires, notamment le complexe GPIb-V-IX et l'intégrine $\alpha \text{IIb} \beta 3$, et ont également la fonction de protéines d'échafaudage pour différents intermédiaires de signalisation [71]. Les mutations monoalléliques dans le gène *FLNA* entraînent, entre autres, des anomalies cérébrales, osseuses et cardiovasculaires [72]. Au niveau plaquettaire, on observe une macrocytose avec ou sans thrombopénie. Après différenciation de cellules CD34⁺ de patients *in vitro*, certains mégacaryocytes apparaissent dépourvus de filamine A avec une distribution anormale des granules et une apparente fragilité des structures [73]. Ces observations sont en accord avec les données obtenues dans un modèle de souris dépourvues de filamine A dans la lignée plaquettaire caractérisée par une macrothrombopénie sévère et une diminution du complexe GPIb-IX à la surface plaquettaire [74]. La thrombopénie résulte à la fois d'une clairance rapide des plaquettes, qui apparaissent plus fragiles, et d'une production plaquettaire inefficace. Les proplaquettes sont formées prématurément et libèrent de gros fragments. Ceux-ci se fragmentent à leur tour en plaquettes qui sont sujettes à une microvésiculation et sont rapidement éliminées de la circulation. Cette microvésiculation est due à une moindre stabilité des membranes, en lien possible avec une instabilité du réseau d'actine sous-membranaire [74].

Thrombopénie liée à la tubuline $\beta 1$

La tubuline $\beta 1$ est une isoforme exprimée majoritairement par les plaquettes sanguines. Des mutations dans le gène *TUBB1* ont été décrites pour deux familles [75, 76] mais n'ont pas encore été reproduites chez l'animal. Les patients présentent une macrothrombopénie associée à une diminution de la quantité de tubuline $\beta 1$ dans les plaquettes. Ces mutations entraîneraient une instabilité de la protéine et une incapacité à s'incorporer aux microtubules, avec pour conséquence une diminution de la quantité de mégacaryocytes formant des proplaquettes. L'importance de cette isoforme particulière de tubuline dans la formation des plaquettes avait été démontrée dans des souris inactivées pour le gène *Tubb1*. Ces souris ont une macrothrombopénie résultant d'un défaut de formation de proplaquettes, malgré la surexpression compensatoire de *Tubb2* et *Tubb5* [77]. L'absence de phénotype observé dans les souris hétérozygotes suggère que le phénotype des patients pourrait être lié à un effet dominant négatif. Un effet dominant négatif dû à une autre mutation entraînant une instabilité des microtubules a également été rapportée chez des chiens mutés dans la tubuline $\beta 1$ [78].

Mutations affectant la voie TPO-cMPL

Thrombopénie congénitale amégacaryocytaire

La thrombopénie congénitale amégacaryocytaire (CAMT, pour *congenital amegakaryocytic thrombocytopenia*) est la plus connue des thrombopénies amégacaryocytaires. Il s'agit d'une maladie autosomale récessive due à des mutations du gène *MPL* codant le récepteur de la TPO. Ce récepteur est présent sur les CSH, les mégacaryocytes et les plaquettes, et active différentes voies de signalisation en particulier Jak2/STAT, Ras/MAPK, et PI3K [20, 79]. La thrombopénie est sévère dès la naissance et évolue vers une aplasie médullaire durant la première année de vie, nécessitant impérativement la greffe de CSH. Il existe une corrélation claire entre le génotype et le phénotype. Les mutations non-sens et les délétions aboutissant à une protéine non fonctionnelle entraînent une forte thrombopénie, alors que les patients présentant une activité résiduelle du récepteur ont une thrombopénie moins sévère [80]. À l'inverse, des mutations *MPL* entraînant une activation constitutive du récepteur ou une diminution de la clairance de la TPO, ainsi que des mutations dans le gène *THPO* responsables d'une augmentation de traduction du gène, ont été identifiées dans certaines formes familiales de thrombocytémies essentielles [81, 82].

Les souris déficientes pour *Mpl* reproduisent partiellement le tableau clinique. Comme chez l'homme, la thrombopénie est sévère, mais on n'observe pas, en revanche, de pancytopenie malgré une diminution du nombre de cellules progénitrices des différents lignages hématopoïétiques [83, 84]. Des études ultérieures ont permis de montrer le rôle de la signalisation TPO-Mpl dans la régulation des CSH murines chez l'adulte [85], ainsi qu'au cours du développement lors de l'établissement de l'hématopoïèse définitive [86, 87]. La présence, même réduite, de plaquettes fonctionnelles dans les souris *Mpl*^{-/-} suggère l'existence d'autres facteurs impliqués dans la formation des plaquettes. Ces souris ont été un modèle extrêmement utile pour identifier ces facteurs. Différentes études ont montré que les interleukines IL-3, IL-5, IL-6, IL-11 et IL-17 ne sont pas impliquées dans la thrombopoïèse résiduelle [88-91]. En revanche, les chimiokines SDF-1 et FGF-4 favoriseraient la thrombopoïèse indépendamment de la TPO en permettant l'interaction des progéniteurs mégacaryocytaires avec la niche vasculaire [92]. Tout récemment, la génération de souris invalidées pour *Mpl* spécifiquement dans la lignée mégacaryocytaire a permis de montrer que le rôle clé de l'axe TPO-Mpl se situe au niveau des précurseurs mégacaryocytaires bipotents. En effet, la présence du récepteur MPL au niveau des mégacaryocytes n'est pas indispensable pour leur expansion, leur maturation ou la production des plaquettes, mais reste essentielle pour

réguler les concentrations locales et donc la disponibilité de la TPO dans le microenvironnement médullaire et éviter la myéloprolifération par surstimulation des progéniteurs [93]. Enfin, comme pour d'autres pathologies, les souris invalidées pour le gène *Mpl* constituent un outil de choix pour la mise en place d'une thérapie génique et la validation de nouveaux vecteurs [94, 95].

Mutations affectant les facteurs de transcription

Thrombopénies liées à GATA1

On distingue deux thrombopénies liées à GATA1 : l'anémie dysérythroïdétique avec thrombopénie (DAT) et la thrombopénie liée à l'X avec bêthallassémie (XLTT) [96]. Dans ces deux cas, les mutations de *GATA1* sont responsables de dysmégacaryopoïèse et dysérythroïdèse avec une anémie de degré variable et une macrothrombopénie, moins sévère dans XLTT. GATA1 est un facteur de transcription contrôlant l'expression de nombreux gènes impliqués dans la mégacaryopoïèse (*GPIBA*, *GPIIBB*, *PF4*, *MPL*, *NFE2*, etc.) ainsi que des gènes de la lignée érythroïde (*HBB*, *ALAS1*, *BCL2L1*) [97]. GATA1 comporte deux domaines en doigt de zinc, l'un en N-terminal (Nf) et l'autre en C-terminal (Cf). Le domaine Nf interagit à la fois avec FOG1 et avec l'ADN. La mutation responsable de XLTT affecte la liaison à l'ADN sans modifier l'interaction avec FOG1 [98], alors que les mutations impliquées dans DAT affectent la liaison à FOG1.

L'inactivation totale du gène chez la souris est létale au stade embryonnaire 10,5-11,5. Des études sur souris chimériques dérivant de cellules ES *Gata1*^{-/-} montrent une augmentation du nombre de mégacaryocytes dans le foie fœtal [99]. Des données similaires ont été rapportées dans un modèle de souris présentant une mutation ponctuelle induite par la N-nitroso-N-éthylurée (ENU) au niveau du codon initiateur (*Gata1*^{Plt13}), mimant les mutations présentes chez certains patients [100]. De plus, le développement de souris transgéniques portant des portions du gène suivies d'une séquence rapportrice a permis d'identifier les régions promotrices et la spécificité d'expression de *Gata1* au cours du développement [101]. Le remplacement ciblé d'une longue séquence en amont du locus *Gata1* incluant le promoteur distal a permis de générer une lignée murine viable, nommée *Gata1*^{low}, avec suppression d'expression spécifique dans les mégacaryocytes [102]. Ces souris présentent une thrombopénie sévère résultant d'un défaut de maturation des mégacaryocytes qui sont peu polyploïdes, présentent un DMS sous-développé aboutissant à un défaut de formation de proplaquettes, ainsi qu'un défaut de formation de granules [103]. Ces défauts sont associés à une réduction

de la transcription de gènes clés dans la maturation des mégacaryocytes (*Gp1ba*, *Gp1bb*, *Pf4*, *Mpl*, *Nfe2*) [103]. L'absence de Gata1 entraîne également une dérégulation du cycle cellulaire avec une hyperprolifération des mégacaryocytes. Avec l'âge, les souris Gata1^{low} développent alors un tableau clinique hématologique ressemblant à la myélofibrose idiopathique en plusieurs aspects [104]. Les souris Gata1^{low} représentent ainsi également un excellent modèle d'étude de cette pathologie [105].

Amégacaryocytose avec synostose radiocubitale

Ce syndrome congénital rare est caractérisé par une thrombopénie amégacaryocytaire sévère, présente dès la naissance, associée à une fusion proximale des radius et cubitus. La thrombopénie ne s'améliore pas avec l'âge, et les enfants peuvent également développer une insuffisance myéloïde nécessitant une greffe de moelle [106]. L'ensemble de ces symptômes se distingue des syndromes CAMT et TAR (*thrombocytopenia with absent radii*), et dans la plupart des cas des mutations dans le gène *HOXA11* ont été mises en évidence [106, 107]. *HOXA11* est un membre de la famille des gènes homeobox HOX, qui codent des facteurs de transcription. Ces protéines jouent un rôle important pendant le développement embryonnaire où leur expression est fortement régulée au niveau spatial et temporel [108, 109]. Au niveau hématopoïétique, *HOXA11* serait exprimé uniquement dans les précurseurs les plus précoces [110]. Des modèles murins inactivés pour le gène *Hoxa11* ont été développés mais n'ont pas permis l'étude des mécanismes impliqués dans la formation des plaquettes. Les souris hétérozygotes ou homozygotes *Hoxa11*^{-/-} présentent des malformations des membres inférieurs et postérieurs, en accord avec les observations chez les patients, mais la thrombopénie n'a jamais été rapportée [111, 112]. Pour l'heure, on ne sait donc pas si les défauts de mégacaryopoïèse présents chez les patients résultent ou non d'un effet dominant négatif de la mutation ponctuelle [107].

Maladie familiale plaquettaire avec prédisposition à la leucémie myéloïde aiguë

La maladie familiale plaquettaire avec prédisposition à la leucémie myéloïde aiguë (FPD/AML pour *familial platelet disorder/acute myeloid leukemia*) est la conséquence de mutations dans le gène *RUNX1* (appelé également *AML1* ou *CBFA2*). Il existe également une forme non héréditaire résultant de mutations somatiques dans *RUNX1*, responsable d'AML et de leucémie myélomonocytaire chronique. *RUNX1* code la sous-unité α du complexe de transcription CBF [113, 114]. L'hétérodimérisation de *RUNX1* avec CBF- β augmente son affinité pour l'ADN et le protège

d'une dégradation protéolytique [115]. Le facteur de transcription CBF régule l'expression de nombreux gènes spécifiques de l'hématopoïèse et est essentiel pour l'établissement de l'hématopoïèse définitive [116].

La plupart des mutations identifiées chez les patients entraînent une haplo-insuffisance, bien que quelques variants puissent agir par effet dominant-négatif [117]. Les patients présentent une thrombopénie, parfois associée à un défaut fonctionnel d'agrégation en réponse au collagène, ainsi qu'un risque accru de développer une leucémie myéloïde aiguë ou des syndromes myélodysplasiques (40 % des cas) [118].

L'inactivation totale de *Runx1* dans la souris est létale au stade embryonnaire 11,5-12,5 en raison d'hémorragies intracrâniennes. Ces souris ont néanmoins permis de montrer que *Runx1* est nécessaire pour le développement de l'hématopoïèse définitive au stade embryonnaire [119, 120]. Le développement de souris conditionnelles a permis d'inactiver le gène dans les souris adultes par croisement avec une souris exprimant la cre recombinase sous contrôle du promoteur *Mx1*. Dans ce cas, la perte de *Runx1* au stade adulte n'entraîne pas de perte totale d'hématopoïèse [121-124]. En revanche on observe une inhibition de la maturation des mégacaryocytes et des lymphocytes, en accord avec un rôle dans la maturation de ces cellules. Par ailleurs, la fraction de progéniteurs immatures est augmentée [121, 122], *Runx1* jouant un rôle de régulateur négatif des CSH quiescentes [125]. Il a été décrit que les progéniteurs hématopoïétiques des patients FPD/AML avaient une augmentation du potentiel clonogénique et dans certains cas des capacités d'auto-renouvellement aberrantes [126]. L'expansion de ces cellules immatures observées dans les souris déficientes pour *Runx1* pourrait ainsi être impliquée dans la pathogénèse des tumeurs hématologiques humaines associées à un défaut de *Runx1* [127].

Enfin, plus récemment, l'inactivation de *Runx1* durant la maturation mégacaryocytaire par croisement avec les souris *Pf4-cre* a montré l'importance de ce facteur dans la maturation des mégacaryocytes et a permis de faire une analyse génomique de l'expression des gènes contrôlés par *Runx1* dans les stades tardifs de la mégacaryocytopoïèse, apportant là encore des informations utiles à la compréhension de la pathologie [128].

Syndrome de Paris-Trousseau et Jacobsen

Le syndrome de Paris-Trousseau et le syndrome de Jacobsen, à transmission dominante, résultent d'une délétion partielle du bras long du chromosome 11 (11q23-ter) [129]. Environ 200 cas ont été décrits avec deux fois plus de femmes touchées que d'hommes. La distinction entre le syndrome de Paris-Trousseau et le syndrome de Jacobsen est basée sur la sévérité de la

maladie. Dans tous les cas la thrombopénie est présente, témoignant d'un défaut de maturation des mégacaryocytes avec de nombreux mégacaryocytes micro-cytaires immatures, hypolobulés et dystrophiques [130]. Ces patients souffrent également de dysmorphie faciale. Des symptômes additionnels peuvent être observés dans le cas du syndrome de Jacobsen, avec des anomalies cardiaques, rénales, gastro-intestinales et génitales, ainsi qu'un déficit intellectuel. La variabilité des symptômes est vraisemblablement corrélée avec le type de délétion. Celle-ci est variable en taille, pouvant atteindre 20 Mb. Le site de coupure est généralement localisé à l'intérieur ou à proximité de la sous-bande 11q23.3, et s'étend habituellement jusqu'au télomère. Cette région recouvre en particulier deux gènes codant des facteurs de transcription de la famille ETS : *ETS1* et *FLI1*.

L'étude d'un modèle de souris inactivée sur le gène *Ets-1* a permis de montrer que ce facteur de transcription n'est pas critique dans le processus de mégacaryopoïèse, alors que la différenciation de la lignée lymphoïde est fortement perturbée [131]. En revanche, l'étude de souris inactivées sur le gène *Fli1* a démontré la responsabilité de cette protéine dans ces syndromes par son implication dans la transactivation de gènes mégacaryocytaires. L'inactivation totale de *Fli1* entraîne une mortalité embryonnaire au stade E11.5, à la suite d'hémorragies intracrânielles [132]. L'absence de *Fli1* affecte à la fois la vasculogénèse et la mégacaryopoïèse. Comme chez les patients, on retrouve une anomalie morphologique des mégacaryocytes, caractéristique de mégacaryocytes immatures [132]. Toutefois, les souris hétérozygotes *Fli1*^{+/-} ne présentent aucun phénotype anormal, ce qui pose la question des mécanismes par lesquels l'haplo-insuffisance chez les patients entraîne les divers symptômes. Pour étudier le rôle des domaines fonctionnels de *Fli1*, des souris mutantes ont été générées, exprimant une forme tronquée, dépourvue du domaine régulateur C-terminal [133]. Les souris homozygotes ont une viabilité diminuée (30 % de survie à l'âge adulte), présentent une thrombopénie ainsi que des défauts fonctionnels, résultant notamment d'une diminution d'expression de gènes associés au développement mégacaryocytaire (*Mpl*, *Itga2b*, *Gp5*, *Gp9*, *Pf4*, *Nf-e2*, *MafG*, et *Rab27b*).

Thrombopénie liée à GFI1B

Très récemment, une mutation non-sens dans le gène *GFI1B* (pour *growth factor independent 1B*) a été mise en cause chez une famille présentant une forme autosomale dominante de syndrome des plaquettes grises [134]. Le gène *GFI1B* est un facteur de transcription contenant un domaine répresseur SNAG (SNAi1 Gfi1) en N-terminal [135] et six domaines conservés à doigts de zinc. Le domaine SNAG lui confère, entre autres, un rôle de répresseur

transcriptionnel [136]. La protéine GFI1B est exprimée dans les cellules hématopoïétiques et en particulier dans les érythrocytes et les mégacaryocytes [137]. La génération de souris rapportrices exprimant la protéine fluorescente GFP (pour *green fluorescent protein*) au locus *Gfi1b* (animaux *Gfi1b*^{+GFP}) a permis de montrer que l'expression de cette protéine au cours de l'hématopoïèse est inversement proportionnelle à l'expression d'une autre protéine de la même famille, Gfi. En particulier, *Gfi1b* est exprimée dans les cellules érythroïdes, les mégacaryocytes et leurs progéniteurs communs, le MEP (pour *megakaryocyte erythroid progenitor*) [138].

Chez l'homme, la mutation entraîne une protéine tronquée de ces quarante-quatre derniers acides aminés qui agirait comme dominant négatif vis-à-vis de la protéine normale. Comme pour le syndrome des plaquettes grises autosomal récessif (voir ci-après), la thrombopénie est associée à des plaquettes de grosses tailles, dépourvues, en partie ou totalement selon les patients, de granules alpha. Les saignements modérés à sévères ont été rapportés, pouvant en partie être attribués à une diminution d'expression de la GPIIb/IIIa. Au niveau médullaire, le développement de myélofibrose au stade I a été rapporté ainsi qu'une augmentation du nombre de mégacaryocytes pléomorphes en taille et forme, contenant peu de granules. Les mégacaryocytes, ainsi que les plaquettes, conservent une forte expression du marqueur de cellules souche CD34⁺.

Les études chez la souris ont montré le rôle de *Gfi1b* comme répresseur transcriptionnel agissant au niveau de l'érythropoïèse et de la mégacaryopoïèse au stade embryonnaire et adulte. La délétion totale du gène *Gfi1b* entraîne un arrêt du développement embryonnaire autour de E14,5, dû à un retard de maturation des érythrocytes primitifs, et un défaut de production d'érythrocytes anucléés définitifs, accompagné d'un défaut de différenciation de la lignée mégacaryocytaire [139]. La délétion d'un seul allèle n'entraîne aucune conséquence et les animaux hétérozygotes se développent normalement. Ces données indiquent que l'haplo-insuffisance ne serait pas responsable de la pathologie humaine, en accord avec un possible effet dominant négatif de la délétion. Par ailleurs, la génération de souris knock-out conditionnelles dans lesquelles la cre recombinase est sous contrôle du promoteur inducible Mx1 a permis de montrer le rôle clé de cette protéine dans la régulation de la dormance et de la prolifération des CSH adultes [140]. L'inactivation spécifique dans les érythrocytes (croisement avec les souris exprimant la cre recombinase sous contrôle du promoteur EpoR [récepteur de l'érythropoïétine]) montre un rôle de *Gfi1b* dans la différenciation des proérythroblastes en érythrocytes matures et dans l'extinction de l'expression des gènes codant la globine chez l'embryon et l'adulte [141]. Enfin, par croisement avec des souris exprimant la cre recombinase sous contrôle d'un

promoteur inductible à la doxycycline, Foudi *et al.* ont confirmé le rôle de répresseur transcriptionnel de l'érythropoïèse adulte et de la thrombopoïèse [142]. Au cours de la mégacaryopoïèse chez l'adulte, Gfi1b agit principalement comme un répresseur transcriptionnel entre le stade promégacaryocyte, après les endomitoses, et le stade mégacaryocyte, avant la maturation cytoplasmique [142].

Autres mutations

Syndrome des plaquettes grises

Le syndrome des plaquettes grises tire son nom de l'aspect grisé des plaquettes sur un frottis sanguin coloré au May-Grünwald-Giemsa, dû à l'absence de granules alpha. Il est caractérisé par une macrothrombopénie associée à une myélofibrose et une splénomégalie [143]. Cette maladie autosomale récessive est due à une mutation biallélique dans le gène *NBEAL2* (*neurobeachin-like 2*), les patients étant soit homozygotes, soit double hétérozygotes aboutissant à une perte de fonction de la protéine [144-146]. Les études chez les patients montrent que le nombre de mégacaryocytes est normal alors que la thrombopénie s'accroît avec l'âge. La survie diminuée des plaquettes de ces patients, associée au développement progressif de myélofibrose probablement dû à la libération prématurée de facteurs de croissance, pourrait expliquer ces observations [143, 144].

Récemment, trois modèles de souris inactivées pour le gène *Nbeal2* ont été générés [147-150]. Ces modèles reproduisent tous la macrothrombopénie ainsi que l'absence de granules alpha dans les plaquettes, mais des différences sont à noter. Le modèle développé par Kahr *et al.* [147] (modèle 1) présente également une splénomégalie à l'instar de la pathologie humaine, mais pas de myélofibrose. L'observation ultrastructurale des mégacaryocytes de ces souris montre des anomalies au niveau de la maturation des granules alpha avec une abondance de formes immatures, ainsi que dans le développement des membranes de démarcation. En culture, les mégacaryocytes dérivés de progéniteurs *Nbeal2*^{-/-} étendent moins de proplaquettes et sont très peu polyploïdes. Le facteur Willebrand est localisé de manière anormale en périphérie et peut être sécrété. L'ensemble de ces données a permis de suggérer que le développement normal des granules alpha contribue à la maturation des mégacaryocytes. Contrairement au modèle précédent, celui développé par Deppermann *et al.* [149] (modèle 2) ne présente pas ou peu de splénomégalie même chez les souris âgées. Les mégacaryocytes ont un développement des membranes de démarcation normal. Les granules alpha y sont absents, mais on note une augmentation du nombre de vacuoles et de mitochondries.

La formation des proplaquettes ainsi que la survie des plaquettes étant normale, les auteurs proposent que la thrombopénie résulte d'anomalies dans les étapes terminales de libération de plaquettes. Enfin, le modèle publié par Guerrero *et al.* [150] (modèle 3) développe à la fois la splénomégalie et la myélofibrose. *In situ*, les mégacaryocytes sont plus petits et globalement moins polylobés, et les observations ultrastructurales notent un système de membrane de démarcation un peu plus rudimentaire. La formation de proplaquettes, visualisée par adhésion de mégacaryocytes cultivés *in vitro* sur surface de fibrinogène, est similaire entre les deux génotypes. De manière étonnante, les granules alpha matures sont présents dans les mégacaryocytes *in situ*, ainsi que dans les boutons proplaquettaires de mégacaryocytes différenciés *in vitro*. Les auteurs suggèrent que le défaut de granules alpha plaquettaire résulterait d'une rétention anormale des granules, plutôt que d'une génération anormale. Dans le cas de ces trois modèles, il s'agit de délétion totale, les modèles 1 et 2 ayant en outre la même origine. Les différences observées, au moins entre les deux premiers modèles, pourraient rendre compte d'une hétérogénéité des souris, allié au fait que les effectifs utilisés sont relativement faibles, ou d'une différence de souche utilisée. On ne peut exclure également que les différences avec le modèle 3 résultent de la manière dont l'inactivation a été obtenue. Malgré ces différences, qui ne permettent pas de conclure définitivement quant au rôle exact de *Nbeal2* dans la formation des granules alpha et dans la thrombopénie, l'ensemble de ces données ont permis de formuler un certain nombre d'hypothèses. Les études devront être poursuivies afin de déterminer quels sont les mécanismes réellement affectés dans la pathologie humaine selon le type de mutation.

Thrombopénies liées à ANKRD26/ thrombopénie familiale 2

La thrombopénie familiale 2 (THC2) avec prédisposition aux leucémies est une forme rare de thrombopénie autosomale dominante [151, 152]. Les plaquettes sont normales d'un point de vue morphologique et fonctionnel, et la thrombopénie, modérée à sévère, entraîne des saignements modérés. La thrombopénie a été associée à un défaut de production de plaquettes au vu de la moelle des patients qui présentent une dysmégacaryopoïèse et des micromégacaryocytes [153]. Cette pathologie a été récemment associée à des mutations ponctuelles dans la partie non codante 5' du gène *ANKRD26* (*ankyrin repeat domain 26*) [153-155]. *ANKRD26* code une protéine de 192 kDa abondante dans différents tissus comme le cerveau, le foie, le tissu adipeux et les muscles squelettiques, mais aussi le tissu hématopoïétique. De manière intéressante, des souris *Ankrd26*^{-/-} développent une

obésité et un gigantisme liés à une hyperphagie mais ne présentent pas de thrombopénie, suggérant que l'haplo-insuffisance n'est pas responsable de la thrombopénie des patients [154, 156]. En accord avec ces observations, des données récentes ont montré que les mutations 5'UTR affectent la liaison des facteurs de transcription RUNX1 et FLI1, entraînant l'absence de répression du gène *ANKRD26* qui survient normalement pendant les stades tardifs de la mégacaryopoïèse [157]. La surexpression anormale de *ANKRD26* augmente la signalisation via l'axe TPO/cMPL, entraîne une signalisation anormale de la voie ERK/MAPK et en conséquence affecterait la formation des plaquettes [157].

Conclusion

Ces dernières années ont été marquées par des avancées majeures dans la compréhension des mécanismes normaux et pathologiques de la thrombopoïèse. L'apport des modèles animaux dans ce domaine a été important, non pas tant (à ce jour) par l'identification des gènes impliqués dans les thrombopénies que par la compréhension des mécanismes en jeu, par leur utilisation pour des études de structure-fonction après introduction de formes mutées, et enfin comme modèles précliniques pour tester de nouveaux médicaments ou développer les thérapies géniques.

Actuellement, l'origine de la thrombopénie reste inconnue dans 40 à 50 % des cas. Les nouvelles techniques de séquençage à haut débit et en particulier les séquençages d'exomes ou de génomes complets permettent maintenant d'identifier de nouveaux gènes candidats, à l'exemple de mutations rapportées récemment dans *ACTN1* [158, 159]. Ces nouveaux candidats seront à l'origine d'autant de modèles murins à venir. De manière complémentaire, les programmes de mutagenèse aléatoire dans la souris devraient également identifier de nouveaux gènes candidats impliqués dans des thrombopénies, avant d'être recherchés chez les patients.

Le modèle animal idéal reste bien évidemment le knock-in avec reproduction à l'identique de la mutation humaine lorsqu'elle est connue, à condition que le gène et la fonction soient conservés entre la souris et l'homme. La possibilité récente de générer des iPS permet l'obtention de cellules souches hématopoïétiques mutées à partir de fibroblastes de patients. La xénogreffe de ces cellules souches dans des souris immunodéficientes (NOD/SCID/ γ c) devrait permettre de mimer ou de reproduire la pathologie humaine, même lorsque le gène incriminé est inconnu. Cette stratégie, déjà utilisée dans le cas d'hémopathies malignes, permettra d'étudier les mécanismes anormaux dans la cellule d'intérêt (mégacaryocytes et plaquette) et d'évaluer de nouvelles approches thérapeutiques.

Dans certains cas, toutefois, le modèle murin ne reproduit pas l'intégralité des symptômes humains et peut même générer de nouvelles interrogations à l'instar des souris déficientes pour *Nbeal2*. La culture et la différenciation de mégacaryocytes humains *in vitro* restent absolument indispensables et totalement complémentaires des études observées chez l'animal et chez l'homme, *in vivo* et *in vitro*, qui permet les avancées majeures dans la compréhension des pathologies, et, par conséquent, également dans les connaissances des mécanismes normaux de la production des plaquettes.

Conflits d'intérêt : Aucun.

Références

- Balduini CL, Pecci A, Noris P. Inherited thrombocytopenias: the evolving spectrum. *Hamostaseologie* 2012 ; 32 : 259-70.
- Tiedt R, Schomber T, Hao-Shen H, Skoda RC. Pf4-Cre transgenic mice allow the generation of lineage-restricted gene knockouts for studying megakaryocyte and platelet function in vivo. *Blood* 2007 ; 109 : 1503-6.
- Pertuy F, Aguilar A, Strassel C, et al. Broader expression of the mouse platelet factor 4-cre transgene beyond the megakaryocyte lineage. *J Thromb Haemost* 2015 ; 13 : 115-25.
- Alexander WS, Viney EM, Zhang JG, et al. Thrombocytopenia and kidney disease in mice with a mutation in the *C1galt1* gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006 ; 103 : 16442-7.
- Anderson NM, Javadi M, Berndt E, et al. ENU mutagenesis identifies a novel platelet phenotype in a loss-of-function *Jak2* allele. *PLoS One* 2013 ; 8 : e75472.
- Carpinelli MR, Hilton DJ, Metcalf D, et al. Suppressor screen in *Mpl^{-/-}* mice: c-Myb mutation causes supraphysiological production of platelets in the absence of thrombopoietin signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004 ; 101 : 6553-8.
- Mason KD, Carpinelli MR, Fletcher JL, et al. Programmed anuclear cell death delimits platelet life span. *Cell* 2007 ; 128 : 1173-86.
- Gachet C, Hechler B, Leon C, Cazenave JP, Lanza F. Transgenic animals in primary hemostasis and thrombosis. In: Offermanns S, Hein L, editors. *Handbook of experimental pharmacology Transgenic models in pharmacology*. Berlin : Springer Verlag; 2004.
- Kumar R, Kahr WH. Congenital thrombocytopenia: clinical manifestations, laboratory abnormalities, and molecular defects of a heterogeneous group of conditions. *Hematol Oncol Clin North Am* 2013 ; 27 : 465-94.
- Balduini CL, Savoia A, Seri M. Inherited thrombocytopenias frequently diagnosed in adults. *J Thromb Haemost* 2013 ; 11 : 1006-19.
- Pecci A, Balduini CL. Lessons in platelet production from inherited thrombocytopenias. *Br J Haematol* 2014 ; 165 : 179-92.
- Italiano Jr JE. Unraveling mechanisms that control platelet production. *Semin Thromb Hemost* 2013 ; 39 : 15-24.
- Malara A, Balduini A. Blood platelet production and morphology. *Thromb Res* 2012 ; 129 : 241-4.
- Bender M, Thon JN, Ehrlicher AJ, et al. Microtubule sliding drives proplatelet elongation and is dependent on cytoplasmic dynein. *Blood* 2015 ; 125 : 860-8.
- Patel-Hett S, Richardson JL, Schulze H, et al. Visualization of microtubule growth in living platelets reveals a dynamic marginal band with multiple microtubules. *Blood* 2008 ; 111 : 4605-16.
- Tablin F, Castro M, Leven RM. Blood platelet formation in vitro. The role of the cytoskeleton in megakaryocyte fragmentation. *J Cell Sci* 1990 ; 97 (Pt 1) : 59-70.
- Eckly A, Rinckel JY, Laeuffer P, et al. Proplatelet formation deficit and megakaryocyte death contribute to thrombocytopenia in *Myh9* knock-out mice. *J Thromb Haemost* 2010 ; 8 : 2243-51.

18. Eckly A, Strassel C, Freund M, *et al.* Abnormal megakaryocyte morphology and proplatelet formation in mice with megakaryocyte-restricted MYH9 inactivation. *Blood* 2009 ; 113 : 3182-9.
19. Italiano Jr JE, Lecine P, Shivdasani RA, Hartwig JH. Blood platelets are assembled principally at the ends of proplatelet processes produced by differentiated megakaryocytes. *J Cell Biol* 1999 ; 147 : 1299-312.
20. Hitchcock IS, Kaushansky K. Thrombopoietin from beginning to end. *Br J Haematol* 2014 ; 165 : 259-68.
21. Tijssen MR, Ghevaert C. Transcription factors in late megakaryopoiesis and related platelet disorders. *J Thromb Haemost* 2013 ; 11 : 593-604.
22. Ludlow LB, Schick BP, Budarf ML, *et al.* Identification of a mutation in a GATA binding site of the platelet glycoprotein Ibbeta promoter resulting in the Bernard-Soulier syndrome. *J Biol Chem* 1996 ; 271 : 22076-80.
23. Pecci A, Klersy C, Gresele P, *et al.* MYH9-related disease: a novel prognostic model to predict the clinical evolution of the disease based on genotype-phenotype correlations. *Hum Mutat* 2014 ; 35 : 236-47.
24. Pecci A, Panza E, Pujol-Moix N, *et al.* Position of nonmuscle myosin heavy chain IIA (NMHC-IIA) mutations predicts the natural history of MYH9-related disease. *Hum Mutat* 2008 ; 29 : 409-17.
25. Lordier L, Bluteau D, Jalil A, *et al.* RUNX1-induced silencing of non-muscle myosin heavy chain IIB contributes to megakaryocyte polyploidization. *Nat Commun* 2012 ; 3 : 717.
26. Antony-Debre I, Bluteau D, Itzykson R, *et al.* MYH10 protein expression in platelets as a biomarker of RUNX1 and FLI1 alterations. *Blood* 2012 ; 120 : 2719-22.
27. Matsushita T, Hayashi H, Kunishima S, *et al.* Targeted disruption of mouse ortholog of the human MYH9 responsible for macrothrombocytopenia with different organ involvement: hematological, nephrological, and otological studies of heterozygous KO mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2004 ; 325 : 1163-71.
28. Conti MA, Even-Ram S, Liu C, Yamada KM, Adelstein RS. Defects in cell adhesion and the visceral endoderm following ablation of nonmuscle myosin heavy chain II-A in mice. *J Biol Chem* 2004 ; 279 : 41263-6.
29. Mhatre AN, Li J, Kim Y, Coling DE, Lalwani AK. Cloning and developmental expression of nonmuscle myosin IIA (Myh9) in the mammalian inner ear. *J Neurosci Res* 2004 ; 76 : 296-305.
30. Leon C, Eckly A, Hechler B, *et al.* Megakaryocyte-restricted MYH9 inactivation dramatically affects hemostasis while preserving platelet aggregation and secretion. *Blood* 2007 ; 110 : 3183-91.
31. Pertuy F, Eckly A, Weber J, *et al.* Myosin IIA is critical for organelle distribution and F-actin organization in megakaryocytes and platelets. *Blood* 2014 ; 123 : 1261-9.
32. Leon C, Evert K, Dombrowski F, *et al.* Romiplostim administration shows reduced megakaryocyte response-capacity and increased myelofibrosis in a mouse model of MYH9-RD. *Blood* 2012 ; 119 : 3333-41.
33. Zhang Y, Conti MA, Malide D, *et al.* Mouse models of MYH9-related disease: mutations in nonmuscle myosin II-A. *Blood* 2012 ; 119 : 238-50.
34. Suzuki N, Kunishima S, Ikejiri M, *et al.* Establishment of mouse model of MYH9 disorders: heterozygous R702C mutation provokes macrothrombocytopenia with leukocyte inclusion bodies, renal glomerulosclerosis and hearing disability. *PLoS One* 2013 ; 8 : e71187.
35. Andrews RK, Berndt MC. Bernard-Soulier syndrome: an update. *Semin Thromb Hemost* 2013 ; 39 : 656-62.
36. Lanza F. Bernard-Soulier syndrome (hemorrhagic platelet thrombocytic dystrophy). *Orphanet J Rare Dis* 2006 ; 1 : 46.
37. Noris P, Perrotta S, Bottega R, *et al.* Clinical and laboratory features of 103 patients from 42 Italian families with inherited thrombocytopenia derived from the monoallelic Ala156Val mutation of GPIIb/IIIa (Bologna mutation). *Haematologica* 2012 ; 97 : 82-8.
38. Savoia A, Kunishima S, De Rocco D, *et al.* Spectrum of the mutations in Bernard-Soulier syndrome. *Hum Mutat* 2014 ; 35 : 1033-45.
39. Balduini A, Malara A, Pecci A, *et al.* Proplatelet formation in heterozygous Bernard-Soulier syndrome type Bologna. *J Thromb Haemost* 2009 ; 7 : 478-84.
40. Balduini A, Malara A, Balduini CL, Noris P. Megakaryocytes derived from patients with the classical form of Bernard-Soulier syndrome show no ability to extend proplatelets in vitro. *Platelets* 2011 ; 22 : 308-11.
41. Ware J, Russell S, Ruggeri ZM. Generation and rescue of a murine model of platelet dysfunction: the Bernard-Soulier syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000 ; 97 : 2803-8.
42. Kato K, Martinez C, Russell S, *et al.* Genetic deletion of mouse platelet glycoprotein Ibbeta produces a Bernard-Soulier phenotype with increased alpha-granule size. *Blood* 2004 ; 104 : 2339-44.
43. Strassel C, Nonne C, Eckly A, *et al.* Decreased thrombotic tendency in mouse models of the Bernard-Soulier syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007 ; 27 : 241-7.
44. Poujol C, Ware J, Nieswandt B, Nurden AT, Nurden P. Absence of GPIIb/IIIa is responsible for aberrant membrane development during megakaryocyte maturation: ultrastructural study using a transgenic model. *Exp Hematol* 2002 ; 30 : 352-60.
45. Strassel C, Eckly A, Leon C, *et al.* Intrinsic impaired proplatelet formation and microtubule coil assembly of megakaryocytes in a mouse model of Bernard-Soulier syndrome. *Haematologica* 2009 ; 94 : 800-10.
46. Kanaji T, Russell S, Ware J. Amelioration of the macrothrombocytopenia associated with the murine Bernard-Soulier syndrome. *Blood* 2002 ; 100 : 2102-7.
47. Lanza F. Platelet glycoprotein V: a thrombin substrate marker of thrombosis and of megakaryocyte differentiation. *Hematologie* 2000 ; 6 : 424-31.
48. Joglekar MV, Ware J, Xu J, Fitzgerald ME, Gartner TK. Platelets, glycoprotein Ib-IX, and von Willebrand factor are required for FeCl(3)-induced occlusive thrombus formation in the inferior vena cava of mice. *Platelets* 2013 ; 24 : 205-12.
49. Ravanat C, Strassel C, Hechler B, *et al.* A central role of GPIb-IX in the procoagulant function of platelets that is independent of the 45-kDa GPIIb/IIIa N-terminal extracellular domain. *Blood* 2010 ; 116 : 1157-64.
50. Kanaji S, Fahs SA, Ware J, Montgomery RR, Shi Q. Non-myeloablative conditioning with busulfan before hematopoietic stem cell transplantation leads to phenotypic correction of murine Bernard-Soulier syndrome. *J Thromb Haemost* 2014 ; 12 : 1726-32.
51. Kanaji S, Kuether EL, Fahs SA, *et al.* Correction of murine Bernard-Soulier syndrome by lentivirus-mediated gene therapy. *Mol Ther* 2012 ; 20 : 625-32.
52. Buchbinder DJ, Nugent DJ, Fillipovich AH. Wiskott-Aldrich syndrome: diagnosis, current management, and emerging treatments. *Appl Clin Genet* 2014 ; 7 : 55-66.
53. Massaad MJ, Ramesh N, Geha RS. Wiskott-Aldrich syndrome: a comprehensive review. *Ann N Y Acad Sci* 2013 ; 1285 : 26-43.
54. Ochs HD. Mutations of the Wiskott-Aldrich Syndrome Protein affect protein expression and dictate the clinical phenotypes. *Immunol Res* 2009 ; 44 : 84-8.
55. Shcherbina A, Rosen FS, Remold-O'Donnell E. WASP levels in platelets and lymphocytes of wiskott-aldrich syndrome patients correlate with cell dysfunction. *J Immunol* 1999 ; 163 : 6314-20.
56. Baldini MG. Nature of the platelet defect in the Wiskott-Aldrich syndrome. *Ann N Y Acad Sci* 1972 ; 201 : 437-44.
57. Burns S, Cory GO, Vainchenker W, Thrasher AJ. Mechanisms of WASP-mediated hematologic and immunologic disease. *Blood* 2004 ; 104 : 3454-62.
58. Haddad E, Cramer E, Riviere C, *et al.* The thrombocytopenia of Wiskott Aldrich syndrome is not related to a defect in proplatelet formation. *Blood* 1999 ; 94 : 509-18.
59. Marathe BM, Prisolovsky A, Astrakhan A, Rawlings DJ, Wan JY, Strom TS. Antiplatelet antibodies in WASP(-) mice correlate with evidence of increased in vivo platelet consumption. *Exp Hematol* 2009 ; 37 : 1353-63.
60. Prisolovsky A, Marathe B, Hosni A, *et al.* Rapid platelet turnover in WASP(-) mice correlates with increased ex vivo phagocytosis of opsonized WASP(-) platelets. *Exp Hematol* 2008 ; 36 : 609-23.
61. Sabri S, Foudi A, Boukour S, *et al.* Deficiency in the Wiskott-Aldrich protein induces premature proplatelet formation and platelet production in the bone marrow compartment. *Blood* 2006 ; 108 : 134-40.

62. Blundell MP, Bouma G, Metelo J, et al. Phosphorylation of WASp is a key regulator of activity and stability in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009 ; 106 : 15738-43.
63. Blundell MP, Bouma G, Calle Y, Jones GE, Kinnon C, Thrasher AJ. Improvement of migratory defects in a murine model of Wiskott-Aldrich syndrome gene therapy. *Mol Ther* 2008 ; 16 : 836-44.
64. Bosticardo M, Draghici E, Schena F, et al. Lentiviral-mediated gene therapy leads to improvement of B-cell functionality in a murine model of Wiskott-Aldrich syndrome. *J Allergy Clin Immunol* 2011 ; 127 : 1376-84 e5.
65. Catucci M, Prete F, Bosticardo M, et al. Dendritic cell functional improvement in a preclinical model of lentiviral-mediated gene therapy for Wiskott-Aldrich syndrome. *Gene Ther* 2012 ; 19 : 1150-8.
66. Charrier S, Stockholm D, Seye K, et al. A lentiviral vector encoding the human Wiskott-Aldrich syndrome protein corrects immune and cytoskeletal defects in WASP knock-out mice. *Gene Ther* 2005 ; 12 : 597-606.
67. Dupre L, Marangoni F, Scaramuzza S, et al. Efficacy of gene therapy for Wiskott-Aldrich syndrome using a WAS promoter/cDNA-containing lentiviral vector and nonlethal irradiation. *Hum Gene Ther* 2006 ; 17 : 303-13.
68. Astrakhan A, Sather BD, Ryu BY, et al. Ubiquitous high-level gene expression in hematopoietic lineages provides effective lentiviral gene therapy of murine Wiskott-Aldrich syndrome. *Blood* 2012 ; 119 : 4395-407.
69. Hacein-Bey Abina S, Gaspar HB, Blondeau J, et al. Outcomes following gene therapy in patients with severe Wiskott-Aldrich syndrome. *JAMA* 2015 ; 313 : 1550-63.
70. Bosticardo M, Ferrua F, Cavazzana M, Aiuti A. Gene therapy for Wiskott-Aldrich Syndrome. *Curr Gene Ther* 2014 ; 14 : 413-21.
71. Falet H. New insights into the versatile roles of platelet FlnA. *Platelets* 2013 ; 24 : 1-5.
72. Zhou X, Boren J, Akyurek LM. Filamins in cardiovascular development. *Trends Cardiovasc Med* 2007 ; 17 : 222-9.
73. Nurden P, Debili N, Coupry I, et al. Thrombocytopenia resulting from mutations in filamin A can be expressed as an isolated syndrome. *Blood* 2011 ; 118 : 5928-37.
74. Jurak Begonja A, Hoffmeister KM, Hartwig JH, Falet H. FlnA-null megakaryocytes prematurely release large and fragile platelets that circulate poorly. *Blood* 2011 ; 118 : 2285-95.
75. Kunishima S, Kobayashi R, Itoh TJ, Hamaguchi M, Saito H. Mutation of the beta1-tubulin gene associated with congenital macrothrombocytopenia affecting microtubule assembly. *Blood* 2009 ; 113 : 458-61.
76. Kunishima S, Nishimura S, Suzuki H, Imaizumi M, Saito H. TUBB1 mutation disrupting microtubule assembly impairs proplatelet formation and results in congenital macrothrombocytopenia. *Eur J Haematol* 2014 ; 92 : 276-82.
77. Schwer HD, Lecine P, Tiwari S, Italiano Jr JE, Hartwig JH, Shivdasani RA. A lineage-restricted and divergent beta-tubulin isoform is essential for the biogenesis, structure and function of blood platelets. *Curr Biol* 2001 ; 11 : 579-86.
78. Davis B, Toivio-Kinnucan M, Schuller S, Boudreaux MK. Mutation in beta1-tubulin correlates with macrothrombocytopenia in Cavalier King Charles Spaniels. *J Vet Intern Med* 2008 ; 22 : 540-5.
79. Deutsch VR, Tomer A. Advances in megakaryocytopoiesis and thrombopoiesis: from bench to bedside. *Br J Haematol* 2013 ; 161 : 778-93.
80. Ballmaier M, Germeshausen M. Congenital amegakaryocytic thrombocytopenia: clinical presentation, diagnosis, and treatment. *Semin Thromb Hemost* 2011 ; 37 : 673-81.
81. Skoda RC. Hereditary myeloproliferative disorders. *Haematologica* 2010 ; 95 : 6-8.
82. Teofilii L, Larocca LM. Advances in understanding the pathogenesis of familial thrombocythaemia. *Br J Haematol* 2011 ; 152 : 701-12.
83. Alexander WS, Roberts AW, Maurer AB, Nicola NA, Dunn AR, Metcalf D. Studies of the c-Mpl thrombopoietin receptor through gene disruption and activation. *Stem Cells* 1996 ; 14 (Suppl 1) : 124-32.
84. Alexander WS, Roberts AW, Nicola NA, Li R, Metcalf D. Deficiencies in progenitor cells of multiple hematopoietic lineages and defective megakaryocytopoiesis in mice lacking the thrombopoietic receptor c-Mpl. *Blood* 1996 ; 87 : 2162-70.
85. Kimura S, Roberts AW, Metcalf D, Alexander WS. Hematopoietic stem cell deficiencies in mice lacking c-Mpl, the receptor for thrombopoietin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998 ; 95 : 1195-200.
86. Petit-Cocault L, Volle-Challier C, Fleury M, Peault B, Souyri M. Dual role of Mpl receptor during the establishment of definitive hematopoiesis. *Development* 2007 ; 134 : 3031-40.
87. Fleury M, Petit-Cocault L, Clay D, Souyri M. Mpl receptor defect leads to earlier appearance of hematopoietic cells/hematopoietic stem cells in the Aorta-Gonad-Mesonephros region, with increased apoptosis. *Int J Dev Biol* 2010 ; 54 : 1067-74.
88. Chen Q, Solar G, Eaton DL, de Sauvage FJ. IL-3 does not contribute to platelet production in c-Mpl-deficient mice. *Stem Cells* 1998 ; 16 (Suppl 2) : 31-6.
89. Scott CL, Robb L, Mansfield R, Alexander WS, Begley CG. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor is not responsible for residual thrombopoiesis in mpl null mice. *Exp Hematol* 2000 ; 28 : 1001-7.
90. Gainsford T, Nandurkar H, Metcalf D, Robb L, Begley CG, Alexander WS. The residual megakaryocyte and platelet production in c-mpl-deficient mice is not dependent on the actions of interleukin-6, interleukin-11, or leukemia inhibitory factor. *Blood* 2000 ; 95 : 528-34.
91. Tan W, Liu B, Barsoum A, Huang W, Kolls JK, Schwarzenberger P. Requirement of TPO/c-mpl for IL-17A-induced granulopoiesis and megakaryopoiesis. *J Leukoc Biol* 2013 ; 94 : 1303-8.
92. Avezilla ST, Hattori K, Heissig B, et al. Chemokine-mediated interaction of hematopoietic progenitors with the bone marrow vascular niche is required for thrombopoiesis. *Nat Med* 2004 ; 10 : 64-71.
93. Ng AP, Kauppi M, Metcalf D, et al. Mpl expression on megakaryocytes and platelets is dispensable for thrombopoiesis but essential to prevent myeloproliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014 ; 111 : 5884-9.
94. Heckl D, Wicke DC, Brugman MH, et al. Lentiviral gene transfer regenerates hematopoietic stem cells in a mouse model for Mpl-deficient aplastic anemia. *Blood* 2011 ; 117 : 3737-47.
95. Wicke DC, Meyer J, Buesche G, et al. Gene therapy of MPL deficiency: challenging balance between leukemia and pancytopenia. *Mol Ther* 2010 ; 18 : 343-52.
96. Ciovacco WA, Raskind WH, Kacena MA. Human phenotypes associated with GATA-1 mutations. *Gene* 2008 ; 427 : 1-6.
97. Millikan PD, Balamohan SM, Raskind WH, Kacena MA. Inherited thrombocytopenia due to GATA-1 mutations. *Semin Thromb Hemost* 2011 ; 37 : 682-9.
98. Balduini CL, Pecci A, Loffredo G, et al. Effects of the R216Q mutation of GATA-1 on erythropoiesis and megakaryocytopoiesis. *Thromb Haemost* 2004 ; 91 : 129-40.
99. Pevny L, Lin CS, D'Agati V, Simon MC, Orkin SH, Costantini F. Development of hematopoietic cells lacking transcription factor GATA-1. *Development* 1995 ; 121 : 163-72.
100. Majewski IJ, Metcalf D, Mielke LA, et al. A mutation in the translation initiation codon of Gata-1 disrupts megakaryocyte maturation and causes thrombocytopenia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006 ; 103 : 14146-51.
101. McDevitt MA, Shivdasani RA, Fujiwara Y, Yang H, Orkin SH. A "knockdown" mutation created by cis-element gene targeting reveals the dependence of erythroid cell maturation on the level of transcription factor GATA-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997 ; 94 : 6781-5.
102. Shivdasani RA, Fujiwara Y, McDevitt MA, Orkin SH. A lineage-selective knock-out establishes the critical role of transcription factor GATA-1 in megakaryocyte growth and platelet development. *EMBO J* 1997 ; 16 : 3965-73.
103. Vyas P, Ault K, Jackson CW, Orkin SH, Shivdasani RA. Consequences of GATA-1 deficiency in megakaryocytes and platelets. *Blood* 1999 ; 93 : 2867-75.
104. Vannucchi AM, Bianchi L, Cellai C, et al. Development of myelofibrosis in mice genetically impaired for GATA-1 expression (GATA-1(low) mice). *Blood* 2002 ; 100 : 1123-32.

105. Shivdasani R. An animal model for myelofibrosis. *Blood* 2002 ; 100 : 1109.
106. Castillo-Caro P, Dhanraj S, Haut P, Robertson K, Dror Y, Sharathkumar AA. Proximal radio-ulnar synostosis with bone marrow failure syndrome in an infant without a HOXA11 mutation. *J Pediatr Hematol Oncol* 2010 ; 32 : 479-85.
107. Thompson AA, Nguyen LT. Amegakaryocytic thrombocytopenia and radio-ulnar synostosis are associated with HOXA11 mutation. *Nat Genet* 2000 ; 26 : 397-8.
108. Rezsohazy R, Saurin AJ, Maurel-Zaffran C, Graba Y. Cellular and molecular insights into Hox protein action. *Development* 2015 ; 142 : 1212-27.
109. Quinonez SC, Innis JW. Human HOX gene disorders. *Mol Genet Metab* 2014 ; 111 : 4-15.
110. Horvat-Switzer RD, Thompson AA. HOXA11 mutation in amegakaryocytic thrombocytopenia with radio-ulnar synostosis syndrome inhibits megakaryocytic differentiation in vitro. *Blood Cells Mol Dis* 2006 ; 37 : 55-63.
111. Connell KA, Guess MK, Chen H, Andikyan V, Bercik R, Taylor HS. HOXA11 is critical for development and maintenance of uterosacral ligaments and deficient in pelvic prolapse. *J Clin Invest* 2008 ; 118 : 1050-5.
112. Small KM, Potter SS. Homeotic transformations and limb defects in Hox A11 mutant mice. *Genes Dev* 1993 ; 7 : 2318-28.
113. Osato M. Point mutations in the RUNX1/AML1 gene: another actor in RUNX leukemia. *Oncogene* 2004 ; 23 : 4284-96.
114. Owen C. Insights into familial platelet disorder with propensity to myeloid malignancy (FPD/AML). *Leuk Res* 2010 ; 34 : 141-2.
115. Song WJ, Sullivan MG, Legare RD, et al. Haploinsufficiency of CBFA2 causes familial thrombocytopenia with propensity to develop acute myelogenous leukaemia. *Nat Genet* 1999 ; 23 : 166-75.
116. Asou N. The role of a Runt domain transcription factor AML1/RUNX1 in leukemogenesis and its clinical implications. *Crit Rev Oncol Hematol* 2003 ; 45 : 129-50.
117. Matheny CJ, Speck ME, Cushing PR, et al. Disease mutations in RUNX1 and RUNX2 create nonfunctional, dominant-negative, or hypomorphic alleles. *EMBO J* 2007 ; 26 : 1163-75.
118. Liew E, Owen C. Familial myelodysplastic syndromes: a review of the literature. *Haematologica* 2011 ; 96 : 1536-42.
119. Okuda T, van Deursen J, Hiebert SW, Grosfeld G, Downing JR. AML1, the target of multiple chromosomal translocations in human leukemia, is essential for normal fetal liver hematopoiesis. *Cell* 1996 ; 84 : 321-30.
120. Wang Q, Stacy T, Binder M, Marin-Padilla M, Sharpe AH, Speck NA. Disruption of the Cbfa2 gene causes necrosis and hemorrhaging in the central nervous system and blocks definitive hematopoiesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996 ; 93 : 3444-9.
121. Ichikawa M, Asai T, Chiba S, Kurokawa M, Ogawa S. Runx1/AML-1 ranks as a master regulator of adult hematopoiesis. *Cell Cycle* 2004 ; 3 : 722-4.
122. Ichikawa M, Asai T, Saito T, et al. AML-1 is required for megakaryocytic maturation and lymphocytic differentiation, but not for maintenance of hematopoietic stem cells in adult hematopoiesis. *Nat Med* 2004 ; 10 : 299-304.
123. Putz G, Rosner A, Nueslein I, Schmitz N, Buchholz F. AML1 deletion in adult mice causes splenomegaly and lymphomas. *Oncogene* 2006 ; 25 : 929-39.
124. Growney JD, Shigematsu H, Li Z, et al. Loss of Runx1 perturbs adult hematopoiesis and is associated with a myeloproliferative phenotype. *Blood* 2005 ; 106 : 494-504.
125. Ichikawa M, Goyama S, Asai T, et al. AML1/Runx1 negatively regulates quiescent hematopoietic stem cells in adult hematopoiesis. *J Immunol* 2008 ; 180 : 4402-8.
126. Bluteau D, Gilles L, Hilpert M, et al. Down-regulation of the RUNX1-target gene NR4A3 contributes to hematopoiesis deregulation in familial platelet disorder/acute myelogenous leukemia. *Blood* 2011 ; 118 : 6310-20.
127. Nakagawa M, Shimabe M, Watanabe-Okochi N, et al. AML1/RUNX1 functions as a cytoplasmic attenuator of NF-kappaB signaling in the repression of myeloid tumors. *Blood* 2011 ; 118 : 6626-37.
128. Pencovich N, Jaschek R, Dicken J, et al. Cell-autonomous function of Runx1 transcriptionally regulates mouse megakaryocytic maturation. *PLoS One* 2013 ; 8 : e64248.
129. Breton-Gorius J, Favier R, Guichard J, et al. A new congenital dysmegakaryopoietic thrombocytopenia (Paris-Trousseau) associated with giant platelet alpha-granules and chromosome 11 deletion at 11q23. *Blood* 1995 ; 85 : 1805-14.
130. Favier R, Jondeau K, Boutard P, et al. Paris-Trousseau syndrome : clinical, hematological, molecular data of ten new cases. *Thromb Haemost* 2003 ; 90 : 893-7.
131. Barton K, Muthusamy N, Fischer C, et al. The Ets-1 transcription factor is required for the development of natural killer cells in mice. *Immunity* 1998 ; 9 : 555-63.
132. Hart A, Melet F, Grossfeld P, et al. Fli-1 is required for murine vascular and megakaryocytic development and is hemizygously deleted in patients with thrombocytopenia. *Immunity* 2000 ; 13 : 167-77.
133. Moussa O, LaRue AC, Abangan Jr RS, et al. Thrombocytopenia in mice lacking the carboxy-terminal regulatory domain of the Ets transcription factor Fli1. *Mol Cell Biol* 2010 ; 30 : 5194-206.
134. Monteferrario D, Bolar NA, Marneth AE, et al. A dominant-negative GFI1B mutation in the gray platelet syndrome. *N Engl J Med* 2014 ; 370 : 245-53.
135. Moroy T. The zinc finger transcription factor Growth factor independence 1 (Gfi1). *Int J Biochem Cell Biol* 2005 ; 37 : 541-6.
136. Zweidler-Mckay PA, Grimes HL, Flubacher MM, Tschlis PN. Gfi-1 encodes a nuclear zinc finger protein that binds DNA and functions as a transcriptional repressor. *Mol Cell Biol* 1996 ; 16 : 4024-34.
137. Osawa M, Yamaguchi T, Nakamura Y, et al. Erythroid expansion mediated by the Gfi-1B zinc finger protein: role in normal hematopoiesis. *Blood* 2002 ; 100 : 2769-77.
138. Vassen L, Okayama T, Moroy T. Gfi1b:green fluorescent protein knock-in mice reveal a dynamic expression pattern of Gfi1b during hematopoiesis that is largely complementary to Gfi1. *Blood* 2007 ; 109 : 2356-64.
139. Saleque S, Cameron S, Orkin SH. The zinc-finger proto-oncogene Gfi-1b is essential for development of the erythroid and megakaryocytic lineages. *Genes Dev* 2002 ; 16 : 301-6.
140. Khandanpour C, Sharif-Askari E, Vassen L, et al. Evidence that growth factor independence 1b regulates dormancy and peripheral blood mobilization of hematopoietic stem cells. *Blood* 2010 ; 116 : 5149-61.
141. Vassen L, Beauchemin H, Lemsaddek W, Krongold J, Trudel M, Moroy T. Growth factor independence 1b (gfi1b) is important for the maturation of erythroid cells and the regulation of embryonic globin expression. *PLoS One* 2014 ; 9 : e96636.
142. Foudi A, Kramer DJ, Qin J, et al. Distinct, strict requirements for Gfi-1b in adult bone marrow red cell and platelet generation. *J Exp Med* 2014 ; 211 : 909-27.
143. Nurden AT, Nurden P. The gray platelet syndrome: clinical spectrum of the disease. *Blood Rev* 2007 ; 21 : 21-36.
144. Gunay-Aygun M, Falik-Zaccai TC, Vilboux T, et al. NBEAL2 is mutated in gray platelet syndrome and is required for biogenesis of platelet alpha-granules. *Nat Genet* 2011 ; 43 : 732-4.
145. Kahr WH, Hinckley J, Li L, et al. Mutations in NBEAL2, encoding a BEACH protein, cause gray platelet syndrome. *Nat Genet* 2011 ; 43 : 738-40.
146. Albers CA, Cvejic A, Favier R, et al. Exome sequencing identifies NBEAL2 as the causative gene for gray platelet syndrome. *Nat Genet* 2011 ; 43 : 735-7.
147. Kahr WH, Lo RW, Li L, et al. Abnormal megakaryocyte development and platelet function in Nbeal2(-/-) mice. *Blood* 2013 ; 122 : 3349-58.
148. Deppermann C, Cherpokova D, Nurden P, et al. Gray platelet syndrome and defective thrombo-inflammation in Nbeal2-deficient mice. *J Clin Invest* 2013 ; 123 : 3331-42.
149. Deppermann C, Nurden P, Nurden AT, Nieswandt B, Stegner D. The Nbeal2(-/-) mouse as a model for the gray platelet syndrome. *Rare Dis* 2013 ; 1 : e26561.
150. Guerrero JA, Bennett C, van der Weyden L, et al. Gray platelet syndrome: proinflammatory megakaryocytes and alpha-granule loss cause myelofibrosis and confer metastasis resistance in mice. *Blood* 2014 ; 124 : 3624-35.

- 151.** Savoia A, Del Vecchio M, Totaro A, et al. An autosomal dominant thrombocytopenia gene maps to chromosomal region 10p. *Am J Hum Genet* 1999 ; 65 : 1401-5.
- 152.** Drachman JG, Jarvik GP, Mehafeff MG. Autosomal dominant thrombocytopenia: incomplete megakaryocyte differentiation and linkage to human chromosome 10. *Blood* 2000 ; 96 : 118-25.
- 153.** Noris P, Perrotta S, Seri M, et al. Mutations in ANKRD26 are responsible for a frequent form of inherited thrombocytopenia: analysis of 78 patients from 21 families. *Blood* 2011 ; 117 : 6673-80.
- 154.** Pippucci T, Savoia A, Perrotta S, et al. Mutations in the 5' UTR of ANKRD26, the ankirin repeat domain 26 gene, cause an autosomal-dominant form of inherited thrombocytopenia, THC2. *Am J Hum Genet* 2011 ; 88 : 115-20.
- 155.** Noris P, Favier R, Alessi MC, et al. ANKRD26-related thrombocytopenia and myeloid malignancies. *Blood* 2013 ; 122 : 1987-9.
- 156.** Bera TK, Liu XF, Yamada M, et al. A model for obesity and gigantism due to disruption of the Ankrd26 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008 ; 105 : 270-5.
- 157.** Bluteau D, Balduini A, Balayn N, et al. Thrombocytopenia-associated mutations in the ANKRD26 regulatory region induce MAPK hyperactivation. *J Clin Invest* 2014 ; 124 : 580-91.
- 158.** Gueguen P, Rouault K, Chen JM, et al. A missense mutation in the alpha-actinin 1 gene (ACTN1) is the cause of autosomal dominant macrothrombocytopenia in a large French family. *PLoS One* 2013 ; 8 : e74728.
- 159.** Kunishima S, Okuno Y, Yoshida K, et al. ACTN1 mutations cause congenital macrothrombocytopenia. *Am J Hum Genet* 2013 ; 92 : 431-8.
- 160.** Noris P, Biino G, Pecci A, et al. Platelet diameters in inherited thrombocytopenias: analysis of 376 patients with all known disorders. *Blood* 2014 ; 124 : e4-10.
- 161.** Mehafeff MG, Newton AL, Gandhi MJ, Crossley M, Drachman JG. X-linked thrombocytopenia caused by a novel mutation of GATA-1. *Blood* 2001 ; 98 : 2681-8.

5.2 Annexe 2

In vitro Binding of [³H]PSB-0413 to P2Y₁₂ Receptors

Sous presse dans Current Protocols in Pharmacology

In Vitro Binding of [³H]PSB-0413 to P2Y₁₂ Receptors

UNIT 1.35

Arnaud Dupuis,¹ Véronique Heim,¹ Philippe Ohlmann,¹ and Christian Gachet¹

¹Etablissement Français du Sang—Alsace, UMR S949, Strasbourg, France

The P2Y₁₂/ADP receptor plays a central role in platelet activation. Characterization of this receptor is mandatory for studying disorders associated with a P2Y₁₂ receptor defect and for evaluating P2Y₁₂ receptor agonists and antagonists. In the absence of suitable anti-P2Y₁₂ antibodies, radioligand binding assays are the only way to conduct such studies. While various radioligands were employed in the past for this purpose, none were found to be suitable for routine use. Described in this unit are protocols for quantitatively and qualitatively assessing P2Y₁₂ receptors with [³H]PSB-0413, a selective antagonist for this site. The saturation and competition assays described herein make possible the determination of P2Y₁₂ receptor density on cells, as well as the potencies and affinities of test agents at this site. © 2015 by John Wiley & Sons, Inc.

Keywords: p2y₁₂ • binding • blood platelets • radioligand • ADP

How to cite this article:

Dupuis, A., Heim, V., Ohlmann, P., and Gachet, C. 2015. In vitro binding of [³H]PSB-0413 to P2Y₁₂ receptors. *Curr. Protoc. Pharmacol.* 71:1.35.1-1.35.19.
doi: 10.1002/0471141755.ph0135s71

INTRODUCTION

Adenosine 5'-diphosphate (ADP) is a platelet agonist in primary hemostasis. In blood platelets, ADP is stored in dense granules at a concentration of about 650 mM. These granules secrete their contents (ADP, other nucleotides, serotonin, and calcium) when platelets are activated by collagen or thrombin. Two G protein-coupled receptors bind ADP on platelet membranes (Gachet, 2008): the P2Y₁ and P2Y₁₂ sites. The P2Y₁ receptor is involved in ADP-induced platelet shape change and intracellular calcium mobilization, while the P2Y₁₂ receptor plays a central role in platelet activation (Gachet, 2012). Thus, stimulation of the P2Y₁₂ receptor by ADP amplifies the platelet responses triggered by various agonists through multiple signaling pathways (inhibition of cyclic AMP production and PI3Kinase activation). Due to this central role, the P2Y₁₂ receptor is an important target for antiplatelet drugs (Moheimani and Jackson, 2012), including irreversible P2Y₁₂ antagonist prodrugs (clopidogrel and prasugrel) and direct P2Y₁₂ targeting agents (ticagrelor and cangrelor). In this context, P2Y₁₂ radioligand binding studies are crucial not only for diagnosing disorders such as hemorrhagic diathesis, associated with a deficit in P2Y₁₂ receptors (Cattaneo et al., 2003; Daly et al., 2009; Cattaneo, 2011; Lecchi et al., 2015), but also for the evaluating the effectiveness of P2Y₁₂ receptor-targeting drugs in clinical trials (Bal Dit Sollier et al., 2009).

Various radioligands have in the past been used to label P2Y₁₂ receptors. Included in this group are [¹⁴C]ADP, [³H]ADP, [³H]2-methylthio-ADP, [β-³²P]2-methylthio-ADP, and [β-³³P]2-methylthio-ADP. However, none were entirely suitable for quantifying and

Receptor Binding

1.35.1

Supplement 71



Current Protocols in Pharmacology 1.35.1-1.35.19, December 2015
Published online December 2015 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).
doi: 10.1002/0471141755.ph0135s71
Copyright © 2015 John Wiley & Sons, Inc.

characterizing P2Y₁₂ receptors. In part, this is because these ligands are metabolized by ectonucleotidases and none are selective for the P2Y₁₂ receptor, having some affinity for P2Y₁ sites on platelets as well. For many years, blood platelet P2Y₁₂ receptor binding sites were labeled with radioactive 2-methylthio-ADP, a nonselective agonist, in the presence of a selective P2Y₁ antagonist such as MRS2179 (Baurand et al., 2001) or MRS2500 (Houston et al., 2006). The number of P2Y₁₂ receptors per cell was then estimated by subtracting selective P2Y₁ binding from the total binding. However, the results using this approach are highly variable with human platelets (Ohlmann et al., 2013).

It has now been shown that [³H]PSB-0413, a tritiated derivative of AR-C767085MX, is a selective P2Y₁₂ antagonist (El-Tayeb et al., 2005; Baqi et al., 2009) that can be used to study the purinergic P2Y₁₂ platelet receptor. Unlike the thienopyridines, which bind covalently to the P2Y₁₂ receptor and prevent further ligand interactions, [³H]PSB-0413 binds to the receptor in a reversible manner. This makes it suitable for performing either saturation or competitive binding experiments.

Described in this unit is the use of this radioligand to characterize the P2Y₁₂ receptor both quantitatively and qualitatively in intact washed human platelets or cultured cells. Saturation experiments (Basic Protocol 1) allow the determination of receptor density ($B_{\max}$), the number of binding sites for ligands interacting with the receptor (n_H), and receptor affinity (K_d). Competition experiments (Basic Protocol 2) are employed to determine the affinity and the relative potencies (IC_{50}/K_i) of ligands that interact with this site.

SATURATION BINDING ASSAY TO DETERMINE THE DISSOCIATION CONSTANT (K_d) AND NUMBER OF BINDING SITES IN THE TISSUE SAMPLE

A saturation assay allows determination of the dissociation constant (K_d) of a radiolabeled ligand at equilibrium and the number of binding sites in the tissue sample. Saturation binding is used in particular to quantify P2Y₁₂ receptors present on blood platelets or on any type of cell expressing this receptor. Additional procedures to prepare washed blood platelets and to suspend cultured cells are described in Support Protocols 1 and 2.

Materials

- Washed platelets resuspended in Tyrode's buffer containing 0.1% human albumin (Support Protocol 1) or cells resuspended in CMP-DPBS/0.1% bovine serum albumin (Support Protocol 2)
- Dulbecco's phosphate-buffered saline without Ca or Mg (CMF-DPBS; Life Technologies, cat. no. 14190-094)
- 10 mM or 20 mM ADP (see recipe)[³H]PSB-0413 dilutions (see recipe and Tables 1.35.1 and 1.35.2)
- Liquid scintillation cocktail (GE Healthcare, cat. no. NBCS 104)
- Whatman glass microfiber filters, binder-free, Grade GF/C (Sigma-Aldrich, cat. no. 1822915)
- Large petri dishes
- Reaction vials (Novolab, cat. no. A11088)
- Pump (Air Cadet, cat. no. 87419) and filtration system (Hoefer Scientific Instrument, cat. no. CA 94107); see Figure 1.35.1 for a full description of the filtration system
- SnapCap Bio-Vials (Beckman Coulter, cat. no. 566353)
- β scintillation counter (e.g., Tri-carb 2810TR liquid scintillation analyzer, PerkinElmer,)
- GraphPad Prism software (<http://www.graphpad.com>)

Table 1.35.1 [³H]PSB-0413 Dilution Table for a Saturation Binding Experiment on Platelets (60 Vials Including Total and Nonspecific Binding Vials)

Initial concentration of radioligand (μM)	Volume of initial solution (μl)	Volume of PBS (μl)	Final volume (μl)	Target concentration (nM) ^a
20 ^b	22	528	550	800
0.8	125	75	200	500
0.8	75	125	200	300
0.8	50	150	200	200
0.8	31.25	218.75	250	100
0.8	12.5	187.5	200	50
0.8	7.5	192.5	200	30
0.8	5	195	200	20
0.8	3	197	200	12
0.8	1	199	200	4

^aConcentration to use to prepare the vials for the saturation binding assay,: called "Initial concentration of radioligand" in Table 1.35.3.

^bCommercial stock solution.

Table 1.35.2 [³H]PSB-0413 Dilution Table for a Saturation Binding Experiment on Cells (60 Vials Including Total and Nonspecific Binding Vials)

Initial concentration of radioligand (μM)	Volume of initial solution (μl)	Volume of PBS (μl)	Final volume (μl)	Target concentration (nM) ^a
20 ^b	44	506	550	1600
1.6	125	75	200	1000
1.6	75	125	200	600
1.6	50	150	200	400
1.6	25	175	200	200
1.6	15.6	234.4	250	100
1.6	7.5	192.5	200	60
1.6	5	195	200	40
1.6	3	197	200	24
1.6	1	199	200	8

^aConcentration to use to prepare the vials for the saturation binding assay : called "Initial concentration of radioligand" in Table 1.35.4.

^bCommercial stock solution.

Prepare washed platelet or cell suspension

- 1a. *For blood platelets washed as in Support Protocol 1:* Use 200 μl of washed platelet suspension at 600,000 platelet/μl for a single measurement.

The suspension must be held at 37°C for at least 30 min before use.

One experiment, involving 10 measurements in triplicate vials for total binding and 10 measurements in triplicate vials for nonspecific binding, requires 14 ml of washed platelet suspension.

- 1b. *For cultured cells prepared as in Support Protocol 2:* Use 450 μl of cell suspension at 2×10^6 cells/ml for a single measurement.

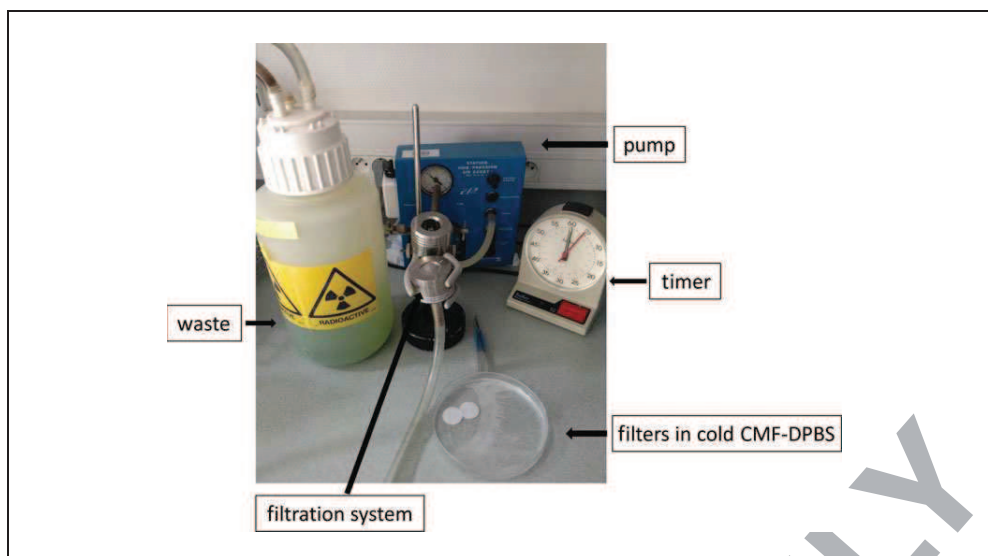


Figure 1.35.1 Filtration system for saturation binding assay.

The resuspended cells must be kept at 37°C until use.

The cells from step 1b can be used immediately after the preparation of the suspension. One experiment, involving 10 measurements in triplicate vials for total binding and 10 measurements in triplicate vials for nonspecific binding, requires 30 ml of cell suspension.

Prepare reagents

2. Prepare Whatman glass microfiber filters appropriate for the filtration device (generally, round filters with an average diameter of 25 mm obtained with a hammer and a punch). Add cold CMF-DPBS to the filters in a large petri dish and store them at 4°C until use.
3. Prepare a large quantity (at least 1 liter for a single experiment) of CMF-DPBS and maintain at 4°C.
4. Prepare a 10 mM solution of ADP for a platelet experiment or 20 mM for a cultured cell experiment, as the final volume needed for the latter is twice that needed for the former (see Reagents and Solutions).
5. Prepare radioligand ($[^3\text{H}]\text{PSB-0413}$) dilutions from the stock solution to obtain appropriate volumes and concentrations for each "Target solution" (see Table 1.35.1 for platelet suspension and Table 1.35.2 for cultured cell suspension; also see Reagents and Solutions).

In Tables 1.35.1 and 1.35.2, the "Target concentration" corresponds to the "Initial concentration of radioligand" shown in Tables 1.35.3 and 1.35.4.

Prepare reaction vials

6. Prepare three vials containing 25 μl of 100 nM radioligand $[^3\text{H}]\text{PSB-0413}$ to determine the specific activity of the radioligand on the day of the experiment (total cpm, TC vials).
7. Prepare vials in triplicate to measure nonspecific binding, containing each of the following: (see Table 1.35.3 for platelet suspensions and Table 1.35.4 for cultured cell suspensions):

ADP to a final concentration of 1 mM

Table 1.35.3 Preparation of Nonspecific Binding Vials for a Saturation Binding Experiment on Platelets

Vial number	1			2			3			4			5			6			7			8			9			10		
	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c
Radioligand added (pmol)	0.1			0.3			0.5			0.75			1.25			2.5			5			7.5			12.5			20		
Initial concentration of radioligand (nM) ^a	4			12			20			30			50			100			200			300			500			800		
Volume of radioligand added/vial (μl)													25																	
Final concentration of radioligand (nM)	0.4			1.2			2			3			5			10			20			30			50			80		
ADP added (nmol)													250																	
Initial concentration of ADP (mM)													10																	
Volume of ADP added (μl)													25																	
Final concentration of ADP (mM)													1																	
Volume of platelet suspension added (μl)													200																	
Total volume of mixture/vial (μL)													250																	

^aThese “initial concentration solutions” correspond to the “Target concentration” obtained in Table 1.35.1.

Increasing concentrations of radioligand ([³H]PSB-0413) to final concentrations ranging from 0.4 to 80 nM.

8. Prepare vials in triplicate to measure the specific binding of the increasing concentrations of radioligand ([³H]PSB-0413 [0.4 to 80 nM]). Use 25 μl CMF-DPBS instead of 25 μl of ADP in each vial.

Binding (two operators are required for this step)

9. Begin the binding reaction by adding 200 μl of blood platelet suspension prepared as in step 1a (or 450 μl of cultured cell suspension prepared as in step 1b) to the first vial of the nonspecific series. Vortex the vial gently and incubate the sample at 37°C for 5 min.

Because the association and dissociation of [³H]PSB-0413 at the P2Y₁₂ receptor is quite rapid ($t_{1/2}$ association of [³H]PSB-0413 = 26.7 ± 3.7 sec and $t_{1/2}$ dissociation of [³H]PSB-0413 = 42.9 ± 10.8 sec), an incubation time of 5 min is sufficient to achieve equilibrium. Equilibrium is stable for at least 30 min (Ohlmann et al., 2013).

10. Proceed in the same way every 30 sec for each vial.
11. Following the 5-min incubation time, place a round filter (from step 2) on the filtration device and activate the pump. Add 2 ml of cold CMF-DPBS to the incubation vial and empty it into the filtration system. Rinse the filter four additional times with 2 ml of cold CMF-DPBS to complete the washing.

This step is necessary to separate the receptor-bound radioligand from unbound radioligand which is collected in the waste.

Receptor Binding

1.35.5

Table 1.35.4 Preparation of Nonspecific Binding Vials for a Saturation Binding Experiment on Cells

Vial number	1			2			3			4			5			6			7			8			9			10		
	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c
Radioligand added (pmol)	0.2			0.6			1			1.5			2.5			5			10			15			25			40		
Initial concentration of radioligand (nM) ^a	8			24			40			60			100			200			400			600			1000			1600		
Volume of radioligand added/vial (μl)															25															
Final concentration of radioligand (nM)	0.4			1.2			2			3			5			10			20			30			50			80		
ADP added (nmol)															500															
Initial concentration of ADP (mM)															20															
Volume of ADP added (μl)															25															
Final concentration of ADP (mM)															1															
Volume of cell suspension added (μl)															450															
Total volume of mixture/vial (μl)															500															

^aThese "Initial concentration of radioligand" correspond to the "Target concentration" obtained in Table 1.35.2.

12. Remove (or scratch with a tweezers, depending on the filtration device) the filter from the filtration device and transfer it to one Snap Cap Bio-Vial.
13. Add 2 ml of scintillation cocktail, close the vial, vortex it gently, and keep it at room temperature for 1 hr before quantifying radioactivity in a liquid scintillation counter. Allow a counting time of 5 min for each sample to increase the accuracy of the results.

This approach avoids photomultiplier bleaching due to chemiluminescence.

Data analysis

14. Calculate the mean bound radioactivity (counts per min or cpm) of each triplicate point for TC vials, total binding vials, and nonspecific binding vials.
15. Convert the mean activity of each triplicate into the concentration of bound radioligand using the measured specific activity of the TC vials.

This will reveal the total concentration of bound radioligand associated with a concentration of nonspecifically bound radioligand.

16. Calculate, for each point, the concentration of specifically bound radioligand (total bound radioligand minus nonspecifically bound radioligand).

An example is presented in Table 1.35.5.

17. Plot the concentration of radioligand added [L] against the concentration of specifically bound radioligand [RL].

**[³H]PSB-0413
Binding to P2Y₁₂
Receptors**

1.35.6

Table 1.35.5 Total, Nonspecific, and Specific Binding: Raw and Transformed Data Obtained from a Saturation Binding Experiment on Human Platelets^a

Concentration of ligand added (M)	Total binding (cpm) ± SD	Nonspecific binding (cpm) ± SD	Total binding (nM) ± SD	Nonspecific binding (nM) ± SD	Specific binding (nM)
4×10^{-10}	194 ± 7	31 ± 8	0.019 ± 0.001	0.003 ± 0.001	0.016 ± 0.002
1.2×10^{-9}	825 ± 167	51 ± 13	0.081 ± 0.016	0.005 ± 0.001	0.076 ± 0.018
2×10^{-9}	1131 ± 27	102 ± 18	0.111 ± 0.003	0.010 ± 0.002	0.101 ± 0.004
5×10^{-9}	2241 ± 166	173 ± 20	0.220 ± 0.016	0.017 ± 0.002	0.203 ± 0.018
1×10^{-8}	2761 ± 126	214 ± 35	0.271 ± 0.012	0.021 ± 0.003	0.250 ± 0.016
2×10^{-8}	3036 ± 414	234 ± 9	0.298 ± 0.041	0.023 ± 0.001	0.275 ± 0.042
5×10^{-8}	3382 ± 424	275 ± 40	0.332 ± 0.042	0.027 ± 0.004	0.305 ± 0.046
8×10^{-8}	3504 ± 320	357 ± 10	0.344 ± 0.003	0.035 ± 0.001	0.309 ± 0.004

^aThe raw data for total and nonspecific binding (in cpm) were converted into the concentration of bound [³H]PSB-0413 using the specific activity of the radioligand measured in the TC vials (40,748 cpm/pmol).

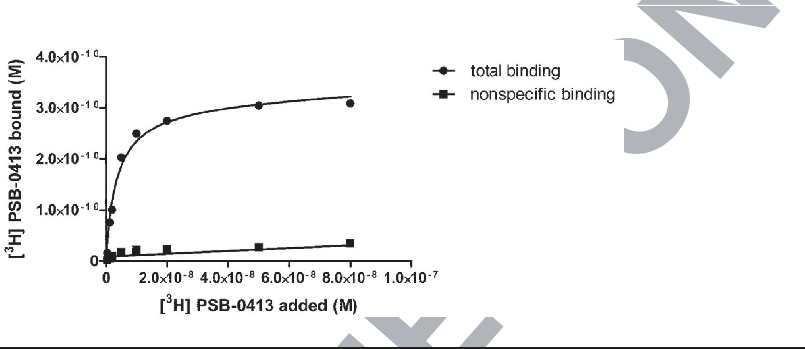


Figure 1.35.2 Total and nonspecific binding of [³H]PSB-0413 to human platelets. The total binding (•) and nonspecific binding (■) are plotted as a function of the concentration of ligand added ([L]). The values of the total and nonspecific binding in CPM are converted into concentrations using the specific activity of [³H]PSB-0413 obtained by counting the TC vials on the day of the experiment. In this experiment, the specific activity was 40,748 cpm/pmol.

GraphPad Prism is suitable to plot the saturation curve in two ways (Fig. 1.35.2): the total and nonspecific binding are shown on the same graph if the plotting option "One site-total and nonspecific binding" is selected. There is only one ADP binding site on the P2Y₁₂ receptor (Zhang et al., 2014a; Zhang et al., 2014b).

Only the specific binding will be displayed when selecting the plotting option "One site-specific binding" (Fig. 1.35.3).

18. Determine K_d and B_{max} from the specific binding curve (Fig. 1.35.3).

GraphPad Prism calculates these parameters automatically. It is also possible to calculate the "Hill slope coefficient," n_H (Davenport and Russell, 1996), which corresponds to the slope of the graphical representation of the following equation (Equation 1.35.1):

$$\log \left(\frac{[RL]}{B_{max} - [RL]} \right) = n_H * ([L]) - \log(K_d)$$

Equation 1.35.1

n_H is approximately equal to 1 when the ligand binds to a single population of sites

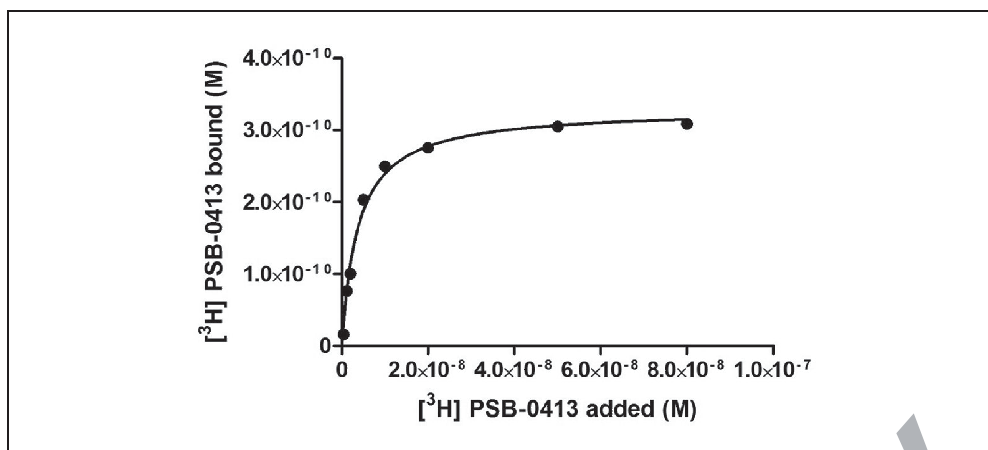


Figure 1.35.3 Specific binding of [^3H]PSB-0413 to human platelets. The specific binding of [^3H]PSB-0413 is plotted as a function of the concentration of radioligand added ($[L]$). The specific binding is calculated as the total binding less the nonspecific binding, both expressed as the concentration of bound radioligand. The saturation binding curve allows one to determine K_d and $B_{\max}$. In this experiment, $K_d = 3.76 \text{ nM}$ and $B_{\max} = 0.33 \text{ nM}$.

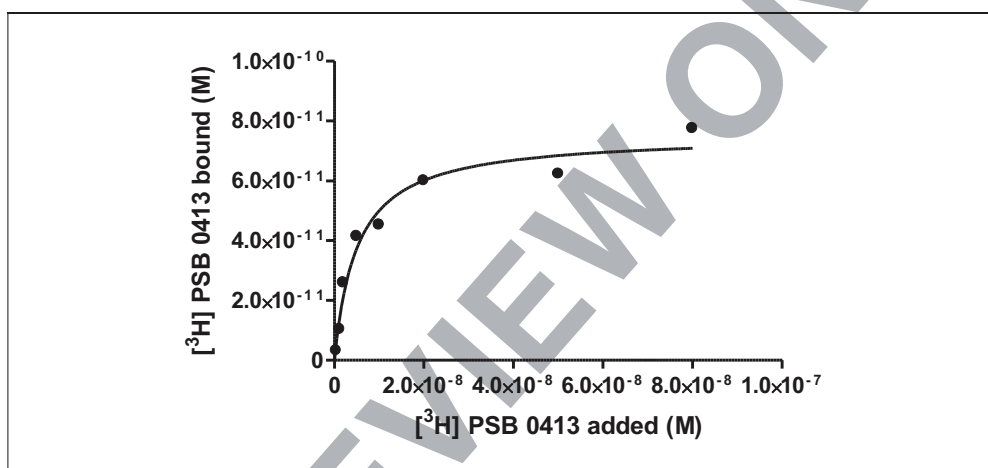


Figure 1.35.4 Specific binding of [^3H]PSB-0413 to 13.21.N1 astrocytoma cells transfected with a wild-type P2Y₁₂ receptor. The specific binding of [^3H]PSB-0413 is plotted as a function of the concentration of radioligand added ($[L]$). The specific binding is calculated as the total binding less the nonspecific binding, both expressed as the concentration of bound radioligand. The saturation binding curve allows one to determine K_d and $B_{\max}$. In this experiment, $K_d = 5.08 \text{ nM}$ and $B_{\max} = 75.4 \text{ pM}$.

In the example presented in Figure 1.35.3 and Table 1.35.5, $K_d = 3.76 \pm 0.4 \text{ nM}$, $B_{\max} = 0.33 \pm 0.09 \text{ nM}$ and $n_H = 1.2$.

19. With $B_{\max}$ expressed as a concentration, it is possible to estimate the absolute number of receptors (N) per platelet (or cultured cell) in the experiment (Equation 1.35.2):

$$N = \frac{B_{\max}(M) * \text{Volume}(L) * \text{Avogadro Number}}{\text{Number of cells per experiment}}$$

Equation 1.35.2

In the example shown in Figure 1.35.3, the number of P2Y₁₂ receptors is 414 per platelet.

A saturation-binding experiment performed on 13.21N1 astrocytoma cells transfected with wild-type P2Y₁₂ receptor is shown in Figure 1.35.4 and Table 1.35.6. In this example,

Table 1.35.6 Total, Nonspecific, and Specific Binding: Raw and Transformed Data Obtained from a Saturation Binding Experiment on 13.21.N1 Astrocytoma Cells Transfected with a Wild-Type P2Y₁₂ Receptor^a

Concentration of ligand added (M)	Total binding (CPM) ± SD	Nonspecific binding (cpm) ± SD	Total binding (nM) ± SD	Nonspecific binding (nM) ± SD	Specific binding (nM) ± SD
4×10^{-10}	77 ± 5	14 ± 2	0.0040 ± 0.0003	0.0007 ± 0.0001	0.0032 ± 0.0004
1.2×10^{-9}	217 ± 29	17 ± 2	0.0112 ± 0.0015	0.0009 ± 0.0001	0.0104 ± 0.0016
2×10^{-9}	524 ± 67	22 ± 2	0.0271 ± 0.0035	0.0011 ± 0.0001	0.0260 ± 0.0036
5×10^{-9}	839 ± 63	36 ± 3	0.0433 ± 0.0033	0.0019 ± 0.0001	0.0415 ± 0.0034
1×10^{-8}	938 ± 16	60 ± 8	0.0484 ± 0.0008	0.0031 ± 0.0004	0.0453 ± 0.0012
2×10^{-8}	1290 ± 84	127 ± 24	0.0666 ± 0.0043	0.0066 ± 0.0013	0.0601 ± 0.0056
5×10^{-8}	1350 ± 132	143 ± 21	0.0697 ± 0.0068	0.0074 ± 0.0011	0.0623 ± 0.0079
8×10^{-8}	1659 ± 40	157 ± 31	0.0857 ± 0.0021	0.0081 ± 0.0016	0.0776 ± 0.0036

^aThe raw data for total and nonspecific binding (in CPM) were converted into the concentration of bound [³H]PSB-0413 using the specific activity of the radioligand measured in the TC vials (38,746 CPM/pmol).

the $K_d = 5.08 \pm 1.14$ nM, the $B_{max} = 75.4 \pm 4.5$ pM, with the number of P2Y₁₂ receptors per cell being 22,689.

COMPETITIVE BINDING ASSAYS TO DETERMINE THE AFFINITY (K_i OR IC_{50}) OF NON-RADIOLABELED LIGANDS FOR THE P2Y₁₂ RECEPTOR

Competition experiments are conducted to determine the relative affinities of various ligands for a receptor binding site. The affinity is expressed as the IC_{50} value, from which an inhibition constant (K_i) is derived to characterize the pharmacological properties of the receptor and to quantify the amount of radioligand bound in the presence of increasing concentrations of an unlabeled or "cold" displacer ligand. Described in the protocol below are P2Y₁₂ competition binding experiments using ADP as the displacer for [³H]PSB-0413. The same protocol can be employed with any compound that competitively interacts with the P2Y₁₂ site, such as 2MeSADP or AR-C69931MX.

In contrast to the saturation binding assay (Basic Protocol 1), a competitive binding assay requires an unlabeled ligand that is used to displace [³H]PSB-0413 from the P2Y₁₂ receptor. The unlabeled substance most commonly used as the displacer is ADP, although other agents, including AR-C69931MX (American Custom Chemicals Corporation, 163706-36-3) or 2MeSADP (2-(methylthio)adenosine 5'-diphosphate trisodium salt hydrate (Sigma-Aldrich, M152) can be employed instead. The steps below use ADP as the displacer ligand.

For materials, see Basic Protocol 1.

Prepare blood platelet or cell suspension

1. Prepare a fresh blood platelet or cell suspension in sufficient quantity to perform the experiment in triplicate, as described in Basic Protocol 1.

Note that 8 ml of washed platelets (or 15 ml of cultured cell suspension) is normally sufficient to complete a competition binding assay.

Prepare reagents

2. Prepare filters and CMF-DPBS as described in steps 2 and 3 of Basic Protocol 1.

BASIC PROTOCOL 2

Receptor Binding 1.35.9

Table 1.35.7 ADP Dilution Table for a Competition Binding Experiment on Platelets (Three Vials per Concentration)

Initial concentration solution	Volume of initial solution (μl)	Volume of CMF-DPBS (μl)	Final volume (μl)	Target concentration (M) ^a
10^{-1} ^b	15	135	150	10^{-2}
10^{-2}	15	135	150	10^{-3}
10^{-3}	15	135	150	10^{-4}
10^{-4}	15	135	150	10^{-5}
10^{-5}	15	135	150	10^{-6}
10^{-6}	15	135	150	10^{-7}
10^{-7}	15	135	150	10^{-8}
10^{-8}	15	135	150	10^{-9}

^aConcentration to use to prepare the vials for the competition binding assay : called "initial concentration of ADP" in Table 1.35.9.

^bPrepared stock solution.

Table 1.35.8 ADP Dilution Table for a Competition Binding Experiment on Cells (Three Vials per Concentration)

Initial concentration solution (M)	Volume of initial solution (μl)	Volume of CMF-DPBS (μl)	Final volume (μl)	Target concentration (M) ^a
2×10^{-1} ^b	15	135	150	2×10^{-2}
2×10^{-2}	15	135	150	2×10^{-3}
2×10^{-3}	15	135	150	2×10^{-4}
2×10^{-4}	15	135	150	2×10^{-5}
2×10^{-5}	15	135	150	2×10^{-6}
2×10^{-6}	15	135	150	2×10^{-7}
2×10^{-7}	15	135	150	2×10^{-8}
2×10^{-8}	15	135	150	2×10^{-9}

^aConcentration to use to prepare the vials for the saturation binding assay : called "Initial concentration of ADP" in Table 1.35.10.

^bPrepared stock solution.

3. Prepare a 100 mM ADP stock solution for platelet studies or 200 mM stock solution for cultured cell studies. Prepare ADP dilutions from the stock solution to obtain the desired concentrations of the "Target solution" in the appropriate volumes (see Table 1.35.7 for platelet suspension and Table 1.35.8 for cultured cell suspension).

Each "Target concentration" shown in Tables 1.35.7 and 1.35.8 corresponds to the "Initial concentration of ADP" displayed in Tables 1.35.9 and 1.35.10.

4. Prepare a [^3H]PSB-0413 dilution at 2×10^{-7} M for platelet experiments or at 4×10^{-7} M for cell culture studies.

The final volume for cell culture experiments is twice that for the platelet experiment.

Prepare reaction vials

5. Prepare three total count (TC) vials containing 25 μl of [^3H]PSB-0413 at the concentration used for each cell type (see step 4).

Table 1.35.9 Preparation of Binding Vials for a Competition Experiment on Platelets

Vial number	1			2			3			4			5			6			7			8			9			10		
	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c
Radioligand added (pmol)													5																	
Initial concentration of radioligand (nM)													200																	
Volume of radioligand added/vial (μl)													25																	
Final concentration of radioligand (nM)													20																	
ADP added (mol)	2.5×10^{-6}			2.5×10^{-7}			2.5×10^{-8}			2.5×10^{-9}			2.5×10^{-10}			2.5×10^{-11}			2.5×10^{-12}			2.5×10^{-13}			2.5×10^{-14}					0
Initial concentration of ADP (M) ^a	10^{-1}			10^{-2}			10^{-3}			10^{-4}			10^{-5}			10^{-6}			10^{-7}			10^{-8}			10^{-9}					0
Volume of ADP added (μl)													25																	
Final concentration of ADP (M)	10^{-2}			10^{-3}			10^{-4}			10^{-5}			10^{-6}			10^{-7}			10^{-8}			10^{-9}			10^{-10}					
Volume of PBS added (μl)																														25
Volume of platelet suspension added (μl)													200																	
Total volume of mixture/vial (μl)													250																	

^aThese "Initial concentration of ADP" values correspond to the "Target concentration" obtained in Table 1.35.7.

6. Prepare, in triplicate, competitive binding reaction vials containing both of the following: (see Table 1.35.9 for platelet suspension and Table 1.35.10 for cultured cell suspension):

25 μl of decreasing concentrations of ADP to obtain final concentrations ranging from 10^{-10} to 10^{-2} M. Also prepare a set of triplicate vials containing 25 μl of CMF-DPBS instead of ADP
25 μl of [³H]PSB-0413 to obtain a final concentration of 20 nM.

7. Follow steps 9 to 13 of Basic Protocol 1 for conducting the binding assay and for quantifying radioactivity bound to the P2Y₁₂ receptor.

Analyze data

8. Plot the concentration of bound ([³H]PSB-0413) against the log of the concentration of the unlabeled ligand present in the incubation vial (log[ADP] in Fig. 1.35.5).

GraphPad Prism can be used to plot competitive binding curves. Select a nonlinear regression from the "One site – fit K_i" plotting option for competitive binding, as there is only one ADP binding site on the P2Y₁₂ receptor (Zhang et al., 2014a; Zhang et al., 2014b). This graphical representation allows determination of the inhibition constant (IC₅₀). The IC₅₀ is the concentration of competitor that displaces 50% of the radioligand from the receptor. The K_i is determined using the Cheng-Prusoff equation (Cheng and Prusoff, 1973). GraphPad Prism software calculates the K_i automatically when the K_d of the radioligand is entered into the system.

9. Determine the IC₅₀ and K_i from the competitive binding curve.

Receptor Binding

1.35.11

Table 1.35.10 Preparation of Binding Vials for a Competition Experiment on Cells

Vial number	1			2			3			4			5			6			7			8			9			10		
	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c			
Radioligand added (pmol)															10															
Initial concentration of radioligand (nM)															400															
Volume of radioligand added/vial (μl)															25															
Final concentration of radioligand (nM)															20															
ADP added (mol)	5×10^{-6}			5×10^{-7}			5×10^{-8}			5×10^{-9}			5×10^{-10}			5×10^{-11}			5×10^{-12}			5×10^{-13}			5×10^{-14}		0			
Initial concentration of ADP (M) ^a	2×10^{-1}			2×10^{-2}			2×10^{-3}			2×10^{-4}			2×10^{-5}			2×10^{-6}			2×10^{-7}			2×10^{-8}			2×10^{-9}		0			
Volume of ADP added (μl)													25																	
Final concentration of ADP (M)	10^{-2}			10^{-3}			10^{-4}			10^{-5}			10^{-6}			10^{-7}			10^{-8}			10^{-9}			10^{-10}					
Volume of PBS added (μl)																											25			
Volume of cell suspension added (μl)													450																	
Total volume of mixture/vial (μl)													500																	

^a These “Initial concentration of ADP” correspond to the “Target concentration” obtained in Table 1.35.7.

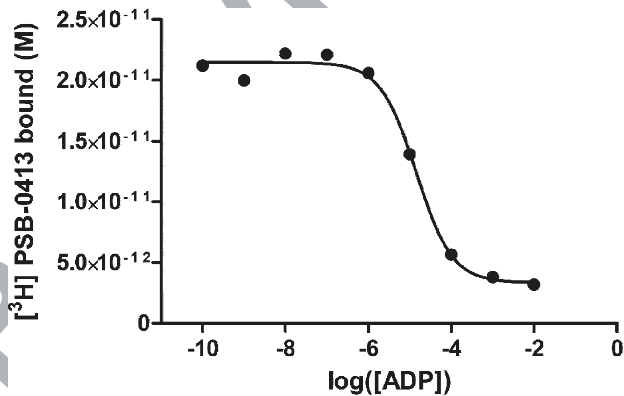


Figure 1.35.5 Competition between ADP and [³H]PSB-0413 for binding to 13.21.N1 cells transfected with a wild-type P2Y₁₂ receptor. The concentration of bound [³H]PSB-0413 is plotted as a function of the log [ADP]. [³H]PSB-0413 was calculated using the specific activity of the radioligand measured in the TC vials (36,898 cpm/pmol). The IC₅₀ of ADP is defined as the concentration of ADP that displaces 50% of the radioligand (L*) from the receptor. K_i is calculated from IC₅₀ and K_d according to the Cheng-Prusoff equation (Cheng and Prusoff, 1973). In this experiment, K_i for ADP was 4.79 μM.

[³H]PSB-0413
Binding to P2Y₁₂
Receptors

1.35.12

The competition between [³H]PSB-0413 and ADP for binding to heterologous 13.21.N1 astrocytoma cells transfected with a wild-type P2Y₁₂ receptor is displayed on Figure 1.35.5 and Table 1.35.11. The K_i for ADP in this experiment was 4.79 μM.

Table 1.35.11 Raw and Transformed Data for a Competitive Binding Experiment on 13.21.N1 Cells Transfected with a Wild-Type P2Y₁₂ Receptor^a

ADP added (M)	Bound [³ H]PSB-0413 (cpm) ± SD	Bound [³ H]PSB-0413 (M)
1 × 10 ⁻²	65 ± 8	3.17 × 10 ⁻¹² ± 0.30 × 10 ⁻¹²
1 × 10 ⁻³	77 ± 5	3.80 × 10 ⁻¹² ± 0.20 × 10 ⁻¹²
1 × 10 ⁻⁴	115 ± 3	5.66 × 10 ⁻¹² ± 0.20 × 10 ⁻¹²
1 × 10 ⁻⁵	283 ± 4	1.39 × 10 ⁻¹¹ ± 0.01 × 10 ⁻¹¹
1 × 10 ⁻⁶	420 ± 52	2.06 × 10 ⁻¹¹ ± 0.20 × 10 ⁻¹¹
1 × 10 ⁻⁷	451 ± 12	2.21 × 10 ⁻¹¹ ± 0.07 × 10 ⁻¹¹
1 × 10 ⁻⁸	452 ± 44	2.22 × 10 ⁻¹¹ ± 0.20 × 10 ⁻¹¹
1 × 10 ⁻⁹	407 ± 42	2.00 × 10 ⁻¹¹ ± 0.20 × 10 ⁻¹¹
1 × 10 ⁻¹⁰	432 ± 32	2.12 × 10 ⁻¹¹ ± 0.10 × 10 ⁻¹¹

^aThe raw data for binding (in cpm) were converted into the concentration of bound [³H]PSB-0413 using the specific activity of the radioligand measured in the TC vials (36,898 cpm/pmol).

PREPARATION OF WASHED BLOOD PLATELETS

Characterization of the platelet P2Y₁₂ receptor requires the use of resting, washed blood platelets (Cazenave et al., 2004).

Materials

Tyrode's buffer containing 0.35% HSA (see recipe)
 Healthy blood donor or patient
 Acid-citrate-dextrose anticoagulant
 ?5 U/μl? heparin (Cerp Rhin Rhone Méditerranée, cat. no. ANM 3048450)
 ?10⁻³ M? prostaglandin I₂ (PGI₂; Sigma, cat. no. P6188)
 Apyrase (ATP diphosphohydrolase 3.6.1.5; ?Supplier?; cat. no.?)
 15- and 50-ml conical centrifuge tubes (e.g., Sarstedt or Corning Falcon)
 Centrifuge (e.g., Sorvall RC3BP)

Automated blood cell counter (e.g., SYSMEX XE-2100)

1. Prepare 200 ml of Tyrode's buffer containing 0.35% HSA.
2. Collect fresh whole blood drawn into acid-citrate-dextrose anticoagulant from a healthy donor or a patient.
3. Centrifuge the fresh whole blood using the parameters shown in Table 1.35.12.
4. Transfer the platelet-rich plasma (PRP) into a new vial and incubate for 10 min at 37°C. Centrifuge according to the parameters displayed in Table 1.35.12.
5. Add 2 μl/ml of heparin (5 U/ml) and 0.5 μl/ml of PGI₂ (10⁻³ M) to 30 ml of Tyrode's buffer containing 0.35% HSA.
6. Following centrifugation of the PRP, remove the platelet-poor plasma (PPP) and resuspend the platelet pellet in 30 ml of Tyrode's buffer containing 0.35% HSA, heparin, and PGI₂ from step 5.
7. Incubate the suspension for 10 min at 37°C. Add ?an additional? 0.5 μl/ml of PGI₂ (10⁻³ M) and centrifuge 8 min at 1900 × g, 37°C. Employ the same centrifugation acceleration and deceleration parameters as were used for preparing the PRP.

**SUPPORT
PROTOCOL 1**

**Receptor Binding
1.35.13**

Table 1.35.12 Preparation of Washed Platelets: Centrifugation Parameters

	Blood/PRP quantity (ml)		RCF (($\times$ g))	Time (min)	Menu
	15-ml vial	50-ml vial			
Blood	15	50	250	16	QC run : NO slow start: NO
	10	40	250	15	slow stop: Y
	6	25	250	13	deceleration 8 brake off: NO set up run: NO
	10	40	2200	16	QC run : NO
PRP	9	35	2200	15	slow start: NO
	8	30	2200	14	slow stop: Y
	6,5	25	2200	13	deceleration 10
	5	20	2200	12	brake off: NO
	4,5	15	2200	10	set up run: NO

8. Add 0.5 μ l/ml of PGI₂ (10^{-3} M) to 30 ml of Tyrode's buffer containing 0.35% HSA.
9. After centrifugation of the platelet suspension, remove the supernatant with a pipet and resuspend the platelet pellet in 30 ml of Tyrode's buffer containing 0.35% HSA and PGI₂. Determine the platelet count in an automated blood cell counter.
10. Incubate the suspension for 10 min at 37°C, then add 0.5 μ l/ml of PGI₂ (10^{-3} M) and centrifuge 8 min at $1900 \times g$, 37°C. Remove the supernatant.
11. Add the appropriate volume of Tyrode's buffer containing 0.35% HSA to obtain a platelet suspension with a final count of 6×10^5 platelets/ μ l. Add 0.02 U/ml of the ADP scavenger apyrase.
This concentration of ADP scavenger apyrase will prevent the desensitization of platelet ADP receptors during storage.
12. Following centrifugation of the platelet suspension, remove the supernatant and resuspend the platelet pellet in the appropriate volume of Tyrode's buffer containing 0.35% HSA and apyrase to obtain 6×10^5 platelets/ μ l.
The platelets must be kept at 37°C throughout all experiments. Wait 30 min before initiating the binding experiments to ensure there is no trace of apyrase in the supernatant.

SUPPORT PROTOCOL 2

PREPARATION OF A CELL SUSPENSION TO CHARACTERIZE P2Y₁₂ RECEPTORS ON THE CELL SURFACE

A suspension containing 2×10^6 cells/ml is used to characterize P2Y₁₂ receptors on the cell surface. Shown below is a protocol used to prepare such a suspension using adherent or suspended cultured cells.

Materials

Adherent cell line: e.g., 13.21N1 astrocytoma cells (ATCC #??) cultured in 175-cm² flasks

Dulbecco's phosphate-buffered saline without Ca or Mg (CMF-DPBS; Life Technologies, cat. no. 14190-094)

[³H]PSB-0413
Binding to P2Y₁₂
Receptors

1.35.14

TrypLE Express (Life Technologies, cat. no. 12605-028) DMEM medium (Life Technologies, cat. no. 424230-025) containing ??% fetal bovine serum (FBS)
Bovine serum albumin (BSA), fatty acid-free (Sigma-Aldrich, cat. no. A1887)
50-ml conical centrifuge tubes (Sarstedt, cat. no. 62547254,)
Cell counter or hemacytometer
Centrifuge

NOTE: Begin this protocol at step 5 when using a cultured cell line in suspension.

1. Remove the medium from the plate of adherent cells.

Because a saturation experiment requires the determination of total and nonspecific binding, two 175-cm² flasks containing 6×10^7 cells are needed, whereas one 175-cm² flask is sufficient for a competition experiment.

2. Wash the cells twice with 10 ml of CMF-DPBS by adding the CMF-DPBS to the monolayer and then aspirating.
3. Add 6 ml of TrypLE Express and incubate the samples at room temperature for 3 min or until all the cells detach.
4. Add 14 ml of DMEM medium containing ??% serum and transfer all the cells into a 50-ml conical centrifuge tube.
5. Determine the cell concentration using a cell counter or hemacytometer.
6. Take an aliquot corresponding to the needed quantity of cells and centrifuge 5 min at $100 \times g$, room temperature. Remove the supernatant.
7. Resuspend the cultured cell pellet in the appropriate volume of CMF-PBS containing 0.1% BSA to a concentration of 2×10^6 cells/ml.
8. Store the suspension at 37°C until the experiment.

REAGENTS AND SOLUTIONS

Use deionized, distilled water in all recipes and protocol steps. For common stock solutions, see APPENDIX 2A.

ADP for competition assay

For platelet experiments: Prepare a 100 mM solution of ADP immediately before use by dissolving 7.0 mg of ADP (adenosine 5'-diphosphate sodium salt; Sigma-Aldrich, cat. no. A2754) in 164 μ l of cold CMF-DPBS (Life Technologies, cat. no. 14190-094). Keep on ice.

For cell culture experiments: Prepare a 200 mM solution of ADP immediately before use by dissolving 14.0 mg of ADP (adenosine 5'-diphosphate sodium salt; Sigma-Aldrich, cat. no. A2754) into 164 μ l of cold CMF-DPBS. Keep on ice.

ADP for saturation assay

For platelet experiments: Prepare a 10 mM solution of ADP immediately before use. To this end, weigh out 5.0 mg of ADP (adenosine 5'-diphosphate sodium salt; Sigma-Aldrich, cat. no. A2754) and dissolve it in 1.17 ml of cold CMF-DPBS. Store on ice until use.

For cell culture experiments: Prepare a 20 mM solution of ADP immediately before use. In this case, dissolve 10.0 mg of ADP adenosine 5'-diphosphate sodium salt (Sigma-Aldrich, cat. no. A2754) into 1.17 ml of cold CMF-DPBS (adenosine 5'-diphosphate sodium salt; Sigma-Aldrich, cat. no. A2754). Store on ice until use.

[³H]PSB-0413 dilutions

For platelet experiments: Prepare a 2×10^{-7} M solution of [³H]PSB-0413 immediately before use by adding 10 μ l of the stock 2×10^{-5} M solution of the radioligand (GE Healthcare) to 990 μ l of cold CMF-DPBS (Life Technologies, cat. no. 14190-094). Keep on ice. See Table 1.35.1 for concentrations/volumes to use in the assay.

For cell culture experiments: Prepare a 4×10^{-7} M solution of [³H]PSB-0413 immediately before use by adding 20 μ l of the stock 2×10^{-5} M solution of the radioligand (GE Healthcare) to 980 μ l of cold CMF-DPBS (Life Technologies, cat. no. 14190-094). Keep on ice. See Table 1.35.2 for concentrations/volumes to use in the assay.

All the reagents described in this section must be maintained at 4°C until the experiment is initiated.

Tyrode's buffer containing 0.35% HSA

Prepare 200 ml of a stock solution of Tyrode's buffer (137 mM NaCl, 2 mM KCl, 12 mM NaHCO₃, 0.3 mM NaH₂PO₄, 1 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, 5.5 mM glucose, 5 mM HEPES, pH 7.3) containing 0.35% human serum albumin (HSA). Store up to ?? at ??°C.

COMMENTARY

Background Information

Prior to 2005, the only way to quantify and characterize P2Y₁₂ receptors on blood platelets was to use the nonselective, radio-labeled P2Y agonist [³³P]2-methylthio-ADP (Chhatrivala et al., 2004) in the presence of a P2Y₁ antagonist such as MRS2179 (Baurand et al., 2001; Jacobson and Boeynaems, 2010). The development of [³H]PSB-0413, the first selective radiolabeled P2Y₁₂ receptor antagonist, made possible the direct quantification of P2Y₁₂ receptors even in the presence of other types of P2Y binding sites. In addition, a tritium-labeled ligand is preferred over one containing ³³P or ¹²⁵I.

Critical Parameters

Nonspecific and specific binding

In saturation experiments, the nonspecific binding is non-saturable and should represent less than 10% of the total binding. If it exceeds 10%, the number of specific binding sites in the reaction is too low for accurate measurement. For the P2Y₁₂ receptor, the quantity of receptors is increased by increasing the number of platelets or cultured cells in the assay tubes. For platelets, the number of P2Y₁₂ receptors per platelet is approximately 450. Thus, a 200- μ l aliquot of platelet suspension containing 600,000 platelets/ μ l is recommended for performing either saturation or competition experiments. For any other cells, and especially transfected cells, where

the number of P2Y₁₂ receptors per cell is unknown, saturation studies are needed to establish the level of receptor expression ($B_{\max}$) before assessing the affinities of other ligands for the site or exploring downstream signaling and second messenger systems. If the $B_{\max}$ is too low, the nonspecific/specific binding ratio will be too high, compromising the interpretation of the findings.

Number of measurements in a binding assay

Basic Protocols 1 and 2 provide practical guidelines for obtaining an accurate estimate of the binding parameters used to characterize P2Y₁₂ receptors and P2Y₁₂ ligands. Because the K_d of [³H]PSB-0413 is approximately 5 nM, the minimal number of experimental points needed for saturation studies is 10 if the recommended concentrations (Tables 1.35.3 and 1.35.4) of radioligand are employed. However, the number of experimental points may be increased if the quantity of cells is not limited. This is more difficult to accomplish if the experiments are performed on human or rodent blood platelets. Likewise, for competition studies, the number of experimental points may be increased above 10 by including additional concentrations.

Troubleshooting

Common problems encountered with ligand binding experiments, along with troubleshooting hints, are listed on Table 1.35.13.

Table 1.35.13 Troubleshooting Guide for Receptor Binding

Problem	Possible explanations	Solutions proposed
No binding	Number of receptors is too low	Increase the number of receptors (increase the number of cells or the density of expression of the receptor on the cells)
	Concentration of radioligand is too low	Increase the concentration of radioligand
	Radioligand is too old (several years)	Check the expiry date indicated by the manufacturer
No specific binding	Number of receptors is too low	Increase the number of receptors (increase the number of cells or the density of expression of the receptor on the cells)
High nonspecific binding	Radioligand binds to the filter	Increase the number of washing steps
		Increase cell/platelet number

Table 1.35.14 Normal Ranges of K_d and B_{max} Observed in Wild-Type Human and Mouse Blood Platelets and Platelet Membranes

	K_d (nM)	B_{max}
Human platelets	3.3 ± 0.6	425 ± 50 sites/platelet
Human platelet membranes	6.5 ± 3.6	0.5 ± 0.2 pmol/mg
Mouse platelets	14 ± 4.5	634 ± 87 sites/platelet
Mouse platelet membranes	9.1 ± 5.3	0.7 ± 0.3 pmol/mg

Anticipated Results

Saturation binding assays are used to quantitatively assess the expression of P2Y₁₂ receptor on cell membranes. Regardless of the cell type, the receptors can be quantified accurately only if the specific radioligand binding is saturable and reaches a plateau, and if the nonspecific binding is less than 10% of the total binding. To date, human and blood platelets are the only non-transfected cells found to be useful for studying the P2Y₁₂ receptor with [³H]PSB-0413 as the labeling ligand. The typical range of K_d and B_{max} values for these sites on fresh platelets or platelet membranes are shown on Table 1.35.14 (Barber and Jamieson, 1970; Broekman, 1992). Various compounds have been identified (Ohlmann et al., 2013) as competitive displacers of [³H]PSB-0413 binding to human platelet P2Y₁₂ receptors (Table 1.35.15).

The level of expression of the P2Y₁₂ receptors on transfected cells depends on the transfection parameters. From our experience, a level of expression of several thousands (3,000 to 30,000) of receptors per cell is sufficient to perform competition binding experiments. Once the level of expression of the P2Y₁₂ re-

Table 1.35.15 K_i of Various [³H]PSB-0413 Displacer Agents Obtained from Experiment Performed on Human Blood Platelets (Ohlmann et al., 2013)

	$K_i \pm SD$
AR-C69931MX	1.5 ± 0.26 nM
2MeSADP	32.1 ± 3.03 nM
ADP β S	7.3 ± 1.76 μ M
ADP	75 ± 29.3 μ M

ceptors is known, competition experiments to evaluate the potency of various ligands for the site can be undertaken. Of the various cultured cell lines examined, only the 13.21.N1 astrocytoma, HEK, and Jurkat cells have been found to be devoid of endogenous P2Y₁₂ receptors. To date, no differences in binding characteristics have been observed among these the cell types.

Time Considerations

For blood platelet experiments

The procedure for washing blood platelets is somewhat lengthy and needs to be mastered

before initiating binding experiments. For a blood donor without thrombocytopenia, it takes approximately 2.5 hr for an experienced technician to obtain 20 ml of washed platelet suspension at a concentration of 600,000 platelets/ μ l from 50 to 100 ml of whole blood. For the binding experiment, 2 hr are required to prepare the reagents and labeled vials, with the binding assay itself requiring 2 hr, and 1 hr is needed before placing the samples in the scintillation counter. The time needed to quantify the radioactivity in each sample depends on the number of vials. Typically, for an experiment involving 60 vials, a counting time of 5 to 6 hr is needed. In general, 12 to 13 hr are required from the time of blood collection to acquisition of the raw data.

For cell experiments

A sufficient number of cells in culture must be available to perform the saturation or competitive binding experiments. A cultured cell suspension can be prepared within 30 min. The subsequent steps require the same amount of time as for washed platelets. Thus, ~10 to 11 hr will elapse between preparation of the cultured cell suspension and acquisition of the raw data.

Literature Cited

- Bal Dit Sollier, C., Berge, N., Boval, B., Hovsepian, L., and Drouet, L. 2009. Functional variability of platelet response to clopidogrel correlates with P2Y₁₂ receptor occupancy. *Thromb. Haemost.* 101:116-122.
- Baqi, Y., Atzler, K., Kose, M., Glanzel, M., and Muller, C.E. 2009. High-affinity, non-nucleotide-derived competitive antagonists of platelet P2Y₁₂ receptors. *J. Med. Chem.* 52:3784-3793. doi: 10.1021/jm9003297.
- Barber, A.J. and Jamieson, G.A. 1970. Isolation and characterization of plasma membranes from human blood platelets. *J. Biol. Chem.* 245:6357-6365.
- Baurand, A., Raboisson, P., Freund, M., Leon, C., Cazenave, J.P., Bourguignon, J.J., and Gachet, C. 2001. Inhibition of platelet function by administration of MRS2179, a P2Y₁ receptor antagonist. *Eur. J. Pharmacol.* 412:213-221. doi: 10.1016/S0014-2999(01)00733-6.
- Broekman, M.J. 1992. Homogenization by nitrogen cavitation technique applied to platelet subcellular fractionation. *Meth. Enzymol.* 215:21-32. doi: 10.1016/0076-6879(92)15049-I.
- Cattaneo, M. 2011. The platelet P2Y₁₂ receptor for adenosine diphosphate: Congenital and drug-induced defects. *Blood* 117:2102-2112. doi: 10.1182/blood-2010-08-263111.
- Cattaneo, M., Zighetti, M.L., Lombardi, R., Martinez, C., Lecchi, A., Conley, P.B., Ware, J., and Ruggeri, Z.M. 2003. Molecular bases of defective signal transduction in the platelet P2Y₁₂ receptor of a patient with congenital bleeding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100:1978-1983. doi: 10.1073/pnas.0437879100.
- Cazenave, J.P., Ohlmann, P., Cassel, D., Eckly, A., Hechler, B., and Gachet, C. 2004. Preparation of washed platelet suspensions from human and rodent blood. *Methods Mol. Biol.* 272:13-28.
- Cheng, Y. and Prusoff, W.H. 1973. Relationship between the inhibition constant (K_i) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I₅₀) of an enzymatic reaction. *Biochem. Pharmacol.* 22:3099-3108. doi: 10.1016/0006-2952(73)90196-2.
- Chhatiwala, M., Ravi, R.G., Patel, R.I., Boyer, J.L., Jacobson, K.A., and Harden, T.K. 2004. Induction of novel agonist selectivity for the ADP-activated P2Y₁ receptor versus the ADP-activated P2Y₁₂ and P2Y₁₃ receptors by conformational constraint of an ADP analog. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 311:1038-1043. doi: 10.1124/jpet.104.068650.
- Daly, M.E., Dawood, B.B., Lester, W.A., Peake, I.R., Rodeghiero, F., Goodeve, A.C., Makris, M., Wilde, J.T., Mumford, A.D., Watson, S.P., and Mundell, S.J. 2009. Identification and characterization of a novel P2Y₁₂ variant in a patient diagnosed with type 1 von Willebrand disease in the European MCMDM-1VWD study. *Blood* 113:4110-4113. doi: 10.1182/blood-2008-11-190850.
- Davenport, A.P. and Russell, F.D. 1996. Current Directions in Radiopharmaceutical Research and Development. Springer, The Netherlands.
- El-Tayeb, A., Griessmeier, K.J., and Muller, C.E. 2005. Synthesis and preliminary evaluation of [3H]PSB-0413, a selective antagonist radioligand for platelet P2Y₁₂ receptors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 15:5450-5452. doi: 10.1016/j.bmcl.2005.08.104.
- Gachet, C. 2008. P2 receptors, platelet function and pharmacological implications. *Thromb. Haemost.* 99:466-472.
- Gachet, C. 2012. P2Y₁₂ receptors in platelets and other hematopoietic and non-hematopoietic cells. *Purinergic Signal.* 8:609-619. doi: 10.1007/s11302-012-9303-x.
- Houston, D., Ohno, M., Nicholas, R.A., Jacobson, K.A., and Harden, T.K. 2006. [32P]2-iodo-N⁶-methyl-(N)-methanocarba-2'-deoxyadenosine-3',5'-bisphosphate ([32P]MRS2500), a novel radioligand for quantification of native P2Y₁ receptors. *Br. J. Pharmacol.* 147:459-467. doi: 10.1038/sj.bjp.0706453.
- Jacobson, K.A. and Boeynaems, J.M. 2010. P2Y nucleotide receptors: Promise of therapeutic applications. *Drug Discov. Today* 15:570-578. doi: 10.1016/j.drudis.2010.05.011.
- Lecchi, A., Razzari, C., Paoletta, S., Dupuis, A., Nakamura, L., Ohlmann, P., Gachet, C., Jacobson, K.A., Zieger, B., and Cattaneo, M. 2015. Identification of a new dysfunctional platelet P2Y₁₂ receptor variant associated with bleeding diathesis. *Blood* 125:1006-1013. doi: 10.1182/blood-2013-07-517896.

Moheimani, F. and Jackson, D.E. 2012. P2Y₁₂ receptor: Platelet thrombus formation and medical interventions. *Int. J. Hematol.* 96:572-587. doi: 10.1007/s12185-012-1188-5.

Ohlmann, P., Lecchi, A., El-Tayeb, A., Muller, C.E., Cattaneo, M., and Gachet, C. 2013. The platelet P2Y₁₂ receptor under normal and pathological conditions. Assessment with the radiolabeled selective antagonist [(3)H]PSB-0413. *Purinergic Signal.* 9:59-66. doi: 10.1007/s11302-012-9329-0.

Zhang, J., Zhang, K., Gao, Z.G., Paoletta, S., Zhang, D., Han, G.W., Li, T., Ma, L., Zhang, W., Muller, C.E., Yang, H., Jiang, H., Cherezov, V., Katritch, V., Jacobson, K.A., Stevens, R.C., Wu, B., and Zhao, Q. 2014a. Agonist-bound structure of the

human P2Y₁₂ receptor. *Nature* 509:119-122. doi: 10.1038/nature13288.

Zhang, K., Zhang, J., Gao, Z.G., Zhang, D., Zhu, L., Han, G.W., Moss, S.M., Paoletta, S., Kiselev, E., Lu, W., Fenalti, G., Zhang, W., Muller, C.E., Yang, H., Jiang, H., Cherezov, V., Katritch, V., Jacobson, K.A., Stevens, R.C., Wu, B., and Zhao, Q. 2014b. Structure of the human P2Y₁₂ receptor in complex with an antithrombotic drug. *Nature* 509:115-118. doi: 10.1038/nature13083.

Internet Resources

<http://www.guidetopharmacology.org/GRAC/FamilyDisplayForward?familyId=52>

IUPHAR. *Guide to pharmacology: P2Y receptor.*

FOR REVIEW ONLY

5.3 Annexe 3

Identification of a new dysfunctional platelet P2Y₁₂ receptor variant, associated with bleeding diathesis

Blood, 5 February 2015, Volume 125, Number 6

Regular Article

PLATELETS AND THROMBOPOIESIS

Identification of a new dysfunctional platelet P2Y₁₂ receptor variant associated with bleeding diathesis

Anna Lecchi,¹ Cristina Razzari,² Silvia Paoletta,³ Arnaud Dupuis,⁴ Lea Nakamura,⁵ Philippe Ohlmann,⁴ Christian Gachet,⁴ Kenneth A. Jacobson,³ Barbara Zieger,⁵ and Marco Cattaneo²

¹Angelo Bianchi Bonomi Hemophilia and Thrombosis Center, Fondazione Istituto di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico Ca' Granda - Ospedale Maggiore Policlinico, Milan, Italy; ²Divisione di Medicina 3, Ospedale San Paolo, Dipartimento di Scienze della Salute - Università degli Studi di Milano, Milan, Italy; ³Molecular Recognition Section, Laboratory of Bioorganic Chemistry, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, National Institutes of Health, Bethesda, MD; ⁴Unité Mixte de Recherche_S949, Inserm, Université de Strasbourg, Etablissement Français du Sang-Alsace, Strasbourg, France; and ⁵Department of Pediatrics and Adolescent Medicine, University Medical Center Freiburg, Freiburg, Germany

Key Points

- Two patients with bleeding diathesis had dysfunctional platelet P2Y₁₂R for ADP, attributable to homozygous His187Gln mutation.
- These studies delineate a region of transmembrane 5 of P2Y₁₂R that is required for normal function after ADP binding.

Defects of the platelet P2Y₁₂ receptor (P2Y₁₂R) for adenosine diphosphate (ADP) are associated with increased bleeding risk. The study of molecular abnormalities associated with inherited qualitative defects of the P2Y₁₂R protein is useful to unravel structure-function relationships of the receptor. We describe the case of 2 brothers, sons of first cousins, with lifelong history of abnormal bleeding, associated with dysfunctional P2Y₁₂R and a previously undescribed missense mutation in the encoding gene. ADP (4–20 μM)–induced aggregation of patients' platelets was markedly reduced and rapidly reversible. Other agonists induced borderline-normal aggregation. Inhibition of vasodilator-stimulated phosphoprotein phosphorylation and prostaglandin E₁–induced increase in cyclic adenosine monophosphate (cAMP) by ADP was impaired, whereas inhibition of cAMP increase by epinephrine was normal. [³H]PSB-0413, a selective P2Y₁₂R antagonist, bound to a normal number of binding sites; however, its affinity, and that of the agonists ADP and 2-methylthio-adenosine-5'-diphosphate, was reduced. Patients' DNA showed a homozygous c.847T>A substitution that

changed the codon for His-187 to Gln (p.His187Gln). Crystallographic data and molecular modeling studies indicated that His187 in transmembrane 5 is important for agonist and nucleotide antagonist binding and located in a region undergoing conformational changes. These studies delineate a region of P2Y₁₂R required for normal function after ADP binding. (*Blood*. 2015; 125(6):1006–1013)

Introduction

P2Y₁₂, which maps to chromosome 3q21–q25, is 1 of the 2 receptors for adenosine diphosphate (ADP) that are expressed by platelets.^{1,2} It is a G inhibitory protein (Gi)-coupled receptor that plays an important role both in hemostasis and thrombosis. This role is demonstrated by the observations that patients with inherited defects of the receptor display a bleeding diathesis^{2,3} and patients with clinical manifestations of atherothrombosis are protected from major adverse cardiovascular events by P2Y₁₂ receptor (P2Y₁₂R) inhibitors.⁴

Congenital P2Y₁₂R defects are autosomal recessive disorders, associated with qualitative or quantitative abnormalities of the receptor.² Affected patients display a bleeding diathesis of variable severity, characterized by mucocutaneous bleeding and excessive postsurgical or posttraumatic blood loss. The most typical platelet function abnormality of the disorder, which should raise the diagnostic suspicion of the disease, is the failure by ADP, even at very high concentrations (>10 μM), to induce full and irreversible platelet aggregation.^{2,5} Tests that evaluate the degree of inhibition of adenylyl cyclase by ADP, by measuring either the platelet levels of cyclic

adenosine monophosphate (cAMP) or the phosphorylation of vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) after the exposure of platelets to prostaglandin (PG) E₁ or other stimuli for adenylyl cyclase, should be used to confirm the diagnosis.^{2,6}

The study of molecular abnormalities associated with inherited qualitative defects of the P2Y₁₂R protein is useful to unravel structure-function relationships of the receptor. Mutations in the region that spans the transition between transmembrane helix (TM) 6 and extracellular loop (EL) 3 are associated with receptor dysfunction despite normal ligand binding, suggesting that this region of the molecule plays a role in signal transduction.^{2,7–9} A heterozygous mutation, predicting a lysine to glutamate (p.Lys174Glu) substitution in the P2Y₁₂R, was identified in 1 patient with reduced and reversible aggregation in response to ADP and an ~50% reduction in binding of agonist radioligand [³H]2-methylthio-adenosine-5'-diphosphate (2MeSADP).¹⁰ Considering that Lys174 is situated in the EL2 of the P2Y₁₂R, adjacent to Cys175, which may be important for the integrity of the ADP binding site on the receptor,¹¹ and that a hemagglutinin-tagged

Submitted July 26, 2013; accepted November 21, 2014. Prepublished online as *Blood* First Edition paper, November 26, 2014; DOI 10.1182/blood-2013-07-517896.

B.Z. and M.C. contributed equally to this study.

There is an Inside *Blood* Commentary on this article in this issue.

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. Therefore, and solely to indicate this fact, this article is hereby marked "advertisement" in accordance with 18 USC section 1734.

p.Lys174Glu P2Y₁₂R variant showed surface expression in Chinese hamster ovary cells, it was hypothesized that the p.Lys174Glu mutation inhibits ADP binding to the receptor. Recently reported crystallographic data^{12,13} do not show a direct involvement of Lys174 in agonist binding but rather a role in stabilizing the receptor conformation through interresidue ionic interactions and/or in affecting the approach of the ligand to its binding site. In one patient, with no personal history of abnormal bleeding, reduced expression of P2Y₁₂R was associated with the heterozygous mutation p.Pro341Ala, in a putative postsynaptic density 95/disc large/zonula occludens-1-binding motif, most likely as a consequence of significantly compromised P2Y₁₂R recycling.¹⁴

Here, we report the case of an index patient and his brother, with an inherited dysfunctional P2Y₁₂R associated with a normal number of platelet binding sites but reduced affinity for the P2Y₁₂R antagonist radioligand [³H]2-Propylthioadenosine-5'-adenylic acid (1,1-chloro-1-phosphonomethyl-1-phosphonyl)anhydride ([³H]PSB-0413),^{15,16} ADP, and 2MeSADP, and with homozygous c.847T>A substitution, which changed the codon for His187 to Gln (p.His187Gln).

Methods

Patients and controls

The proband (III-7 in Figure 1) is a 45-year-old man living in Germany, who belongs to a large family of Turkish origin (Figure 1). He presented with recurrent epistaxis, postoperative bleeding after tooth extraction, thyroid explantation because of thyroid hyperplasia, and spleen explantation, consequent to spleen rupture in a car accident. He had normal platelet count ($307 \times 10^9/L$), screening coagulation tests (prothrombin time and activated partial thromboplastin time), and plasma levels of von Willebrand factor antigen and ristocetin cofactor activity. Serum thromboxane B₂ levels and the platelet contents of serotonin, ADP, adenosine triphosphate (ATP), and fibrinogen were normal. Blood samples for genetic studies were available from his parents, who are first cousins, and 9 relatives (2 grandparents and 7 brothers and sisters), with negative, mild, or severe bleeding history. The 57-year-old brother, with severe bleeding history (III-1, Figure 1), also provided blood samples for platelet function studies.

A total of 36 healthy subjects, with no personal history of abnormal bleeding, were also studied. All subjects gave consent to the study.

Materials

[³H]PSB-0413 was prepared by catalytic hydrogenation with tritium gas (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) of the propargyl precursor PSB-0412 as described.¹⁵ ADP, 2MeSADP, collagen, the thromboxane/prostaglandin endoperoxide analog 9,11-dideoxy-11,9-epoxymethano-prostaglandin F₂, thrombin receptor activating peptide 6, PGE₁, and PGI₂, were from Sigma (St. Louis, MO). Apyrase was purified from potatoes.¹⁷ Commercial preparations of luciferin/luciferase reagent were used to measure the platelet ATP and ADP contents (ATP Assay Kit; BioOrbit Oy, Turku, Finland), and platelet secretion concurrently with platelet aggregation (Chronolume; Chrono-log Corp., Havertown, PA). Serum thromboxane B₂ was measured by a commercially available enzymatic immunoassay (Thromboxane B₂ EIA kit; Cayman Chemical Co., Ann Arbor, MI).

Preparation of platelet-rich plasma (PRP) and washed platelet suspensions

For studies with PRP, 9 volumes of blood were drawn into 1 volume of 109 mmol/L trisodium citrate and then centrifuged at 200g for 10 minutes.^{18,19} The supernatant PRP was transferred into a clean plastic tube; the platelet counts in PRP samples were adjusted to $2.5 \times 10^{11}/L$ in experiments performed in Freiburg (Germany) and not adjusted to a predefined value in experiments performed in Milan (Italy) and Strasbourg (France).^{18,20} For the

preparation of washed platelet suspensions, 6 volumes of blood were drawn into 1 volume of acid-citrate-dextrose anticoagulant, centrifuged at 200g for 10 minutes to obtain PRP, which was used to prepare twice-washed platelet suspensions, according to the method described by Mustard et al,²¹ with the exception that 500 nmol/L PGI₂ was added during the first and second washes. Platelet counts in washed platelet suspensions were adjusted to $3 \times 10^{11}/L$.

Studies of platelet aggregation and secretion

The first screening of platelet aggregation in patient III-7 was performed in Freiburg (Germany), using the light transmission aggregometer ATRACT 4 (Labor Fibrinometer, Ahrensburg, Germany), and collagen (Nycomed, Austria) and ADP (MP Biomedicals) as agonists. Two separate sets of experiments were subsequently done in Milan (Italy), where platelet aggregation and secretion were studied simultaneously by lumi-aggregometry. Samples of PRP (0.45 mL) were incubated with 50 μ L luciferine/luciferase reagent at 37°C for 30 seconds and stirred at 1000 rpm in a lumi-aggregometer (Lumi-aggregometer; Chrono-log Corp.). After incubation, 10 μ L of an aggregating agent was added, and the aggregation and ATP secretion tracings were recorded for 3 minutes. Platelet aggregation of patient III-1 was studied in Strasbourg (France) in an ATRACT 4004 aggregometer.

Binding of fluorescein-conjugated fibrinogen to activated platelets

To measure the binding of fibrinogen to activated platelets, aliquots of 100 μ L PRP ($5 \times 10^{10}/L$) were mixed with fluorescein-conjugated fibrinogen (final concentration 150 μ g/mL) and were stimulated with different concentrations of ADP (0.25–2.0 μ mol/L). After 3 minutes incubation, 100 μ L 1% formaldehyde was added at room temperature. Platelets were then washed with phosphate-buffered saline and then diluted in 500 μ L phosphate-buffered saline for analysis on FACS Calibur (Becton Dickinson, Germany). Histograms were obtained from 5000 cells, and the data were analyzed using the software CellQuest Pro (Becton Dickinson). Mean fluorescence intensities (MFIs) vs cell number were expressed in a linear mode.

Binding of [³H]PSB-0413 to washed platelets

Binding experiments were performed using [³H]PSB-0413, which is a tritiated derivative of a selective nucleotide antagonist of the P2Y₁₂R, AR-C67085MX [2-propylthioadenosine-5'-adenylic acid (1,1-chloro-1-phosphonomethyl-1-phosphonyl)anhydride]], and 9×10^7 washed platelets.¹⁵ Nonspecific binding was defined in the presence of 1 mM ADP. Washed platelets were incubated with the ligand at 37°C for 5 minutes; then bound and free radioactivity was separated by filtration through Whatman GF/B glass-fiber filters. Filters were then washed with 5×2 mL of ice-cold washing buffer (Tris HCl, 50 mM, pH 7.5; EDTA, 1 mM; MgCl₂, 5 mM; NaCl, 100 mM). Filter-bound radioactivity was counted in 2-mL liquid scintillation counter. Assays were performed in triplicate in 3 independent experiments, 2 in III-7 and 1 in III-1.

Competition experiments were performed in triplicate using a fixed concentration of [³H]PSB-0413 (200 nM) and increasing concentrations of ADP (10^{-10} – 10^{-2} M) or 2MeSADP (10^{-11} – 10^{-4} M) at 37°C for 5 minutes.

Measurement of platelet cAMP

Platelet cAMP was measured by a radioisotopic assay, using a commercially available kit (Cyclic AMP [³H] assay system; Amersham International, UK). Duplicate samples of 1 mL citrated PRP containing 1 mM theophylline were incubated with Tyrode's buffer and PGE₁ (1 μ M), PGE₁ and ADP or epinephrine (0.1 and 1.0 μ M), or Tyrode's buffer alone in a control mixture. After incubation at 37°C (2 minutes), 1 mL of 5% trichloroacetic acid was added, and the samples were snap-frozen in dry ice and methanol, thawed at ambient temperature, and then shaken at 4°C for 45 minutes. After centrifugation at 4°C for 30 minutes, the supernatant was extracted 3 times with 5 mL of water-saturated ether, dried under a stream of nitrogen at 60°C, and stored at –20°C. Before assay, the samples were reconstituted with 0.05 mol/L Tris buffer containing 4 mmol/L EDTA.

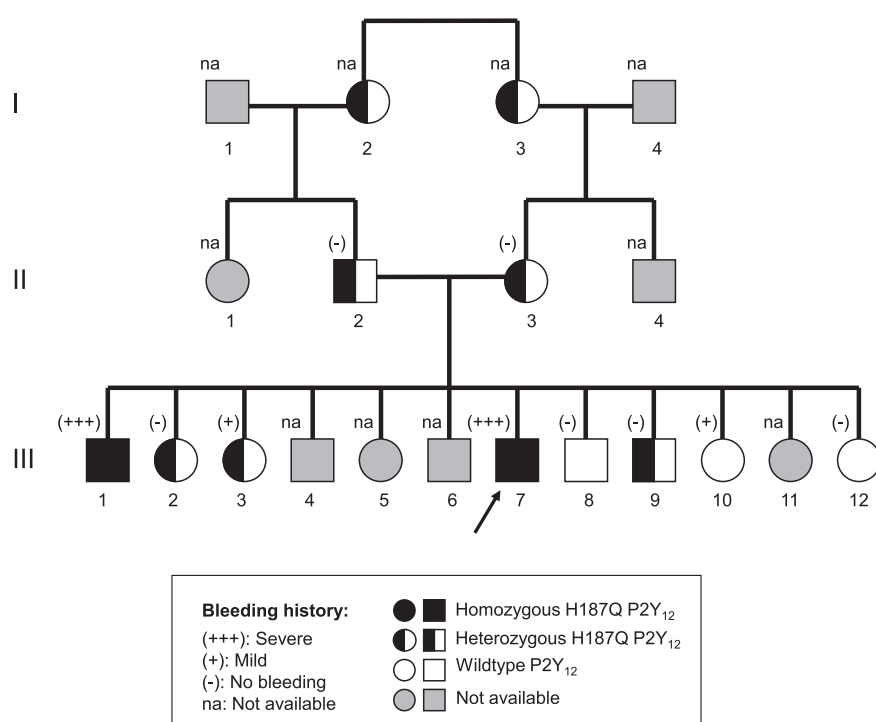


Figure 1. Pedigree of the proband (indicated by an arrow).

VASP phosphorylation analysis

The VASP phosphorylation analysis was performed immediately after blood collection, using Platelet VASP (Diagnostica Stago, Asnières, France) according to the manufacturer's instructions. Briefly, blood samples were incubated with PGE₁ and ADP, alone and in combination, for 10 minutes and fixed with paraformaldehyde. Platelets were then permeabilized with a nonionic detergent, labeled with a primary monoclonal antibody (16C2), followed by a secondary fluorescein isothiocyanate-conjugated polyclonal goat anti-mouse Ig antibody. Analyses were performed using a Becton Dickinson (Plymouth, UK) FACS Calibur flow cytometer. The platelet population was identified from its forward and side scatter distribution, and 10 000 platelets were gated. Platelet reactivity index (PRI) was calculated from the MFI, reflecting VASP phosphorylation, of samples incubated with PGE₁ or PGE₁ plus ADP, according to the following formula: $PRI = [(MFI_{(PGE_1 + ADP)} - MFI_{(PGE_1)}) / MFI_{(PGE_1)}] \times 100$. The analysis was completed in ~30 minutes following blood sampling.

Genetic studies

Genomic DNA was isolated from peripheral blood lymphocytes using standard procedures. The entire coding sequence of the P2Y₁₂R gene was amplified by a single polymerase chain reaction (PCR). PCR was performed using the primers (forward) 5'-CCTTAGGCTGAAAATAACCATCCTC-3' and (reverse) 5'-GCGCTTTGCTTTAACGAGTTCTGAAC-3', with DreamTaq Green Polymerase, 10× DreamTaq Green (Fermentas ThermoFisher Scientific Inc., Waltham, MA) and 2'-deoxynucleoside 5'-triphosphate mix (Invitrogen-Life Technologies Corp., Carlsbad, CA). The amplified fragments were subjected to DNA sequence analysis by ABI 3730xl 96-capillary DNA Analyzers (Eurofins MWG Operon, Huntsville, AL).

Molecular modeling of the P2Y₁₂R

The recently resolved crystallographic structures of the human P2Y₁₂R in complex with the antagonist AZD1283 (Protein Data Bank ID: 4NTJ)¹² and with the full agonist 2MeSADP (Protein Data Bank ID: 4PXZ)¹³ were used in this study. Models of the P2Y₁₂R Gln-187 variant, based on the agonist-bound P2Y₁₂R structure, were built by mutating His187 to Gln directly in the structure and then by modifying its conformation by selecting 5 different, suitable rotamers.

All P2Y₁₂R structures were prepared using the Protein Preparation Wizard tool²² implemented in the Schrödinger suite,²³ adding all the hydrogen atoms and the missing side chains of residues whose backbone coordinates were observed in the structure. The orientation of polar hydrogens was optimized, the protein protonation states were adjusted, and the overall structures were minimized with harmonic restraints on the heavy atoms, to remove strain. Then, all the heterogroups and water molecules were deleted.

The SiteMap tool of the Schrödinger suite was used to identify potential binding sites in the structures. Molecular docking of PSB-0413 at the agonist-bound P2Y₁₂R crystal and at the P2Y₁₂ Gln-187 variant models was performed by means of the Glide package²⁴ from the Schrödinger suite.²³ In particular, a Glide Grid was centered on the centroid of residues located within 6 Å from the previously identified cavity. The Glide Grid was built using an inner box (ligand diameter midpoint box) of 14 Å × 14 Å × 14 Å and an outer box (box within which all the ligand atoms must be contained) that extended 20 Å in each direction from the inner one. Docking of the ligand was performed in the rigid binding sites using the XP (extra precision) procedure. The top-scoring docking poses of the ligand were subjected to visual inspection and analysis of protein-ligand interactions to select the final binding conformations.

Results

Studies in patient III-7 (propositus)

Platelet aggregation and secretion. The platelets from patient III-7 changed shape normally following stimulation with 1 μM ADP (not shown) and underwent aggregation in response to 4-20 μM ADP that was markedly lower than normal and rapidly reversible (Figure 2). The aggregation of these platelets in response to other platelet agonists was normal (not shown). Very similar results were obtained in experiments performed in Freiburg (Figure 2) and in Milan (not shown). The ATP secretion from patient platelets was absent after stimulation by ADP, and normal after stimulation by other agonists (Table 1).

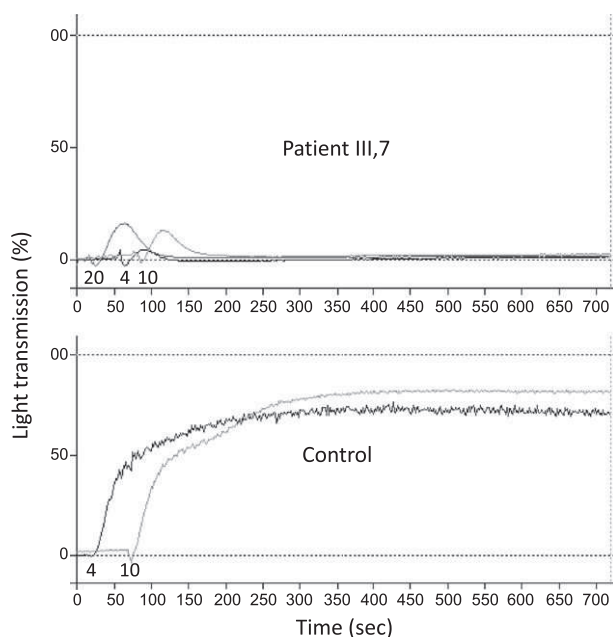


Figure 2. ADP-induced platelet aggregation in PRP from a normal control and from patient III-7. Numbers below the aggregation tracings indicate the concentration of ADP added (μ M). These experiments were performed using the light transmission aggregometer APACT 4 (Labor Fibrinometer).

Binding of fluorescein-conjugated fibrinogen to ADP-activated platelets. Compared with healthy controls, the amount of fluorescein-conjugated fibrinogen bound to platelets upon stimulation with ADP (0.25–2.0 μ mol/L) was severely impaired (Figure 3).

Inhibition of PGE₁-induced increase in platelet cAMP. The basal level of platelet cAMP was normal (12.2 pmol/ 10^9 platelets; normal range: 6–17.9) and normally increased ~ 10 -fold after stimulation with 1 μ M PGE₁. ADP, in a concentration-dependent manner, inhibited the production of cAMP by normal platelets exposed to PGE₁, but this response was greatly impaired in the patient's platelets (Table 2). In contrast to ADP, epinephrine normally inhibited the production of cAMP in the patient's platelets exposed to PGE₁ (Table 2), suggesting that the defect could be attributed to an abnormality in the platelet P2Y₁₂R responsible for specifically coupling ADP stimulation to adenylyl cyclase inhibition.

VASP phosphorylation assay. The PRI value of patient's platelets was 30% in an experiment done in Milan and 1% in a subsequent experiment done in Freiburg, compared with $78.7 \pm 6.7\%$ in platelets from 31 normal subjects.

Binding of [³H]PSB-0413 to washed platelet suspensions. The binding of [³H]PSB-0413 to patient platelets was measured in 2 separate experiments and compared with that observed in normal volunteers. The specific binding was saturable in both cases, and Scatchard plot analysis yielded a linear fit. The number of binding sites per platelet (B_{max}) was comparable between normal and patient platelets (Table 3); however, the dissociation constant (K_D) values were higher with patient platelets than with normal platelets (Table 3).

Characterization of the P2Y₁₂R gene. The observation that the patient platelets had a normal number of binding sites for [³H]PSB-0413 in spite of a severely impaired function of the P2Y₁₂R suggested that a dysfunctional receptor was being synthesized in normal amounts. To identify the underlying structural changes, we

analyzed the coding sequence of P2Y₁₂R from DNA fragments generated in a PCR reaction. DNA from the patient showed a homozygous c.847T>A substitution that changed the codon for His-187 to Gln (p.His187Gln), located in the TM5 portion of the receptor.

Family studies

For 11 of 20 first- and second-degree relatives of the proband, it was possible to retrieve information on the individual bleeding history and blood samples for DNA extraction and genotyping. Seven subjects (the grandparents, the parents, 2 sisters, and 1 brother) were heterozygous for p.His187Gln, 1 brother and 2 sisters had wild-type (WT) P2Y₁₂R, and 1 brother had homozygous p.His187Gln. The bleeding history was negative in all subjects, except in 2 sisters (1 with heterozygous p.His187Gln P2Y₁₂R, 1 with WT genotype) who had a mild bleeding history, and in the brother (III-1) with homozygous p.His187Gln P2Y₁₂R, who had a severe bleeding history.

Patient III-1 underwent extensive platelet function studies in Strasbourg (France), including platelet aggregation both in PRP and washed platelet suspensions, inhibition of PGE₁-induced increase in platelet cAMP levels by ADP, and VASP phosphorylation assay. The results of these tests were superimposable to those obtained in the proband and compatible with severe defect of P2Y₁₂R function. The VASP-P PRI was 1% in 2 separate experiments, similarly to that obtained in patient III-7 in Freiburg; ADP did not inhibit PGE₁-induced increase in cAMP up to a concentration of 100 μ M. Similarly to the proband, binding studies of [³H]PSB-0413 to his platelets revealed that the B_{max} was normal (693 sites per platelet), whereas the K_D value was higher than normal (19.0 nM) and comparable to the mean K_D value calculated in the 2 experiments with the proband's platelets. The binding affinity (K_i) values for both ADP and 2MeSADP for bound radioligand were higher in patient III-1 than in a healthy control (Figure 4).

Finally, the results of preliminary experiments using 1321N1 astrocytoma cells expressing p.His187Gln P2Y₁₂R were similar to those obtained in patients' platelets: compared with 1321N1 astrocytoma cells expressing WT P2Y₁₂R, we observed decreased affinity for [³H]PSB-0413 and a right shift of the displacement curves using ADP and 2MeSADP (data not shown).

Table 1. Secretion of platelet ATP induced by different agonists in patient III-7

Agonist	Released ATP (nmol/ 10^8 platelets)		
	Patient III-7, experiment 1	Patient III-7, experiment 2	Normal range*
ADP (4 μ M)	Undetectable	Undetectable	0.02–0.98 (n = 96)
ADP (20 μ M)	Undetectable	Undetectable	0.04–0.61 (n = 59)
Collagen (2 μ g/mL)	0.46	0.47	0.17–0.93 (n = 62)
U46619 (0.5 μ M)	0.02	0.03	0.02–1.03 (n = 72)
TRAP-6 (10 μ M)	Not done	0.17	0.01–1.08 (n = 41)

PRP containing trisodium citrate as anticoagulant was stimulated by different agonists at the indicated concentrations.

TRAP-6, thrombin receptor activating peptide 6; U46619, thromboxane/prostaglandin endoperoxide analog 9,11-dideoxy-11,9-epoxymethano-prostaglandin F₂.

*The normal ranges are defined by the 2.5 and 97.5 percentiles of the distribution of values obtained in healthy subjects.

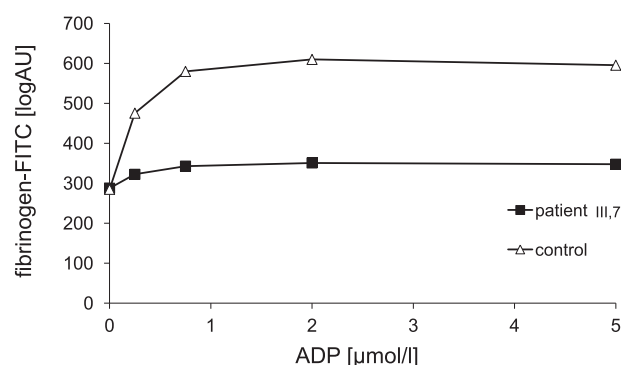


Figure 3. Binding of fluorescein-conjugated fibrinogen to ADP-activated platelets from a healthy control and patient III-7. Fluorescein-conjugated (FITC) fibrinogen binding to PRP stimulated with the indicated concentrations of ADP was measured by flow cytometry (see “Methods” for details). FITC, fluorescein isothiocyanate.

Molecular modeling studies

To predict the implications of the p.His187Gln substitution at a molecular level, we performed molecular modeling studies of the P2Y₁₂R. Two recently published crystallographic structures of the human P2Y₁₂R,^{12,13} in complex with both agonist and antagonist, resulted to be very useful for this study. Moreover, models of the P2Y₁₂R p.His187Gln variant were built using the agonist-bound P2Y₁₂R crystal structure, to analyze the possible structural differences because of this sequence variation.

TM5 in both P2Y₁₂R crystal structures is unusually straight and tilted, because of the absence of proline (eg, position 5.50 following the Ballesteros-Weinstein numbering system)²⁵ or glycine residues in this helix in other G-protein-coupled receptors that destabilize its straight α -helical conformation. Previous modeling attempts of the P2Y₁₂R based on the available crystallographic templates are imprecise because of this difference.

In both structures, the point of mutation is located in the upper part of TM5 facing inward toward the binding site, in proximity of the ligand. Comparison of the 2 different crystallographic structures, agonist and antagonist bound, revealed large conformational changes occurring in TM6 and TM7 but also a slightly different orientation of TM5. Consequently, the conformations of the residues in this helix, including His187 (5.36), differ in the 2 structures. In the WT antagonist-bound P2Y₁₂R structure, the side chain of His187 is more oriented toward TM4 and is delimiting the binding site making hydrophobic interactions with the ligand AZD1283. In the WT agonist-bound P2Y₁₂R structure, the side chain of His187 (5.36) is directly interacting through an H-bond with the 2'-hydroxyl group of 2MeSADP (Figure 5). Moreover, the aromatic ring of this histidine is perpendicular to the adenine core and can stabilize it through hydrophobic interactions. Docking of PSB-0413 at this WT P2Y₁₂R structure closely resembles the binding mode of 2MeSADP (Figure 5). In fact, the adenine bases of the 2 ligands occupy a common aromatic binding site, forming a π - π interaction with Tyr105 (3.33) and H-bonds with Asn191 (5.40). The 2-propylthio group of PSB-0413 extends deeper in the same hydrophobic pocket occupied by the 2-methylthio group of the crystallized agonist and delimited by Phe106 (3.34), Met152 (4.53), Leu155 (4.56), Ser156 (4.57), Val190 (5.39), and Cys194 (5.43). The ribose 2'- and 3'-hydroxyl groups form H-bonding interactions with Lys179 (EL2) and His187 (5.36) and with Lys179 (EL2) and the backbone carbonyl of Cys97 (3.25), respectively. The noncleavable triphosphate-like chain of PSB-0413 is directed toward TM2 and forms numerous

hydrophilic and ionic interactions with Lys80 (2.60), Arg93 (3.21), Arg256 (6.55), Tyr259 (6.58), and Lys280 (7.35).

When docked at the P2Y₁₂R p.His187Gln variant models, PSB-0413 showed the same orientation in the binding site and similar interactions as in the WT receptor (data not shown). However, depending on the rotamer of the side chain of Gln187, the H-bonding network involving the 2'-hydroxyl group can differ. In fact, in some rotamers Gln187 does not form any H-bond with the ligand, while in others it can act as H-bond acceptor or H-bond donor.

Discussion

Congenital defects and pharmacologic inhibition of the P2Y₁₂R for ADP are associated with an increased bleeding risk, demonstrating the important role of this receptor in platelet function and normal hemostasis.²⁶ Most of the congenital defects of P2Y₁₂R characterized to date are associated with a marked decrease of the platelet binding sites for ADP, which has been attributed to mutations that disrupt the synthesis of the receptor,^{2,26-30} to alterations in the ligand binding site,¹⁰ or to compromised P2Y₁₂R recycling.¹⁴ A recently described patient displayed abnormalities in P2Y₁₂R signaling, traffic, and surface expression, which was associated with the substitution of Arg122 with a cysteine.³¹ In 1 kindred, a case of a normal expression of the receptor that was associated with severely defective signal transduction was described.⁷ Nucleotide sequence analysis of the P2Y₁₂ gene revealed that the patient was a compound heterozygote for 2 missense mutations that caused the substitution p.Arg256Gln (in TM6) and p.Arg265Trp (in EL3), suggesting that the structural integrity of TM6 and EL3 regions is necessary for normal receptor function. A heterozygous mutation in the same region of the molecule, p.Pro258Thr, was later described in a patient with mild bleeding disorder and severely impaired ADP-induced platelet aggregation, confirming that this region of the molecule is important for receptor function.⁸ The recently reported crystallographic data for the human P2Y₁₂R support these findings revealing that significant conformational changes occur in the TM6-EL3 region between the agonist- and antagonist-bound structures.^{12,13}

In the present report, we describe the case of a patient and his brother with lifelong bleeding disorder associated with defective P2Y₁₂R-dependent platelet function, associated with normal expression of the receptor but decreased affinity for its ligand. Based on the results of the VASP phosphorylation assay⁶ and on the observation that ADP, up to 100 μ M, failed to inhibit adenylyl cyclase, we may conclude that the function of the mutant receptor is completely suppressed. The moderately reduced PRI value (30%) initially measured by the VASP-P assay in patient III-7 was not reproduced in a second experiment

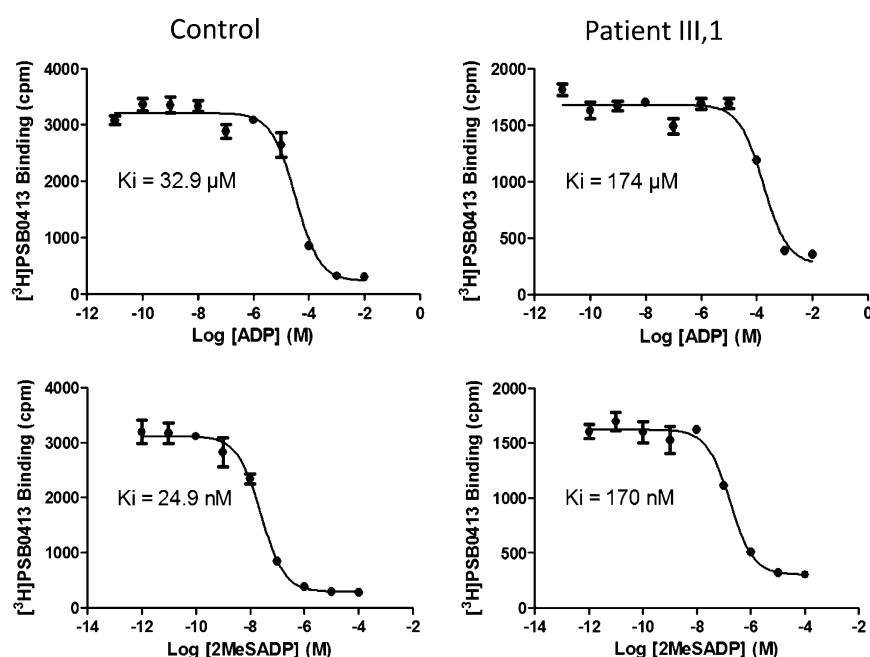
Table 2. Effects of ADP and epinephrine on PGE₁ (1 μ M)-induced increase of cAMP levels in platelets from patient III-7 and healthy controls

	cAMP (% of PGE ₁ -induced)		
	Patient III-7, experiment 1	Patient III-7, experiment 2	Healthy controls* (n = 21)
ADP (0.1 μ M)	90.0	92.8	78.62 $\pm$ 11.58
ADP (1.0 μ M)	107.0	100.0	44.41 $\pm$ 11.88
Epinephrine (1 μ M)	22.0	26.0	30.36 $\pm$ 13.94

PRP containing trisodium citrate as anticoagulant was exposed to PGE₁ (1 μ M) in the presence or absence of ADP or epinephrine at the indicated concentrations for 2 minutes at 37°C (see “Methods” for details).

*Means $\pm$ SD.

Figure 4. Competition of ADP and 2MeSADP for binding of [³H]PSB-0413 to washed platelets from patient III-1 and a healthy control. Higher concentrations of either ADP or 2MeSADP were necessary to displace [³H]PSB-0413 from the patient's platelets, compared with control.



(PRI = 1%) and in 2 experiments performed in patient III-1, suggesting that the results of the first experiment were likely inaccurate.

The bleeding histories of our proband and his brother were clinically relevant and comparable to that of patients with severe P2Y₁₂R deficiency, associated with homozygous base pair deletions in the open reading frame, resulting in frame shifts and premature truncation of the protein.⁵ The study of many relatives of the proband, whose parents were first cousins, depicts a typical inheritance pattern of recessive autosomal diseases. The bleeding history of relatives with heterozygous

p.His187Gln P2Y₁₂R was essentially absent, comparable to that of subjects with the WT receptor, confirming previous observations.²

In order to analyze the structural implications of the p.His187Gln mutation, molecular modeling studies were performed. Recently published crystallographic structures of the P2Y₁₂R^{12,13} revealed that His187 in TM5 is oriented toward the inside of the receptor within the ligand binding site. In particular, the 2MeSADP-bound structure showed a clear role of His187 (5.36) in agonist binding because of the formation of a H-bond with the ligand's 2'-hydroxyl

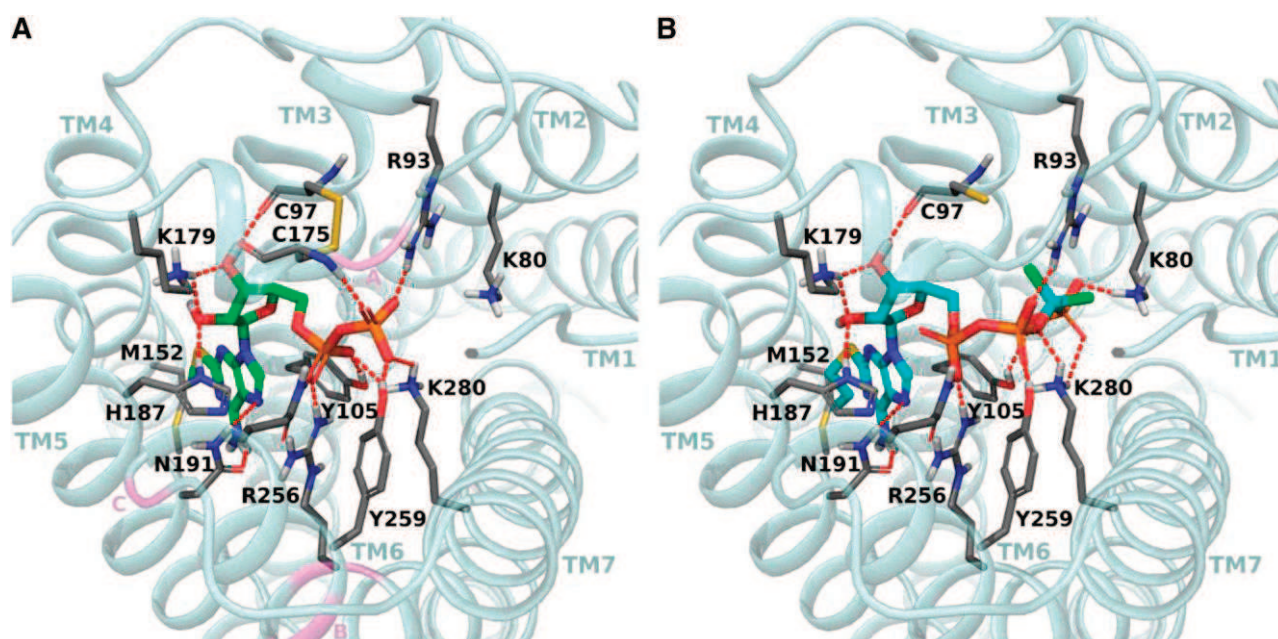


Figure 5. Binding site of the human P2Y₁₂R. Comparison of the crystallographic pose of 2MeSADP (green carbons) (A) and the docking pose of PSB-0413 (cyan carbons) (B) at the WT agonist-bound P2Y₁₂R crystal structure. Side chains of some amino acids important for ligand recognition are highlighted (gray carbon sticks). H-bonding and ionic interactions are pictured as red dotted lines. Nonpolar hydrogen atoms are not displayed. In panel A, ribbon regions corresponding to residues whose mutation is associated with a receptor dysfunction previously reported in patients are highlighted in pink and labeled with pink letters as follows: A, Lys174; B, Arg256, Pro258; and C, Arg265.

Table 3. Binding studies of [³H]PSB-0413 on intact platelets from the proband (III-7) and his brother (III-1) and 10 healthy controls

	Patient III-7, experiment 1	Patient III-7, experiment 2	Patient III-1	Healthy controls* (n = 10)
B _{max} (sites per platelet)	285	436	693	425 ± 50
K _D (nM)	8.4	33.0	19.0	3.3 ± 0.6

*Means ± SD.

group and hydrophobic interactions with adenine. PSB-0413 docking predicted a binding mode similar to the crystallographic pose of the nucleotide agonist. Therefore, the predicted involvement of His187 (5.36) also in PSB-0413 binding can explain the decreased affinity of [³H]PSB-0413 for the patient's platelets, considering that the H187Q mutation can induce suboptimal H-bonding interactions with the ligand and attenuated stabilizing hydrophobic interactions. Moreover, the conformational changes highlighted by the comparison of the agonist- and antagonist-bound P2Y₁₂R structures, involving mainly TM6 and TM7 and partially TM5, suggest that this region of the receptor is important for the activation process. Also, mutagenesis studies have shown the importance of residues located in the TM6-EL3 region for the functional integrity of the P2Y₁₂R. Therefore, the p.His187Gln substitution could alter the interresidue interactions in this region as compared with WT, potentially interfering with conformational rearrangements occurring during the activation process.

In conclusion, His187 (5.36) is important for agonist and nucleotide antagonist (ie, PSB-0413) binding, as highlighted by crystallographic data and docking results, and located in a region undergoing conformational changes. Therefore, we have determined a structural context for the functional consequences of the p.His187Gln substitution in the P2Y₁₂R.

References

- Hollopeter G, Jantzen HM, Vincent D, et al. Identification of the platelet ADP receptor targeted by antithrombotic drugs. *Nature*. 2001;409(6817):202-207.
- Cattaneo M. The platelet P2Y₁₂ receptor for adenosine diphosphate: congenital and drug-induced defects. *Blood*. 2011;117(7):2102-2112.
- Podda G, Femia EA, Pugliano M, Cattaneo M. Congenital defects of platelet function. *Platelets*. 2012;23(7):552-563.
- Cattaneo M. New P2Y₁₂ inhibitors. *Circulation*. 2010;121(1):171-179.
- Cattaneo M, Lecchi A, Randi AM, McGregor JL, Mannucci PM. Identification of a new congenital defect of platelet function characterized by severe impairment of platelet responses to adenosine diphosphate. *Blood*. 1992;80(11):2787-2796.
- Zighetti ML, Carpani G, Sinigaglia E, Cattaneo M. Usefulness of a flow cytometric analysis of intraplatelet VASP phosphorylation for the detection of patients with genetic defects of the platelet P2Y₁₂ receptor for ADP. *J Thromb Haemost*. 2010;8(10):2332-2334.
- Cattaneo M, Zighetti ML, Lombardi R, et al. Molecular bases of defective signal transduction in the platelet P2Y₁₂ receptor of a patient with congenital bleeding. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100(4):1978-1983.
- Remijn JA, Jsseldijk MJ, Strunk AL, et al. Novel molecular defect in the platelet ADP receptor P2Y₁₂ of a patient with haemorrhagic diathesis. *Clin Chem Lab Med*. 2007;45(2):187-189.
- Cattaneo M. Molecular defects of the platelet P2 receptors. *Purinergic Signal*. 2011;7(3):333-339.
- Daly ME, Dawood BB, Lester WA, et al. Identification and characterization of a novel P2Y₁₂ variant in a patient diagnosed with type 1 von Willebrand disease in the European MCMDM-1VWD study. *Blood*. 2009;113(17):4110-4113.
- Algaier I, Jakubowski JA, Asai F, von Kügelgen I. Interaction of the active metabolite of prasugrel, R-138727, with cysteine 97 and cysteine 175 of the human P2Y₁₂ receptor. *J Thromb Haemost*. 2008;6(11):1908-1914.
- Zhang K, Zhang J, Gao ZG, et al. Structure of the human P2Y₁₂ receptor in complex with an antithrombotic drug. *Nature*. 2014;509(7498):115-118.
- Zhang J, Zhang K, Gao ZG, et al. Agonist-bound structure of the human P2Y₁₂ receptor. *Nature*. 2014;509(7498):119-122.
- Nisar S, Daly ME, Federici AB, et al. An intact PDZ motif is essential for correct P2Y₁₂ purinoceptor traffic in human platelets. *Blood*. 2011;118(20):5641-5651.
- El-Tayeb A, Griessmeier KJ, Müller CE. Synthesis and preliminary evaluation of [³H]PSB-0413, a selective antagonist radioligand for platelet P2Y₁₂ receptors. *Bioorg Med Chem Lett*. 2005;15(24):5450-5452.
- Ohlmann P, Lecchi A, El-Tayeb A, Müller CE, Cattaneo M, Gachet C. The platelet P2Y₁₂ receptor under normal and pathological conditions. Assessment with the radiolabeled selective antagonist [³H]PSB-0413. *Purinergic Signal*. 2013;9(1):59-66.
- Molnar J, Lorand L. Studies on apyrases. *Arch Biochem Biophys*. 1961;93:353-363.
- Cattaneo M, Cerletti C, Harrison P, et al. Recommendations for the standardization of light transmission aggregometry: a consensus of the working party from the platelet physiology subcommittee of SSC/ISTH. *J Thromb Haemost*. 2013;11(6):1183-1189.
- Femia EA, Pugliano M, Podda G, Cattaneo M. Comparison of different procedures to prepare platelet-rich plasma for studies of platelet aggregation by light transmission aggregometry. *Platelets*. 2012;23(1):7-10.
- Cattaneo M, Lecchi A, Zighetti ML, Lussana F. Platelet aggregation studies: autologous platelet-poor plasma inhibits platelet aggregation when added to platelet-rich plasma to normalize platelet count. *Haematologica*. 2007;92(5):694-697.
- Mustard JF, Perry DW, Ardlie NG, Packham MA. Preparation of suspensions of washed platelets from humans. *Br J Haematol*. 1972;22(2):193-204.
- Sastry GM, Adzhigirey M, Day T, Annabhimoju R, Sherman W. Protein and ligand preparation: parameters, protocols, and influence on virtual screening enrichments. *J Comput Aided Mol Des*. 2013;27(3):221-234.
- Schrödinger Suite. New York, NY: Schrödinger, LLC; 2013.
- Friesner RA, Banks JL, Murphy RB, et al. Glide: a new approach for rapid, accurate docking and

Acknowledgment

This work was supported by the National Institutes of Health National Institute of Diabetes and Digestive Kidney Diseases Intramural Research Program (K.A.J. and S.P.).

Authorship

Contribution: A.L. performed platelet function studies, analysis of the data, and final approval of the manuscript; C.R. performed DNA analysis, analysis of the data, and final approval of the manuscript; S.P. performed molecular modeling, analysis of the data, and final approval of the manuscript; A.D. and L.N. performed platelet function studies, analysis of the data, and final approval of the manuscript; P.O. performed ligand binding studies, analysis of the data, and final approval of the manuscript; C.G. performed platelet function studies, ligand binding studies, analysis of the data, and final approval of the manuscript; K.A.J. performed molecular modeling, analysis of the data, drafting of part of the manuscript, and final approval of the manuscript; B.Z. performed clinical management of the patients, platelet function studies, analysis of the data, and final approval of the manuscript; and M.C. performed coordination and design of the study, analysis of the data, drafting of the manuscript and final approval of the manuscript.

Conflict-of-interest disclosure: The authors declare no competing financial interests.

Correspondence: Marco Cattaneo, Unità di Medicina 3, Ospedale San Paolo – Università degli Studi di Milano, Via di Rudini 8 20142 Milano, Italy; e-mail: marco.cattaneo@unimi.it.

- scoring. 1. Method and assessment of docking accuracy. *J Med Chem*. 2004;47(7):1739-1749.
25. Ballesteros JA, Weinstein H. Integrated methods for the construction of three-dimensional models and computational probing of structure–function relations in G protein-coupled receptors. In: Sealfon SC, Conn PM, eds. *Methods in Neurosciences*. San Diego, CA: Academic Press; 1995:366-428.
26. Cattaneo M. Bleeding manifestations of congenital and drug-induced defects of the platelet P2Y₁₂ receptor for adenosine diphosphate. *Thromb Haemost*. 2011;105(suppl 1):S67-S74.
27. Nurden P, Savi P, Heilmann E, et al. An inherited bleeding disorder linked to a defective interaction between ADP and its receptor on platelets. Its influence on glycoprotein IIb-IIIa complex function. *J Clin Invest*. 1995;95(4):1612-1622.
28. Cattaneo M, Lecchi A, Lombardi R, Gachet C, Zighetti ML. Platelets from a patient heterozygous for the defect of P2CYC receptors for ADP have a secretion defect despite normal thromboxane A₂ production and normal granule stores: further evidence that some cases of platelet 'primary secretion defect' are heterozygous for a defect of P2CYC receptors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000;20(11):E101-E106.
29. Fontana G, Ware J, Cattaneo M. Haploinsufficiency of the platelet P2Y₁₂ gene in a family with congenital bleeding diathesis. *Haematologica*. 2009;94(4):581-584.
30. Shiraga M, Miyata S, Kato H, et al. Impaired platelet function in a patient with P2Y₁₂ deficiency caused by a mutation in the translation initiation codon. *J Thromb Haemost*. 2005;3(10):2315-2323.
31. Patel YM, Lordkipanidzé M, Lowe GC, et al. A novel mutation in the P2Y₁₂ receptor and a function-reducing polymorphism in protease-activated receptor 1 in a patient with chronic bleeding. *J Thromb Haemost*. 2014;12(5):716-725.



2015 125: 1006-1013
doi:10.1182/blood-2013-07-517896 originally published
online November 26, 2014

Identification of a new dysfunctional platelet P2Y₁₂ receptor variant associated with bleeding diathesis

Anna Lecchi, Cristina Razzari, Silvia Paoletta, Arnaud Dupuis, Lea Nakamura, Philippe Ohlmann, Christian Gachet, Kenneth A. Jacobson, Barbara Zieger and Marco Cattaneo

Updated information and services can be found at:
<http://www.bloodjournal.org/content/125/6/1006.full.html>

Articles on similar topics can be found in the following Blood collections
[Platelets and Thrombopoiesis](#) (597 articles)

Information about reproducing this article in parts or in its entirety may be found online at:
http://www.bloodjournal.org/site/misc/rights.xhtml#repub_requests

Information about ordering reprints may be found online at:
<http://www.bloodjournal.org/site/misc/rights.xhtml#reprints>

Information about subscriptions and ASH membership may be found online at:
<http://www.bloodjournal.org/site/subscriptions/index.xhtml>

5.4 Annexe 4

Techniques utilisées

Extraction d'ADN et d'ARN

Les extractions d'ADN ont été réalisées à partir de 200 µL de sang total à l'aide du kit QiaAmp®DNA Blood Mini kit (Ref 51104) de Qiagen© et selon les recommandations du fabricant.

Les extractions d'ARN ont été réalisées à partir de 100 000 cellules à l'aide du kit RNeasy® Micro kit (Ref 74004) de Qiagen© et selon les recommandations du fabricant.

PCR et séquençage

Amorces d'amplification et de séquençage			
		Sequence 5'-3'	Taille amplicon (pb)
VNUT	Exon 1	Forward : CTC TGC CCC CAC ACT AAC CTC T	491
		Reverse : CCC TCC CCA CCT AGC ATC GT	
	Exon 2	Forward : CTG AGG GAG GTC TCT GAG TGA TGA A	501
		Reverse : GGG TCT TCT GCC CAG ATT TAT CCA	
	Exon 3	Forward : GGG AAG GAG CTT GGT GGA TAA ATC	493
		Reverse : CCC TTG TCT CCC CAC CTG GT	
	Exon 4	Forward : CAG CCC AAA CCT GAG CAG ATA G	502
		Reverse : GGA CGG CAT CTG GCA TCG TTA	
	Exon 5	Forward : GGC GAT GAA AAC ACC CTC TTC TC	496
		Reverse : CCT GTG CCC AGC AGG TCT TC	
	Exon 6+7	Forward : GCA ACC TGA GGC ATG GAC GA	594
		Reverse : GGT GCA GCT CAA GCC TCG TG	
	Exon 8	Forward : GCT GTC CAG CCT GAG TAT CCT CTT	495
		Reverse : GTG GGT CTG GAG CAC ATG GAA C	
	Exon 9	Forward : GCA CGG GAT AGC TGT CTT GA	274
		Reverse : CTG GTC CCA GAT ATC AGG TGA CT	
	Exon 10	Forward : GCT TTC GGG CAG CTG AGT CA	489
		Reverse : CCC AGC TGC CCG TCT TCA TG	
	Exon 11+12	Forward : CCC GCT TCC CCT GTG ACA AC	501
		Reverse : CAG ATG GCG ACT CAT GAG CCA	
	Exon 13	Forward : CCA AGA CCC TCC AAG TCT GAG C	506
		Reverse : TTG TGG ACT CTT CTT AAG GAG CTT	
P2Y12	P2Y12	Forward : ATC AAC AGT TAT CAG GTA ACC AAC AAG AA Reverse : CAC AAA GAG ATT GAA ATA TTT CCT TAG TTA	1093

Toutes les amplifications ont été réalisées avec les kits HotStarTaq® MasterMix (Ref 203445) de Qiagen®, en appliquant le mode opératoire suivant : 50 ng d'ADN sont mis en présence de 12.5 µL de MasterMix, de 1 µL d'amorce sens et antisens à 10 µM chacune dans un volume final de 25 µL.

Les amplifications par PCR ont été réalisées suivant le protocole ci-dessous pour le séquençage des exons du gène SLC17A9 (VNUT).

- 1) Activation de la Taq polymérase et dénaturation : 95°C – 15 min.
- 2) Amplification : 35 cycles :
 - a. Dénaturation : 95°C – 30 sec
 - b. Hybridation : 60°C – 45 sec
 - c. Elongation : 72°C – 45 sec
- 3) Elongation finale : 72°C – 10 min

Les amplifications par PCR ont été réalisées suivant le protocole ci-dessous pour le séquençage du gène *P2RY12*.

- 1) Activation de la Taq polymérase et dénaturation : 95°C – 15 min.
- 2) Amplification 35 cycles :
 - a. Dénaturation : 95°C – 30 sec
 - b. Hybridation : 57°C – 45 sec
 - c. Elongation : 72°C – 45 sec
- 3) Elongation finale : 72°C – 10 min

Les séquençages ont été sous-traités par la société Eurofins Genomics© (<https://eurofinsgenomics.eu/>).

Les alignements de séquences ont été réalisés sur le site internet <http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/> en comparant les séquences obtenues chez les patients avec les séquences de référence disponibles sur le site www.ensembl.org

PCR avec transcription inverse (RT-PCR)

Les PCR avec transcription inverse ont été réalisées à l'aide des amorces suivantes

Amorces de RT-PCR			
		Amorces	Taille amplicon (pb)
Amorces RT	P2Y12	Forward : CAG TTA TCA GGT AAC CAA CAA GAA	584
		Reverse : AGA GTT CGG TCT AGT CTG GCA	
	β2M	Forward : GTG CTC GCG CTA CTC TCT C	150
		Reverse : GTC AAC TTC AAT GTC GGA T	

Les amplifications ont été réalisées avec des kits Qiagen®OneStep RT-PCR kit (Ref 210212), en appliquant le mode opératoire suivant : 300 ng d'ARN sont mis en présence de 10 µL de tampon 5X, 2 µL de dNTP (10 mM chacun), 3 µL d'amorce sens et antisens (10 µM chacune) et 2 µL du tube « Enzymes » contenant à la fois la reverse transcriptase et la polymérase. Le volume final est de 50 µL.

Les amplifications par RT-PCR ont été réalisées suivant le protocole ci-dessous pour la mise en évidence des ARN messagers de P2Y₁₂ et de la β-2-microglobuline qui sert de contrôle aux étapes d'extraction d'ARN, de transcription inverse et d'amplification.

- 1) Transcription inverse, activation de la Taq et dénaturation
 - a. Transcription inverse : 50°C – 30 min
 - b. Dénaturation et activation de la Taq : 95°C – 15 min
- 2) Amplification : 35 cycles
 - a. Dénaturation : 95°C – 30 sec
 - b. Hybridation : 57°C (P2Y₁₂), 60°C (β2M) – 45 sec
 - c. Elongation : 72°C – 45 sec
- 3) Elongation terminale : 72°C – 10 min

Séquençage d'exome sur Illumina HiSeq2000

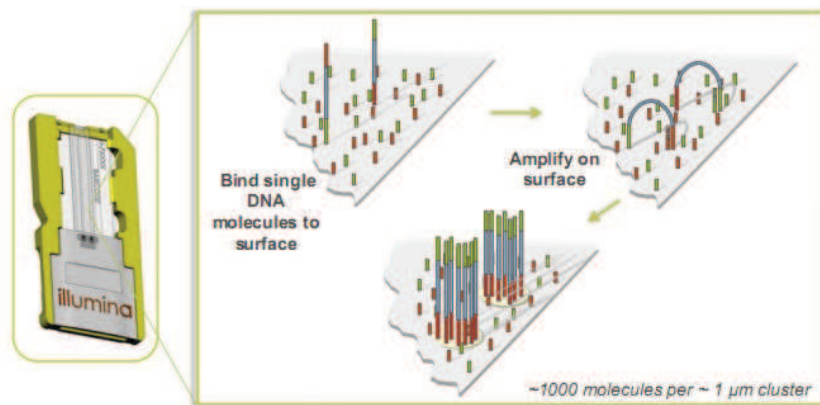
Le séquençage d'exome a été réalisé par la société Integrage© sur un séquenceur haut débit Illumina HiSeq2000. La réalisation du séquençage nécessite trois étapes avant l'analyse bio-informatique : la préparation de la banque d'exons à séquencer, la génération des « clusters » nécessaires au séquençage et le séquençage proprement dit.

Préparation de la banque de fragments d'ADN :

L'isolement et la capture de l'intégralité des séquences codantes de chaque génome ont été effectués en phase liquide à l'aide du kit Sure Select Target Enrichment System (Agilent, Human All Exon Kits v2). Cette technique passe d'abord par une fragmentation mécanique de l'ADN (par nébulisation ou sonication) puis lie à chaque extrémité des fragments générés un adaptateur qui permettra le séquençage à partir des deux extrémités du fragment. Une séquence spécifique (dite « code barre ») est également ajoutée pour permettre l'identification de chaque fragment au sein d'un pool. On obtient alors une banque de fragments d'ADN complets. Cette banque d'ADN est ensuite hybridée à un panel d'oligonucléotides biotinylés spécifiques couvrant l'exome complet humain. Les hybrides biotinylés sont ensuite capturés à l'aide de billes magnétiques couvertes d'avidine.

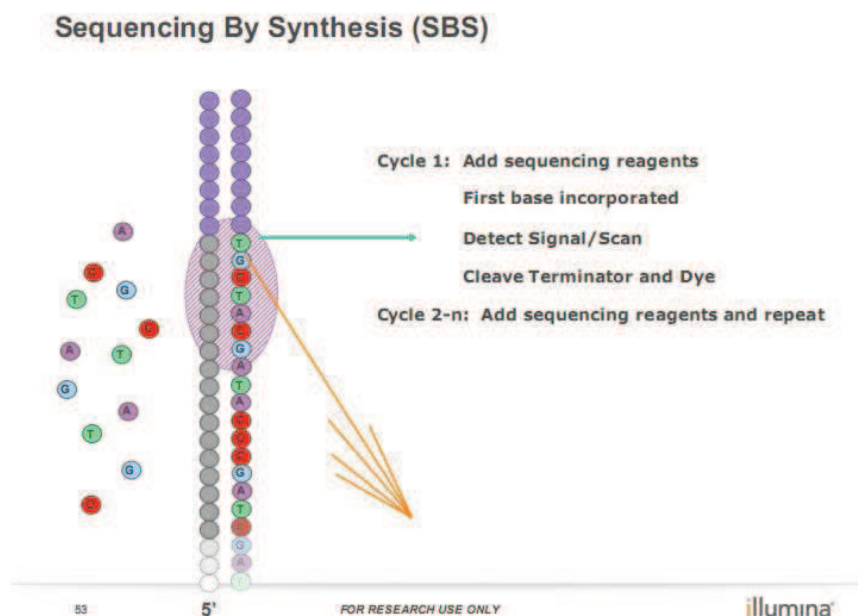
Génération des clusters :

La banque d'ADN ainsi sélectionnée est hybridée sur une matrice solide d'amplification (flow-cell) à l'aide des séquences adaptatrices fixées sur chaque fragment d'ADN lors de l'étape précédente. Des clones d'amplification (clusters) sont générés sur la matrice de séquençage par amplification bidirectionnelle dite « pair-end ».



Séquençage :

Contrairement au séquençage par méthode de Sanger qui utilise des nucléotides terminateurs de chaîne, la technique Illumina 454 utilise un mélange des quatre bases nucléotidiques couplées à des fluorochromes différents. Ainsi pour chaque cluster représentant un fragment d'ADN, l'ajout d'une base entraîne l'apparition d'une couleur spécifique qui permet l'identification de la base incorporée. A chaque fois, l'ajout d'une base est suivi d'une étape de déprotection qui permet la suppression du fluorochrome et la poursuite de l'élongation de la chaîne nucléotidique. Chaque incorporation de base est suivie d'une photographie haute résolution de la « flow-cell ». Comme chaque cluster est identifié par un code barre, la succession des photographies prises de chaque cluster permet, en fonction de l'enchaînement des couleurs obtenues, de reconstituer la séquence de chaque fragment d'ADN et d'attribuer ces données à l'échantillon d'origine.



Transfection de cellules 1321N1

La construction de vecteurs plasmidiques pcDNA3 portant un gène de résistance à la généticine (G418) et ayant incorporé le cDNA du récepteur P2Y₁₂ sauvage ou muté sous la dépendance du promoteur du CMV (cytomégalovirus) a été sous-traitée par la société Eurofins Genomics©. La société nous a fourni, lors de la livraison, le séquençage complet des constructions montrant l'incorporation des séquences d'intérêt dans le vecteur plasmidique. Les cellules 1321N1 natives ont été par la suite transfectées à l'aide d'un agent liposomal (Lipofectamine 2000©) selon le protocole suivant :

J-1 : Ensemencer les cellules en plaque de 24 puits à 50 000 cellules par cm² soit 100 000 cellules par puits dans 500 µL de milieu DMEM contenant 10% de sérum de veau fœtal (SVF) et un mélange d'antibiotique PSG (Pénicilline 500 µg/ml, Streptomycine 500 µg/ml, L-Glutamine 500 µg/ml)

J0 : Les cellules doivent être entre 70 et 90% de confluence. Avant la transfection, le milieu est remplacé par du milieu sans antibiotique et contenant moins de sérum (DMEM+5%SVF).

1 µg de plasmide (dilué dans 50 µL de milieu OptiMEM (Gibco, Ref 31985-062)) est mélangé à 4 µL de Lipofectamine ((Gibco, Ref 11668027) dilué dans 50 µL de milieu OptiMEM)) et incubé 30 min à température ambiante. Les 100µL du mélange sont ajoutés goutte à goutte sur les cellules, qui sont ensuite incubées pendant 6h à 37°C sous 5% de CO₂.

Après 6h, le milieu de transfection est remplacé par 500 µL du milieu DMEM +10%SVF + PSG.

J+2 : Après 48h de culture, les cellules sont transférées en plaque 6 puits en présence de 2 mL de milieu DMEM+10%SVF+PSG+Geneticin (800µg/mL) (Gibco, Ref 10131-027).

Les cellules sont incubées à 37°C sous 5% de CO₂ et le milieu est changé tous les 2 jours pendant 7 jours. Seules les cellules transfectées survivent.

Le clonage est ensuite effectué par la technique des dilutions limites pour isoler une cellule par puits de plaque 96 puits. Les clones obtenus seront ensuite testés en RT-PCR pour vérifier la présence du transcrit P2Y₁₂.

Etude de l'AMPc sur cellules 1321N1

J-1 : ensemencer 0.2.10⁶ cellules/puits en plaque 24 puits dans un milieu DMEM + 10% SVF.

J0 : procéder à la stimulation des cellules. Différentes conditions sont réalisées en triplet :

- 1) Sans forskolin (stimulateur de l'adénylate cyclase)
 - ADP 10⁻⁴ M
 - AR-C69931MX (ARC) 10⁻⁷ M, un antagoniste du récepteur P2Y₁₂
 - ARC 10⁻⁷ M + ADP 10⁻⁴ M
- 2) Avec Forskolin 10⁻⁴ M
 - FSK +ADP10⁻⁴ M
 - FSK+ARC 10⁻⁷ M
 - FSK+ARC 10⁻⁷ M +ADP10⁻⁴ M

Mode opératoire :

- 1) Laver les puits 2 fois en PBS

- 2) Ajouter 445 µl DMEM+IBMX (3-isobutyl-1-methylxanthine) 10^{-4} M pour inhiber la dégradation de l'AMPc et incubé 30 min à 37°C
- 3) Dans chaque puit, ajouter 55 µl de l'agoniste souhaité en décalant les puits de 20 sec. Incuber 5 min 30 sec à température ambiante.
- 4) Ajouter 60 µl d'acide perchlorique 6 N (Merck Ref B403517) pour stopper la réaction en précipitant les protéines et incubé 10 min à 4°C
- 5) Transvaser les cellules en tube et ajouter 1ml de mélange trichlorofluorométhane (Aldrich, Ref 254991)/trioctylamine (Fluka, Ref 92830) (v/v) puis vortexer 2 min. Cette étape permet la neutralisation du milieu et l'extraction de l'AMPc dans la phase aqueuse.
- 6) Après avoir centrifugé 5 min à 13000g à +4°C, récupérer la phase aqueuse et congeler à -20°C jusqu'au dosage de l'AMPc.

Pour les conditions ARC + ADP, l'ADP est ajouté 30 sec après l'ARC, et la réaction est stoppée 5 min après l'ADP soit 5 min 30 sec de réaction totale.

Le dosage de l'AMPc s'effectue en radio-immunologie à l'aide du kit RIA, cAMP [125 I] RIA KIT (Ref RK-500, Institute of isotopes CO.LTD) selon les recommandations du fabricant.

Extraction et dosage des nucléotides plaquettaires

Le dosage des nucléotides plaquettaires peut être réalisé sur une suspension de plaquettes lavées **sans apyrase** ou sur un PRPc.

1) Extraction

450 µL de PRPc ou de suspension de plaquettes lavées sans apyrase sont lysées en présence d'acide perchlorique 6 N. Après quelques secondes de vortex et une incubation de 10 min à 4°C, centrifuger 5 min à 13 000 g à 4°C. Le surnageant est récupéré puis neutralisé à l'aide d'1 mL de mélange trichlorofluorométhane / trioctylamine (v/v). Vortexer 2 min puis centrifuger 5 min à 13 000 g à 4°C. Prélever la phase aqueuse et congeler jusqu'au dosage en HPLC.

2) Dosage

Le dosage des nucléotides se fait en chromatographie liquide haute performance sur colonne échangeuse d'anion (Ref ZORBAXSAX-250/046 Agilent Technologies) couplée à un détecteur UV-2075 Plus visible.

Préparer 200 µL de chaque échantillon à doser ainsi que de trois solutions étalons contenant respectivement 5.10^{-4} M des nucléotides suivants : AMP, ADP et ATP. Préparer également un mélange v/v/v des solutions d'AMP, d'ADP et d'ATP.

Le dosage HPLC s'effectue pour tous les échantillons et étalons suivant un gradient linéaire de tampon A (eau distillée) / tampon B (tampon phosphate 1M pH3.8). L'injection de 100 µL d'échantillon se fait avec 100% de tampon A. Le gradient permet d'obtenir une phase mobile contenant 100% de tampon B au bout de 30 min.

Après le passage de la solution de mélange de nucléotides, on obtient un électrophorégramme permettant d'identifier les trois nucléotides grâce à leurs temps de rétention. L'aire sous la courbe de chaque pic est proportionnelle à la quantité de nucléotides injectés.

Western blot VNUT

1) Obtention des lysats plaquettaires

1 mL de suspension de plaquettes lavées à 300 000 plt/ μ L est centrifugé 5 min à 1200 g. Le culot est repris dans 950 μ L d'une solution A (TRIS 0.05M, glycerol 2%, NEM 2mM et un mélange d'inhibiteurs de protéases (Complete, Roche©)). Après avoir remis en suspension le culot, celui-ci est ultracentrifugé à 100 000 g pendant 1h à 4°C. Reprendre le culot dans 100 μ L de solution A contenant 1% de SDS (sodium dodecyl sulfate). Le SDS permet la rupture des liaisons covalentes et la dénaturation des protéines. Faire bouillir pendant 5 min puis congeler.

2) Dosage des protéines

Le dosage des protéines a été effectué par technique classique dite BCA (BiCinchoninic acid Assay) à l'aide du kit (Pierce® BCA Protein Assay kit, ThermoScientific) selon les recommandations du fabricant.

3) Migration et transfert :

10 μ g de protéines issues de chaque échantillon sont déposées en présence de 10 mM de DTT (un agent réducteur des ponts disulfure) dans les puits d'un gel d'acrylamide (Gel Critérium BioRad 4-15%©). La migration s'effectue sous un champ électrique de 200 V pendant 30 min. Les protéines sont transférées sur une membrane PVDF (Biorad©) à l'aide du système Trans-blot turbo (Biorad©).

4) Immunomarquage :

Afin de limiter le marquage non spécifique, la membrane est incubée en présence de blocage commercial (blocking buffer, Thermofischer ©) pendant 1h. Après un lavage en PBS/tween 0.05%, la membrane est incubée pendant une heure sous agitation douce avec une solution d'anticorps (anti-VNUT, anti-GAPDH ou IgG) à 1 μ g/mL dans un tampon PBS/Tween 0.05% / 0.1% serum albumine bovin (BSA)/NaN₃ 0,02%. Après trois lavages en PBS/tween 0.05%, la membrane est incubée pendant 1h sous agitation douce en présence de l'anticorps secondaire GAR-HRP à 50ng/mL en PBS/Tween 0.05%/BSA 0.1%.

5) Révélation :

Après 3 lavages en PBS/Tween 0.05% et un lavage en PBS, la révélation s'effectue avec le réactif « Pierce ECL de Thermo Fischer Scientific© » suivant les recommandations du fabricant. Les photographies sont prises à l'aide d'un détecteur UV GelDoc XR (Biorad©) avec une exposition de 3 min.

6 Bibliographie

- ADLY, A. A., RAGAB, I. A., ISMAIL, E. A. & FARAHAT, M. M. 2015. Evaluation of the immature platelet fraction in the diagnosis and prognosis of childhood immune thrombocytopenia. *Platelets*, 26, 645-50.
- ALBERS, C. A., CVEJIC, A., FAVIER, R., BOUWMANS, E. E., ALESSI, M. C., BERTONE, P., JORDAN, G., KETTLEBOROUGH, R. N., KIDDLE, G., KOSTADIMA, M., READ, R. J., SIPOS, B., SIVAPALARATNAM, S., SMETHURST, P. A., STEPHENS, J., VOSS, K., NURDEN, A., RENDON, A., NURDEN, P. & OUWEHAND, W. H. 2011. Exome sequencing identifies NBEAL2 as the causative gene for gray platelet syndrome. *Nat Genet*, 43, 735-7.
- ALBERS, C. A., PAUL, D. S., SCHULZE, H., FRESON, K., STEPHENS, J. C., SMETHURST, P. A., JOLLEY, J. D., CVEJIC, A., KOSTADIMA, M., BERTONE, P., BREUNING, M. H., DEBILI, N., DELOUKAS, P., FAVIER, R., FIEDLER, J., HOBBS, C. M., HUANG, N., HURLES, M. E., KIDDLE, G., KRAPELS, I., NURDEN, P., RUIVENKAMP, C. A., SAMBROOK, J. G., SMITH, K., STEMPLE, D. L., STRAUSS, G., THYS, C., VAN GEET, C., NEWBURY-ECOB, R., OUWEHAND, W. H. & GHEVAERT, C. 2012. Compound inheritance of a low-frequency regulatory SNP and a rare null mutation in exon-junction complex subunit RBM8A causes TAR syndrome. *Nat Genet*, 44, 435-9, S1-2.
- ALEIL, B., RAVANAT, C., CAZENAVE, J. P., ROCHOUX, G., HEITZ, A. & GACHET, C. 2005. Flow cytometric analysis of intraplatelet VASP phosphorylation for the detection of clopidogrel resistance in patients with ischemic cardiovascular diseases. *J Thromb Haemost*, 3, 85-92.
- AMBROSIO, A. L., BOYLE, J. A. & DI PIETRO, S. M. 2012. Mechanism of platelet dense granule biogenesis: study of cargo transport and function of Rab32 and Rab38 in a model system. *Blood*, 120, 4072-81.
- ANTONY-DEBRE, I., BLUTEAU, D., ITZYKSON, R., BACCINI, V., RENNEVILLE, A., BOEHLEN, F., MORABITO, M., DROIN, N., DESWARTE, C., CHANG, Y., LEVERGER, G., SOLARY, E., VAINCHENKER, W., FAVIER, R. & RASLOVA, H. 2012. MYH10 protein expression in platelets as a biomarker of RUNX1 and FLI1 alterations. *Blood*, 120, 2719-22.
- ARMSTRONG, R. A. 1996. Platelet prostanoid receptors. *Pharmacol Ther*, 72, 171-91.
- ARTHUR, J. F., DUNKLEY, S. & ANDREWS, R. K. 2007. Platelet glycoprotein VI-related clinical defects. *Br J Haematol*, 139, 363-72.
- AULT, K. A. & KNOWLES, C. 1995. In vivo biotinylation demonstrates that reticulated platelets are the youngest platelets in circulation. *Exp Hematol*, 23, 996-1001.
- BAJT, M. L. & LOFTUS, J. C. 1994. Mutation of a ligand binding domain of beta 3 integrin. Integral role of oxygenated residues in alpha IIb beta 3 (GPIIb-IIIa) receptor function. *J Biol Chem*, 269, 20913-9.
- BALDUINI, C. L., PECCI, A. & NORIS, P. 2012. Inherited thrombocytopenias: the evolving spectrum. *Hamostaseologie*, 32, 259-70.
- BALDUINI, C. L., SAVOIA, A. & SERI, M. 2013. Inherited thrombocytopenias frequently diagnosed in adults. *J Thromb Haemost*, 11, 1006-19.
- BARBOSA, M. D., NGUYEN, Q. A., TCHERNEV, V. T., ASHLEY, J. A., DETTER, J. C., BLAYDES, S. M., BRANDT, S. J., CHOTAI, D., HODGMAN, C., SOLARI, R. C., LOVETT, M. & KINGSMORE, S. F. 1996. Identification of the homologous beige and Chediak-Higashi syndrome genes. *Nature*, 382, 262-5.

- BAURAND, A., ECKLY, A., BARI, N., LEON, C., HECHLER, B., CAZENAVE, J. P. & GACHET, C. 2000. Desensitization of the platelet aggregation response to ADP: differential down-regulation of the P2Y1 and P2cyc receptors. *Thromb Haemost*, 84, 484-91.
- BAURAND, A., ECKLY, A., HECHLER, B., KAUFFENSTEIN, G., GALZI, J. L., CAZENAVE, J. P., LEON, C. & GACHET, C. 2005. Differential regulation and relocalization of the platelet P2Y receptors after activation: a way to avoid loss of hemostatic properties? *Mol Pharmacol*, 67, 721-33.
- BAURAND, A., RABOISSON, P., FREUND, M., LEON, C., CAZENAVE, J. P., BOURGUIGNON, J. J. & GACHET, C. 2001. Inhibition of platelet function by administration of MRS2179, a P2Y1 receptor antagonist. *Eur J Pharmacol*, 412, 213-21.
- BENNETT, J. S. & VILAIRE, G. 1979. Exposure of platelet fibrinogen receptors by ADP and epinephrine. *J Clin Invest*, 64, 1393-401.
- BERGER, G., MASSE, J. M. & CRAMER, E. M. 1996. Alpha-granule membrane mirrors the platelet plasma membrane and contains the glycoproteins Ib, IX, and V. *Blood*, 87, 1385-95.
- BERNARD, J. & SOULIER, J.-P. 1948. Sur une nouvelle variété de dystrophie thrombocytairehémorragipare congénitale. *La semaine des hôpitaux*, 3217-23.
- BERNDT, M. C., GREGORY, C., CHONG, B. H., ZOLA, H. & CASTALDI, P. A. 1983. Additional glycoprotein defects in Bernard-Soulier's syndrome: confirmation of genetic basis by parental analysis. *Blood*, 62, 800-7.
- BIZZOZERO, G. 1881. Su di un nuovo elemento morfologico del sangue dei mammiferi e sulla sua importanza nella trombosi e nella coagulazione. *L'Osservatore. Gazz. Clin.*, 17, 785-787.
- BIZZOZERO, G. 1882. Über einen neuen Formbestandteil des Blutes und dessen Rolle bei der Thrombose und der Blutgerinnung. *Anat. Physiology. Klein. Mead.*, 90, 261-332.
- BLAIR, P. & FLAUMENHAFT, R. 2009. Platelet alpha-granules: basic biology and clinical correlates. *Blood Rev*, 23, 177-89.
- BONEU, B. & CAZENAVE, J.-P. 1997. *Introduction à l'étude de l'hémostase et de la thrombose*.
- BORN, G. V. 1962. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature*, 194, 927-9.
- BOTTEGA, R., MARCONI, C., FALESCHINI, M., BAJ, G., CAGIONI, C., PECCI, A., PIPPUCCI, T., RAMENGHI, U., PARDINI, S., NGU, L., BARONCI, C., KUNISHIMA, S., BALDUINI, C. L., SERI, M., SAVOIA, A. & NORIS, P. 2015. ACTN1-related thrombocytopenia: identification of novel families for phenotypic characterization. *Blood*, 125, 869-72.
- BOYCOTT, K. M., VANSTONE, M. R., BULMAN, D. E. & MACKENZIE, A. E. 2013. Rare-disease genetics in the era of next-generation sequencing: discovery to translation. *Nat Rev Genet*, 14, 681-91.
- BOZTUG, K., SCHMIDT, M., SCHWARZER, A., BANERJEE, P. P., DIEZ, I. A., DEWEY, R. A., BOHM, M., NOWROUZI, A., BALL, C. R., GLIMM, H., NAUNDORF, S., KUHLCHE, K., BLASCZYK, R., KONDRATENKO, I., MARODI, L., ORANGE, J. S., VON KALLE, C. & KLEIN, C. 2010. Stem-cell gene therapy for the Wiskott-Aldrich syndrome. *N Engl J Med*, 363, 1918-27.
- BRAY, P. F., ROSA, J. P., JOHNSTON, G. I., SHIU, D. T., COOK, R. G., LAU, C., KAN, Y. W., MCEVER, R. P. & SHUMAN, M. A. 1987. Platelet glycoprotein IIb. Chromosomal localization and tissue expression. *J Clin Invest*, 80, 1812-7.
- BRIGGS, C., LONGAIR, I., KUMAR, P., SINGH, D. & MACHIN, S. J. 2012. Performance evaluation of the Sysmex haematology XN modular system. *J Clin Pathol*, 65, 1024-30.
- BRYCKAERT, M., ROSA, J. P., DENIS, C. V. & LENTING, P. J. 2015. Of von Willebrand factor and platelets. *Cell Mol Life Sci*, 72, 307-26.
- BULTEMA, J. J., AMBROSIO, A. L., BUREK, C. L. & DI PIETRO, S. M. 2012. BLOC-2, AP-3, and AP-1 proteins function in concert with Rab38 and Rab32 proteins to mediate protein trafficking to lysosome-related organelles. *J Biol Chem*, 287, 19550-63.

<https://bridgestudy.medschl.cam.ac.uk/bpd.shtml> [Accessed 27/10/2015].

- CANAULT, M., GHALLOUSSI, D., GROSDIDIER, C., GUINIER, M., PERRET, C., CHELGHOUM, N., GERMAIN, M., RASLOVA, H., PEIRETTI, F., MORANGE, P. E., SAUT, N., PILLOIS, X., NURDEN, A. T., CAMBIEN, F., PIERRES, A., VAN DEN BERG, T. K., KUIJPERS, T. W., ALESSI, M. C. & TREGOUET, D. A. 2014. Human CalDAG-GEFI gene (RASGRP2) mutation affects platelet function and causes severe bleeding. *J Exp Med*, 211, 1349-62.
- CARNEIRO, A. M., COOK, E. H., MURPHY, D. L. & BLAKELY, R. D. 2008. Interactions between integrin $\alpha\text{IIb}\beta_3$ and the serotonin transporter regulate serotonin transport and platelet aggregation in mice and humans. *J Clin Invest*, 118, 1544-52.
- CARUBBI, C., MASSELLI, E., NOUVENNE, A., RUSSO, D., GALLI, D., MIRANDOLA, P., GOBBI, G. & VITALE, M. 2014. Laboratory diagnostics of inherited platelet disorders. *Clin Chem Lab Med*, 52, 1091-106.
- CATTANEO, M. 2009. Light transmission aggregometry and ATP release for the diagnostic assessment of platelet function. *Semin Thromb Hemost*, 35, 158-67.
- CATTANEO, M. 2011a. Bleeding manifestations of congenital and drug-induced defects of the platelet P2Y₁₂ receptor for adenosine diphosphate. *Thromb Haemost*, 105 Suppl 1, S67-74.
- CATTANEO, M. 2011b. The platelet P2Y₁(2) receptor for adenosine diphosphate: congenital and drug-induced defects. *Blood*, 117, 2102-12.
- CATTANEO, M., CERLETTI, C., HARRISON, P., HAYWARD, C. P., KENNY, D., NUGENT, D., NURDEN, P., RAO, A. K., SCHMAIER, A. H., WATSON, S. P., LUSSANA, F., PUGLIANO, M. T. & MICHELSON, A. D. 2013. Recommendations for the Standardization of Light Transmission Aggregometry: A Consensus of the Working Party from the Platelet Physiology Subcommittee of SSC/ISTH. *J Thromb Haemost*.
- CATTANEO, M., HAYWARD, C. P., MOFFAT, K. A., PUGLIANO, M. T., LIU, Y. & MICHELSON, A. D. 2009. Results of a worldwide survey on the assessment of platelet function by light transmission aggregometry: a report from the platelet physiology subcommittee of the SSC of the ISTH. *J Thromb Haemost*, 7, 1029.
- CATTANEO, M., LECCHI, A., RANDI, A. M., MCGREGOR, J. L. & MANNUCCI, P. M. 1992. Identification of a new congenital defect of platelet function characterized by severe impairment of platelet responses to adenosine diphosphate. *Blood*, 80, 2787-96.
- CATTANEO, M., LOMBARDI, R., ZIGHETTI, M. L., GACHET, C., OHLMANN, P., CAZENAVE, J. P. & MANNUCCI, P. M. 1997. Deficiency of (33P)2MeS-ADP binding sites on platelets with secretion defect, normal granule stores and normal thromboxane A₂ production. Evidence that ADP potentiates platelet secretion independently of the formation of large platelet aggregates and thromboxane A₂ production. *Thromb Haemost*, 77, 986-90.
- CATTANEO, M., ZIGHETTI, M. L., LOMBARDI, R., MARTINEZ, C., LECCHI, A., CONLEY, P. B., WARE, J. & RUGGERI, Z. M. 2003. Molecular bases of defective signal transduction in the platelet P2Y₁₂ receptor of a patient with congenital bleeding. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 1978-83.
- CAZENAVE, J. P., HEMMENDINGER, S., BERETZ, A., SUTTER-BAY, A. & LAUNAY, J. 1983. [Platelet aggregation: a tool for clinical investigation and pharmacological study. Methodology]. *Ann Biol Clin (Paris)*, 41, 167-79.
- CAZENAVE, J. P., OHLMANN, P., CASSEL, D., ECKLY, A., HECHLER, B. & GACHET, C. 2004. Preparation of washed platelet suspensions from human and rodent blood. *Methods Mol Biol*, 272, 13-28.
- CHEN, Y. P., DJAFFAR, I., PIDARD, D., STEINER, B., CIEUTAT, A. M., CAEN, J. P. & ROSA, J. P. 1992. Ser-752-->Pro mutation in the cytoplasmic domain of integrin β_3 subunit and

- defective activation of platelet integrin alpha IIb beta 3 (glycoprotein IIb-IIIa) in a variant of Glanzmann thrombasthenia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89, 10169-73.
- CLEMETSON, K. J., MCGREGOR, J. L., JAMES, E., DECHAVANNE, M. & LUSCHER, E. F. 1982. Characterization of the platelet membrane glycoprotein abnormalities in Bernard-Soulier syndrome and comparison with normal by surface-labeling techniques and high-resolution two-dimensional gel electrophoresis. *J Clin Invest*, 70, 304-11.
- COLLER, B. S. & SHATTIL, S. J. 2008. The GPIIb/IIIa (integrin alphaIIbbeta3) odyssey: a technology-driven saga of a receptor with twists, turns, and even a bend. *Blood*, 112, 3011-25.
- COLMAN, R. W. 2006. *Hemostasis and thrombosis : basic principles and clinical practice*, Philadelphia, PA, Lippincott Williams & Wilkins.
- CONLEY, P. J., MM.; VINCENT, D.; LECCHI, A.; CATTANEO, M. 2001. Unique mutations in the P2Y12 locus of patients with previously described defects in ADP-dependent Aggregation. *Blood*, 98.
- COUGHLIN, S. R. 2005. Protease-activated receptors in hemostasis, thrombosis and vascular biology. *J Thromb Haemost*, 3, 1800-14.
- CRAMER, E. M., BERGER, G. & BERNDT, M. C. 1994. Platelet alpha-granule and plasma membrane share two new components: CD9 and PECAM-1. *Blood*, 84, 1722-30.
- CRANMER, S. L., PIKOVSKI, I., MANGIN, P., THOMPSON, P. E., DOMAGALA, T., FRAZZETTO, M., SALEM, H. H. & JACKSON, S. P. 2005. Identification of a unique filamin A binding region within the cytoplasmic domain of glycoprotein Ibalpha. *Biochem J*, 387, 849-58.
- CULLINANE, A. R., CURRY, J. A., CARMONA-RIVERA, C., SUMMERS, C. G., CICCONE, C., CARDILLO, N. D., DORWARD, H., HESS, R. A., WHITE, J. G., ADAMS, D., HUIZING, M. & GAHL, W. A. 2011. A BLOC-1 mutation screen reveals that PLDN is mutated in Hermansky-Pudlak Syndrome type 9. *Am J Hum Genet*, 88, 778-87.
- DALY, M. E., DAWOOD, B. B., LESTER, W. A., PEAKE, I. R., RODEGHIRO, F., GOODEVE, A. C., MAKRIS, M., WILDE, J. T., MUMFORD, A. D., WATSON, S. P. & MUNDELL, S. J. 2009. Identification and characterization of a novel P2Y 12 variant in a patient diagnosed with type 1 von Willebrand disease in the European MCMDM-1VWD study. *Blood*, 113, 4110-3.
- DAWOOD, B., DALY, M. & MAKRIS, M. 2009. Identification of a novel homozygous P2Y12 mutation in a patient with a mild platelet-based bleeding disorder [abstract]. *Thromb Haemost*, 7 (Suppl. 2), Abstract PP-MO-076.
- DAWOOD, B. B., LOWE, G. C., LORDKIPANIDZE, M., BEM, D., DALY, M. E., MAKRIS, M., MUMFORD, A., WILDE, J. T. & WATSON, S. P. 2012. Evaluation of participants with suspected heritable platelet function disorders including recommendation and validation of a streamlined agonist panel. *Blood*, 120, 5041-9.
- DECOUTURE, B., DREANO, E., BELLEVILLE-ROLLAND, T., KUCI, O., DIZIER, B., BAZAA, A., COQUERAN, B., LOMPPE, A. M., DENIS, C. V., HULOT, J. S., BACHELOT-LOZA, C. & GAUSSEM, P. 2015. Impaired platelet activation and cAMP homeostasis in MRP4-deficient mice. *Blood*, 126, 1823-30.
- DEFREYN, G., GACHET, C., SAVI, P., DRIOT, F., CAZENAVE, J. P. & MAFFRAND, J. P. 1991. Ticlopidine and clopidogrel (SR 25990C) selectively neutralize ADP inhibition of PGE1-activated platelet adenylate cyclase in rats and rabbits. *Thromb Haemost*, 65, 186-90.
- DI PIETRO, S. M., FALCON-PEREZ, J. M. & DELL'ANGELICA, E. C. 2004. Characterization of BLOC-2, a complex containing the Hermansky-Pudlak syndrome proteins HPS3, HPS5 and HPS6. *Traffic*, 5, 276-83.
- DUTTING, S., BENDER, M. & NIESWANDT, B. 2012. Platelet GPVI: a target for antithrombotic therapy?! *Trends Pharmacol Sci*, 33, 583-90.

- DYSON, J. M., MUNDAY, A. D., KONG, A. M., HUYSMANS, R. D., MATZARIS, M., LAYTON, M. J., NANDURKAR, H. H., BERNDT, M. C. & MITCHELL, C. A. 2003. SHIP-2 forms a tetrameric complex with filamin, actin, and GPIb-IX-V: localization of SHIP-2 to the activated platelet actin cytoskeleton. *Blood*, 102, 940-8.
- ECKLY, A., HEIJNEN, H., PERTUY, F., GEERTS, W., PROAMER, F., RINCKEL, J. Y., LEON, C., LANZA, F. & GACHET, C. 2014. Biogenesis of the demarcation membrane system (DMS) in megakaryocytes. *Blood*, 123, 921-30.
- EL-TAYEB, A., GRIESSMEIER, K. J. & MULLER, C. E. 2005. Synthesis and preliminary evaluation of [3H]PSB-0413, a selective antagonist radioligand for platelet P2Y₁₂ receptors. *Bioorg Med Chem Lett*, 15, 5450-2.
- ESCOLAR, G., LEISTIKOW, E. & WHITE, J. G. 1989. The fate of the open canalicular system in surface and suspension-activated platelets. *Blood*, 74, 1983-8.
- FAIX, J. & ROTTNER, K. 2006. The making of filopodia. *Curr Opin Cell Biol*, 18, 18-25.
- FALET, H., POLLITT, A. Y., BEGONJA, A. J., WEBER, S. E., DUERSCHMIED, D., WAGNER, D. D., WATSON, S. P. & HARTWIG, J. H. 2010. A novel interaction between FlnA and Syk regulates platelet ITAM-mediated receptor signaling and function. *J Exp Med*, 207, 1967-79.
- FAVIER, R., JONDEAU, K., BOUTARD, P., GROSSFELD, P., REINERT, P., JONES, C., BERTONI, F. & CRAMER, E. M. 2003. Paris-Trousseau syndrome : clinical, hematological, molecular data of ten new cases. *Thromb Haemost*, 90, 893-7.
- FEINMAN, R. D., LUBOWSKY, J., CHARO, I. & ZABINSKI, M. P. 1977. The lumi-aggregometer: a new instrument for simultaneous measurement of secretion and aggregation by platelets. *J Lab Clin Med*, 90, 125-9.
- FELETOU, M., VANHOUTTE, P. M. & VERBEUREN, T. J. 2010. The thromboxane/endoperoxide receptor (TP): the common villain. *J Cardiovasc Pharmacol*, 55, 317-32.
- FENG, L., SEYMOUR, A. B., JIANG, S., TO, A., PEDEN, A. A., NOVAK, E. K., ZHEN, L., RUSINIAK, M. E., EICHER, E. M., ROBINSON, M. S., GORIN, M. B. & SWANK, R. T. 1999. The beta3A subunit gene (Ap3b1) of the AP-3 adaptor complex is altered in the mouse hypopigmentation mutant pearl, a model for Hermansky-Pudlak syndrome and night blindness. *Hum Mol Genet*, 8, 323-30.
- FIORE, M., NURDEN, A. T., NURDEN, P. & SELIGSOHN, U. 2012. Clinical utility gene card for: Glanzmann thrombasthenia. *Eur J Hum Genet*, 20.
- FITZGERALD, L. A., STEINER, B., RALL, S. C., JR., LO, S. S. & PHILLIPS, D. R. 1987. Protein sequence of endothelial glycoprotein IIIa derived from a cDNA clone. Identity with platelet glycoprotein IIIa and similarity to "integrin". *J Biol Chem*, 262, 3936-9.
- FONTANA, G., WARE, J. & CATTANEO, M. 2009. Haploinsufficiency of the platelet P2Y₁₂ gene in a family with congenital bleeding diathesis. *Haematologica*, 94, 581-4.
- FOUDI, A., KRAMER, D. J., QIN, J., YE, D., BEHLICH, A. S., MORDECAI, S., PREFFER, F. I., AMZALLAG, A., RAMASWAMY, S., HOCHEDLINGER, K., ORKIN, S. H. & HOCK, H. 2014. Distinct, strict requirements for Gfi-1b in adult bone marrow red cell and platelet generation. *J Exp Med*, 211, 909-27.
- FRESON, K., DEVRIENDT, K., MATTHIJS, G., VAN HOOFF, A., DE VOS, R., THYS, C., MINNER, K., HOYLAERTS, M. F., VERMYLEN, J. & VAN GEET, C. 2001. Platelet characteristics in patients with X-linked macrothrombocytopenia because of a novel GATA1 mutation. *Blood*, 98, 85-92.
- FURCHGOTT, R. F. & VANHOUTTE, P. M. 1989. Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *FASEB J*, 3, 2007-18.
- GACHET, C. 2001. ADP receptors of platelets and their inhibition. *Thromb Haemost*, 86, 222-32.
- GACHET, C. 2006. Regulation of platelet functions by P2 receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 46, 277-300.

- GACHET, C. 2008. P2 receptors, platelet function and pharmacological implications. *Thromb Haemost*, 99, 466-72.
- GACHET, C., CATTANEO, M., OHLMANN, P., HECHLER, B., LECCHI, A., CHEVALIER, J., CASSEL, D., MANNUCCI, P. M. & CAZENAVE, J. P. 1995. Purinoceptors on blood platelets: further pharmacological and clinical evidence to suggest the presence of two ADP receptors. *Br J Haematol*, 91, 434-44.
- GACHET, C., CAZENAVE, J. P., OHLMANN, P., BOULOUX, C., DEFREYN, G., DRIOT, F. & MAFFRAND, J. P. 1990. The thienopyridine ticlopidine selectively prevents the inhibitory effects of ADP but not of adrenaline on cAMP levels raised by stimulation of the adenylate cyclase of human platelets by PGE1. *Biochem Pharmacol*, 40, 2683-7.
- GAWAZ, M. P., BOGNER, C. & GURLAND, H. J. 1993. Flow-cytometric analysis of mepacrine-labelled platelets in patients with end-stage renal failure. *Haemostasis*, 23, 284-92.
- GENEVÈVE, F. A. C. G., D. MERCIER-BATAILLE, O. WAGNER-BALLON, F. TRIMOREAU, O. FENNETEAU, F. SCHILLINGER, V. LEYMARIE, S. GIRARD, C. SETTEGRANA, S. DALIPHARD, V. SOENEN-CORNU, M. CIVIDIN, J.F. LESESVE, B. CHÂTELAIN, X. TROUSSARD, V. BARDET POUR LE GROUPE FRANCOPHONE D'HÉMATOLOGIE CELLULAIRE 2014. Revue microscopique du frottis sanguin : propositions du Groupe Francophone d'Hématologie Cellulaire (GFHC). *Feuilles de Biologie*, IV.
- GEORGE, J. N., CAEN, J. P. & NURDEN, A. T. 1990. Glanzmann's thrombasthenia: the spectrum of clinical disease. *Blood*, 75, 1383-95.
- GERONDOPOULOS, A., LANGEMEYER, L., LIANG, J. R., LINFORD, A. & BARR, F. A. 2012. BLOC-3 mutated in Hermansky-Pudlak syndrome is a Rab32/38 guanine nucleotide exchange factor. *Curr Biol*, 22, 2135-9.
- GIANNARELLI, C., ZAFAR, M. U. & BADIMON, J. J. 2010. Prostanoid and TP-receptors in atherothrombosis: is there a role for their antagonism? *Thromb Haemost*, 104, 949-54.
- GLANZMANN, E. 1918. Hereditäre hämmorrhagische Thrombasthenie. Ein Beitrag zur Pathologie der Blutplättchen. *Jahrbuch für Kinderheilkunde und physische Erziehung*, 113-141.
- GOLEBIEWSKA, E. M., HARPER, M. T., WILLIAMS, C. M., SAVAGE, J. S., GOGGS, R., FISCHER VON MOLLARD, G. & POOLE, A. W. 2015. Syntaxin 8 regulates platelet dense granule secretion, aggregation, and thrombus stability. *J Biol Chem*, 290, 1536-45.
- GOLEBIEWSKA, E. M. & POOLE, A. W. 2015. Platelet secretion: From haemostasis to wound healing and beyond. *Blood Rev*, 29, 153-62.
- GRATACAP, M. P., GUILLERMET-GUIBERT, J., MARTIN, V., CHICANNE, G., TRONCHERE, H., GAITS-IACOVONI, F. & PAYRASTRE, B. 2011. Regulation and roles of PI3Kbeta, a major actor in platelet signaling and functions. *Adv Enzyme Regul*, 51, 106-16.
- GRESELE, P. 2002. *Platelets in Thrombotic and Non-Thrombotic Disorders: Pathophysiology, Pharmacology and Therapeutics*.
- GRESELE, P., FALCINELLI, E., GIANNINI, S., D'ADAMO, P., D'EUSTACCHIO, A., CORAZZI, T., MEZZASOMA, A. M., DI BARI, F., GUGLIELMINI, G., CECCHETTI, L., NORIS, P., BALDUINI, C. L. & SAVOIA, A. 2009. Dominant inheritance of a novel integrin beta3 mutation associated with a hereditary macrothrombocytopenia and platelet dysfunction in two Italian families. *Haematologica*, 94, 663-9.
- GRESELE, P., HARRISON, P., BURY, L., FALCINELLI, E., GACHET, C., HAYWARD, C. P., KENNY, D., MEZZANO, D., MUMFORD, A. D., NUGENT, D., NURDEN, A. T., ORSINI, S. & CATTANEO, M. 2014. Diagnosis of suspected inherited platelet function disorders: results of a worldwide survey. *J Thromb Haemost*, 12, 1562-9.
- GRESELE, P. & SUBCOMMITTEE ON PLATELET, P. 2015. Diagnosis of inherited platelet function disorders: guidance from the SSC of the ISTH. *J Thromb Haemost*, 13, 314-22.

- GRISCELLI, C., DURANDY, A., GUY-GRAND, D., DAGUILLARD, F., HERZOG, C. & PRUNIERAS, M. 1978. A syndrome associating partial albinism and immunodeficiency. *Am J Med*, 65, 691-702.
- GROTTUM, K. A. & SOLUM, N. O. 1969. Congenital thrombocytopenia with giant platelets: a defect in the platelet membrane. *Br J Haematol*, 16, 277-90.
- GUEGUEN, P., ROUAULT, K., CHEN, J. M., RAGUENES, O., FICHO, Y., HARDY, E., GOBIN, E., PAN-PETESCH, B., KERBIRIOU, M., TROUVE, P., MARCORELLES, P., ABGRALL, J. F., LE MARECHAL, C. & FEREC, C. 2013. A missense mutation in the alpha-actinin 1 gene (ACTN1) is the cause of autosomal dominant macrothrombocytopenia in a large French family. *PLoS One*, 8, e74728.
- GUIDETTI, G. F. & TORTI, M. 2012. The Small GTPase Rap1b: A Bidirectional Regulator of Platelet Adhesion Receptors. *J Signal Transduct*, 2012, 412089.
- GUNAY-AYGUN, M., FALIK-ZACCAI, T. C., VILBOUX, T., ZIVONY-ELBOUM, Y., GUMRUK, F., CETIN, M., KHAYAT, M., BOERKOEL, C. F., KFIR, N., HUANG, Y., MAYNARD, D., DORWARD, H., BERGER, K., KLETA, R., ANIKSTER, Y., ARAT, M., FREIBERG, A. S., KEHREL, B. E., JURK, K., CRUZ, P., MULLIKIN, J. C., WHITE, J. G., HUIZING, M. & GAHL, W. A. 2011. NBEAL2 is mutated in gray platelet syndrome and is required for biogenesis of platelet alpha-granules. *Nat Genet*, 43, 732-4.
- HAGEN, I., BJERRUM, O. J. & SOLUM, N. O. 1979. Characterization of human platelet proteins solubilized with Triton X-100 and examined by crossed immunoelectrophoresis. Reference patterns of extracts from whole platelets and isolated membranes. *Eur J Biochem*, 99, 9-22.
- HAGEN, I., NURDEN, A., BJERRUM, O. J., SOLUM, N. O. & CAEN, J. 1980. Immunochemical evidence for protein abnormalities in platelets from patients with Glanzmann's thrombasthenia and Bernard-Soulier syndrome. *J Clin Invest*, 65, 722-31.
- HARRISON, P. 2005. The role of PFA-100 testing in the investigation and management of haemostatic defects in children and adults. *Br J Haematol*, 130, 3-10.
- HARRISON, P. & CRAMER, E. M. 1993. Platelet alpha-granules. *Blood Rev*, 7, 52-62.
- HART, A., MELET, F., GROSSFELD, P., CHIEN, K., JONES, C., TUNNACLIFFE, A., FAVIER, R. & BERNSTEIN, A. 2000. Fli-1 is required for murine vascular and megakaryocytic development and is hemizygotously deleted in patients with thrombocytopenia. *Immunity*, 13, 167-77.
- HAYEM, G. 1878. Recherches sur l'évolution des hématies dans le sang de l'homme et des vertébrés. *Arch. Physiol. Norm. Pathol.*, 10, 692-734.
- HAYEM, G. 1879. Recherches sur l'évolution des hématies dans le sang de l'homme et des vertébrés. *Archives de physiologie normale et pathologique*, 11, 201-261.
- HECHLER, B. & GACHET, C. 2011. P2 receptors and platelet function. *Purinergic Signal*, 7, 293-303.
- HEGGLIN, R. 1945. Gleichzeitige konstitutionelle Veränderungen an Neutrophilen und Thrombocyten. *Helv. Med. Acta* 439-440.
- HEHR, U., HEHR, A., UYANIK, G., PHELAN, E., WINKLER, J. & REARDON, W. 2006. A filamin A splice mutation resulting in a syndrome of facial dysmorphism, periventricular nodular heterotopia, and severe constipation reminiscent of cerebro-fronto-facial syndrome. *J Med Genet*, 43, 541-4.
- HERMANS, C., WITTEVRONGEL, C., THYS, C., SMETHURST, P. A., VAN GEET, C. & FRESON, K. 2009. A compound heterozygous mutation in glycoprotein VI in a patient with a bleeding disorder. *J Thromb Haemost*, 7, 1356-63.
- HERMANSEY, F. & PUDLAK, P. 1959. Albinism associated with hemorrhagic diathesis and unusual pigmented reticular cells in the bone marrow: report of two cases with histochemical studies. *Blood*, 14, 162-9.

- HIASA, M., TOGAWA, N., MIYAJI, T., OMOTE, H., YAMAMOTO, A. & MORIYAMA, Y. 2014. Essential role of vesicular nucleotide transporter in vesicular storage and release of nucleotides in platelets. *Physiol Rep*, 2.
- HOLLANDA, L. M., LIMA, C. S., CUNHA, A. F., ALBUQUERQUE, D. M., VASSALLO, J., OZELO, M. C., JOAZEIRO, P. P., SAAD, S. T. & COSTA, F. F. 2006. An inherited mutation leading to production of only the short isoform of GATA-1 is associated with impaired erythropoiesis. *Nat Genet*, 38, 807-12.
- HOLLOPETER, G., JANTZEN, H. M., VINCENT, D., LI, G., ENGLAND, L., RAMAKRISHNAN, V., YANG, R. B., NURDEN, P., NURDEN, A., JULIUS, D. & CONLEY, P. B. 2001. Identification of the platelet ADP receptor targeted by antithrombotic drugs. *Nature*, 409, 202-7.
- HOLMSEN, H., DAY, H. J. & STORM, E. 1969. Adenine nucleotide metabolism of blood platelets. VI. Subcellular localization of nucleotide pools with different functions in the platelet release reaction. *Biochim Biophys Acta*, 186, 254-66.
- HOLMSEN, H., OSTVOLD, A. C. & DAY, H. J. 1973. Behaviour of endogenous and newly absorbed serotonin in the platelet release reaction. *Biochem Pharmacol*, 22, 2599-608.
- HOLMSEN, H. & WEISS, H. J. 1972. Further evidence for a deficient storage pool of adenine nucleotides in platelets from some patients with thrombocytopathia--"storage pool disease". *Blood*, 39, 197-209.
- HONDA, S., TOMIYAMA, Y., SHIRAGA, M., TADOKORO, S., TAKAMATSU, J., SAITO, H., KURATA, Y. & MATSUZAWA, Y. 1998. A two-amino acid insertion in the Cys146-Cys167 loop of the α IIb subunit is associated with a variant of Glanzmann thrombasthenia. Critical role of Asp163 in ligand binding. *J Clin Invest*, 102, 1183-92.
- HOXIE, J. A., AHUJA, M., BELMONTE, E., PIZARRO, S., PARTON, R. & BRASS, L. F. 1993. Internalization and recycling of activated thrombin receptors. *J Biol Chem*, 268, 13756-63.
- HUANG, L., KUO, Y. M. & GITSCHIER, J. 1999. The pallid gene encodes a novel, syntaxin 13-interacting protein involved in platelet storage pool deficiency. *Nat Genet*, 23, 329-32.
- HYNES, R. O. 1987. Integrins: a family of cell surface receptors. *Cell*, 48, 549-54.
- ICHIKAWA, M., ASAI, T., SAITO, T., SEO, S., YAMAZAKI, I., YAMAGATA, T., MITANI, K., CHIBA, S., OGAWA, S., KUROKAWA, M. & HIRAI, H. 2004. AML-1 is required for megakaryocytic maturation and lymphocytic differentiation, but not for maintenance of hematopoietic stem cells in adult hematopoiesis. *Nat Med*, 10, 299-304.
- INGERMAN, C. M., SMITH, J. B., SHAPIRO, S., SEDAR, A. & SILVER, M. J. 1978. Hereditary abnormality of platelet aggregation attributable to nucleotide storage pool deficiency. *Blood*, 52, 332-44.
- INTERPRO. *Interpro* [Online]. Available: <http://www.ebi.ac.uk/interpro/> [Accessed 27/10/2015].
- ISLAM, M. S. & ALAMELU, J. 2011. Morphological and electron microscopic characteristics of grey platelet syndrome. *Br J Haematol*, 152, 1.
- ISRAELS, S. J., MCMILLAN, E. M., ROBERTSON, C., SINGHORY, S. & MCNICOL, A. 1996. The lysosomal granule membrane protein, LAMP-2, is also present in platelet dense granule membranes. *Thromb Haemost*, 75, 623-9.
- ITALIANO, J. E., JR., LECINE, P., SHIVDASANI, R. A. & HARTWIG, J. H. 1999. Blood platelets are assembled principally at the ends of proplatelet processes produced by differentiated megakaryocytes. *J Cell Biol*, 147, 1299-312.
- JACKSON, S. P., YAP, C. L. & ANDERSON, K. E. 2004. Phosphoinositide 3-kinases and the regulation of platelet function. *Biochem Soc Trans*, 32, 387-92.
- JANCIC, C., SAVINA, A., WASMEIER, C., TOLMACHOVA, T., EL-BENNA, J., DANG, P. M., PASCOLO, S., GOUGEROT-POCIDALO, M. A., RAPOSO, G., SEABRA, M. C. & AMIGORENA, S. 2007. Rab27a regulates phagosomal pH and NADPH oxidase recruitment to dendritic cell phagosomes. *Nat Cell Biol*, 9, 367-78.

- JEDLITSCHKY, G., CATTANEO, M., LUBENOW, L. E., ROSSKOPF, D., LECCHI, A., ARTONI, A., MOTTA, G., NIESSEN, J., KROEMER, H. K. & GREINACHER, A. 2010. Role of MRP4 (ABCC4) in platelet adenosine nucleotide-storage: evidence from patients with delta-storage pool deficiencies. *Am J Pathol*, 176, 1097-103.
- JEDLITSCHKY, G., GREINACHER, A. & KROEMER, H. K. 2012. Transporters in human platelets: physiologic function and impact for pharmacotherapy. *Blood*, 119, 3394-402.
- JIANG, P. & JANDROT-PERRUS, M. 2014. New advances in treating thrombotic diseases: GPVI as a platelet drug target. *Drug Discov Today*, 19, 1471-5.
- JOHNSTON, G. I., PICKETT, E. B., MCEVER, R. P. & GEORGE, J. N. 1987. Heterogeneity of platelet secretion in response to thrombin demonstrated by fluorescence flow cytometry. *Blood*, 69, 1401-3.
- KAHR, W. H., HINCKLEY, J., LI, L., SCHWERTZ, H., CHRISTENSEN, H., ROWLEY, J. W., PLUTHERO, F. G., URBAN, D., FABBRO, S., NIXON, B., GADZINSKI, R., STORCK, M., WANG, K., RYU, G. Y., JOBE, S. M., SCHUTTE, B. C., MOSELEY, J., LOUGHRAN, N. B., PARKINSON, J., WEYRICH, A. S. & DI PAOLA, J. 2011. Mutations in NBEAL2, encoding a BEACH protein, cause gray platelet syndrome. *Nat Genet*, 43, 738-40.
- KAPLAN, K. L. & OWEN, J. 1981. Plasma levels of beta-thromboglobulin and platelet factor 4 as indices of platelet activation in vivo. *Blood*, 57, 199-202.
- KARGER, R., DONNER-BANZHOF, N., MULLER, H. H., KRETSCHMER, V. & HUNINK, M. 2007. Diagnostic performance of the platelet function analyzer (PFA-100) for the detection of disorders of primary haemostasis in patients with a bleeding history-a systematic review and meta-analysis. *Platelets*, 18, 249-60.
- KAUSHANSKY, K. 1995. Thrombopoietin: the primary regulator of platelet production. *Blood*, 86, 419-31.
- KAUSHANSKY, K. 2008. Historical review: megakaryopoiesis and thrombopoiesis. *Blood*, 111, 981-6.
- KINLOUGH-RATHBONE, R. L., MUSTARD, J. F., PACKHAM, M. A., PERRY, D. W., REIMERS, H. J. & CAZENAVE, J. P. 1977. Properties of washed human platelets. *Thromb Haemost*, 37, 291-308.
- KOBE, B. & DEISENHOFER, J. 1994. The leucine-rich repeat: a versatile binding motif. *Trends Biochem Sci*, 19, 415-21.
- KUNDU, S. K., HEILMANN, E. J., SIO, R., GARCIA, C., DAVIDSON, R. M. & OSTGAARD, R. A. 1995. Description of an in vitro platelet function analyzer--PFA-100. *Semin Thromb Hemost*, 21 Suppl 2, 106-12.
- KUNICKI, T. J., NURDEN, A. T., PIDARD, D., RUSSELL, N. R. & CAEN, J. P. 1981. Characterization of human platelet glycoprotein antigens giving rise to individual immunoprecipitates in crossed-immunoelectrophoresis. *Blood*, 58, 1190-7.
- KUNISHIMA, S., KOBAYASHI, R., ITOH, T. J., HAMAGUCHI, M. & SAITO, H. 2009. Mutation of the beta1-tubulin gene associated with congenital macrothrombocytopenia affecting microtubule assembly. *Blood*, 113, 458-61.
- KUNISHIMA, S., NISHIMURA, S., SUZUKI, H., IMAIZUMI, M. & SAITO, H. 2014. TUBB1 mutation disrupting microtubule assembly impairs proplatelet formation and results in congenital macrothrombocytopenia. *Eur J Haematol*, 92, 276-82.
- KUNISHIMA, S., OKUNO, Y., YOSHIDA, K., SHIRAISHI, Y., SANADA, M., MURAMATSU, H., CHIBA, K., TANAKA, H., MIYAZAKI, K., SAKAI, M., OHTAKE, M., KOBAYASHI, R., IGUCHI, A., NIIMI, G., OTSU, M., TAKAHASHI, Y., MIYANO, S., SAITO, H., KOJIMA, S. & OGAWA, S. 2013. ACTN1 mutations cause congenital macrothrombocytopenia. *Am J Hum Genet*, 92, 431-8.
- KYNDT, F., GUEFFET, J. P., PROBST, V., JAAFAR, P., LEGENDRE, A., LE BOUFFANT, F., TOQUET, C., ROY, E., MCGREGOR, L., LYNCH, S. A., NEWBURY-ECOB, R., TRAN,

- V., YOUNG, I., TROCHU, J. N., LE MAREC, H. & SCHOTT, J. J. 2007. Mutations in the gene encoding filamin A as a cause for familial cardiac valvular dystrophy. *Circulation*, 115, 40-9.
- LALEYE, A., DELNESTE, D., PRADIER, O., HANS, C., DARBOUX, R. & OGUR, G. 2002. Giant platelets in a case of deletion 11q24-qter confirmed by fluorescence in situ hybridization. *Am J Med Genet*, 110, 170-5.
- LANDRY, Y., NIEDERHOFFER, N., SICK, E. & GIES, J. P. 2006. Heptahelical and other G-protein-coupled receptors (GPCRs) signaling. *Curr Med Chem*, 13, 51-63.
- LANZA, F., GACHET, C., TOVO, D. & MANGIN, P. 2008. Signalisation via le complexe GPIb-V-IX plaquettaire. *Hématologie*, 14, 273-84.
- LI, W., ZHANG, Q., OISO, N., NOVAK, E. K., GAUTAM, R., O'BRIEN, E. P., TINSLEY, C. L., BLAKE, D. J., SPRITZ, R. A., COPELAND, N. G., JENKINS, N. A., AMATO, D., ROE, B. A., STARCEVIC, M., DELL'ANGELICA, E. C., ELLIOTT, R. W., MISHRA, V., KINGSMORE, S. F., PAYLOR, R. E. & SWANK, R. T. 2003. Hermansky-Pudlak syndrome type 7 (HPS-7) results from mutant dysbindin, a member of the biogenesis of lysosome-related organelles complex 1 (BLOC-1). *Nat Genet*, 35, 84-9.
- LORDIER, L., JALIL, A., AURADE, F., LARBRET, F., LARGHERO, J., DEBILI, N., VAINCHENKER, W. & CHANG, Y. 2008. Megakaryocyte endomitosis is a failure of late cytokinesis related to defects in the contractile ring and Rho/Rock signaling. *Blood*, 112, 3164-74.
- MA, Y. Q., QIN, J. & PLOW, E. F. 2007. Platelet integrin alpha(IIb)beta(3): activation mechanisms. *J Thromb Haemost*, 5, 1345-52.
- MACHLUS, K. R. & ITALIANO, J. E., JR. 2013. The incredible journey: From megakaryocyte development to platelet formation. *J Cell Biol*, 201, 785-96.
- MAMMADOVA-BACH, E., OLLIVIER, V., LOYAU, S., SCHAFF, M., DUMONT, B., FAVIER, R., FREYBURGER, G., LATGER-CANNARD, V., NIESWANDT, B., GACHET, C., MANGIN, P. H. & JANDROT-PERRUS, M. 2015. Platelet glycoprotein VI binds to polymerized fibrin and promotes thrombin generation. *Blood*, 126, 683-91.
- MANCHEV, V. T., HILPERT, M., BERROU, E., ELAIB, Z., AOUBA, A., BOUKOUR, S., SOUQUERE, S., PIERRON, G., RAMEAU, P., ANDREWS, R., LANZA, F., BOBE, R., VAINCHENKER, W., ROSA, J. P., BRYCKAERT, M., DEBILI, N., FAVIER, R. & RASLOVA, H. 2014. A new form of macrothrombocytopenia induced by a germ-line mutation in the PRKACG gene. *Blood*, 124, 2554-63.
- MANGIN, P., YUAN, Y., GONCALVES, I., ECKLY, A., FREUND, M., CAZENAVE, J. P., GACHET, C., JACKSON, S. P. & LANZA, F. 2003. Signaling role for phospholipase C gamma 2 in platelet glycoprotein Ib alpha calcium flux and cytoskeletal reorganization. Involvement of a pathway distinct from FcR gamma chain and Fc gamma RIIIA. *J Biol Chem*, 278, 32880-91.
- MARTINA, J. A., MORIYAMA, K. & BONIFACINO, J. S. 2003. BLOC-3, a protein complex containing the Hermansky-Pudlak syndrome gene products HPS1 and HPS4. *J Biol Chem*, 278, 29376-84.
- MASLIAH-PLANCHON, J., DARNIGE, L. & BELLUCCI, S. 2013. Molecular determinants of platelet delta storage pool deficiencies: an update. *Br J Haematol*, 160, 5-11.
- MASSAAD, M. J., RAMESH, N. & GEHA, R. S. 2013. Wiskott-Aldrich syndrome: a comprehensive review. *Ann N Y Acad Sci*, 1285, 26-43.
- MATHENY, C. J., SPECK, M. E., CUSHING, P. R., ZHOU, Y., CORPORA, T., REGAN, M., NEWMAN, M., ROUDAIA, L., SPECK, C. L., GU, T. L., GRIFFEY, S. M., BUSHWELLER, J. H. & SPECK, N. A. 2007. Disease mutations in RUNX1 and RUNX2 create nonfunctional, dominant-negative, or hypomorphic alleles. *EMBO J*, 26, 1163-75.

- MATUS, V., VALENZUELA, G., SAEZ, C. G., HIDALGO, P., LAGOS, M., ARANDA, E., PANES, O., PEREIRA, J., PILLOIS, X., NURDEN, A. T. & MEZZANO, D. 2013. An adenine insertion in exon 6 of human GP6 generates a truncated protein associated with a bleeding disorder in four Chilean families. *J Thromb Haemost*, 11, 1751-9.
- MAY, R. 1909. Leukozyteneinschlusse. *Dtsch. Arch. Klin. Med.*, 1-6.
- MCEVER, R. P., BAENZIGER, N. L. & MAJERUS, P. W. 1980. Isolation and quantitation of the platelet membrane glycoprotein deficient in thrombasthenia using a monoclonal hybridoma antibody. *J Clin Invest*, 66, 1311-8.
- MCFADYEN, J. D. & JACKSON, S. P. 2013. Differentiating haemostasis from thrombosis for therapeutic benefit. *Thromb Haemost*, 110, 859-67.
- MEZZANO, D., QUIROGA, T. & PEREIRA, J. 2009. The level of laboratory testing required for diagnosis or exclusion of a platelet function disorder using platelet aggregation and secretion assays. *Semin Thromb Hemost*, 35, 242-54.
- MICHAUD, J., WU, F., OSATO, M., COTTLES, G. M., YANAGIDA, M., ASOU, N., SHIGESADA, K., ITO, Y., BENSON, K. F., RASKIND, W. H., ROSSIER, C., ANTONARAKIS, S. E., ISRAELS, S., MCNICOL, A., WEISS, H., HORWITZ, M. & SCOTT, H. S. 2002. In vitro analyses of known and novel RUNX1/AML1 mutations in dominant familial platelet disorder with predisposition to acute myelogenous leukemia: implications for mechanisms of pathogenesis. *Blood*, 99, 1364-72.
- MICHELSON, A. D. 2013. *Platelets*, Amsterdam, Academic Press.
- MILLAR, R. P. & NEWTON, C. L. 2010. The year in G protein-coupled receptor research. *Mol Endocrinol*, 24, 261-74.
- MILLER, J. L., LYLE, V. A. & CUNNINGHAM, D. 1992. Mutation of leucine-57 to phenylalanine in a platelet glycoprotein Ib alpha leucine tandem repeat occurring in patients with an autosomal dominant variant of Bernard-Soulier disease. *Blood*, 79, 439-46.
- MILLS, D. C. 1996. ADP receptors on platelets. *Thromb Haemost*, 76, 835-56.
- MIRLASHARI, M. R., RYNINGEN, A., MIKKELSEN, H. M. & FUKAMI, M. H. 1996. Differential secretion of blood platelet storage granules. *Platelets*, 7, 313-20.
- MONCADA, S. & HIGGS, E. A. 1991. Endogenous nitric oxide: physiology, pathology and clinical relevance. *Eur J Clin Invest*, 21, 361-74.
- MONTEFERRARIO, D., BOLAR, N. A., MARNETH, A. E., HEBEDA, K. M., BERGEVOET, S. M., VEENSTRA, H., LAROS-VAN GORKOM, B. A., MACKENZIE, M. A., KHANDANPOUR, C., BOTEZATU, L., FRANSEN, E., VAN CAMP, G., DUIJNHOUWER, A. L., SALEMINK, S., WILLEMSSEN, B., HULS, G., PREIJERS, F., VAN HEERDE, W., JANSEN, J. H., KEMPERS, M. J., LOEYS, B. L., VAN LAER, L. & VAN DER REIJDEN, B. A. 2014. A dominant-negative GFI1B mutation in the gray platelet syndrome. *N Engl J Med*, 370, 245-53.
- MORGAN, N. V., PASHA, S., JOHNSON, C. A., AINSWORTH, J. R., EADY, R. A., DAWOOD, B., MCKEOWN, C., TREMBATH, R. C., WILDE, J., WATSON, S. P. & MAHER, E. R. 2006. A germline mutation in BLOC1S3/reduced pigmentation causes a novel variant of Hermansky-Pudlak syndrome (HPS8). *Am J Hum Genet*, 78, 160-6.
- MOROI, M., JUNG, S. M., OKUMA, M. & SHINMYOZU, K. 1989. A patient with platelets deficient in glycoprotein VI that lack both collagen-induced aggregation and adhesion. *J Clin Invest*, 84, 1440-5.
- MOROY, T. 2005. The zinc finger transcription factor Growth factor independence 1 (Gfi1). *Int J Biochem Cell Biol*, 37, 541-6.
- MOUNT-SINAI-SCHOOL-OF-MEDICINE. *Icahn School of Medicine at Mount Sinai* [Online]. Available: <http://sinaicentral.mssm.edu/intranet/research/glanzmann/listmutations?mut=all> [Accessed 27/10/2015].

- MUMFORD, A. D., FRELINGER, A. L., 3RD, GACHET, C., GRESELE, P., NORIS, P., HARRISON, P. & MEZZANO, D. 2015. A review of platelet secretion assays for the diagnosis of inherited platelet secretion disorders. *Thromb Haemost*, 114, 14-25.
- MUMFORD, A. D., NISAR, S., DARNIGE, L., JONES, M. L., BACHELOT-LOZA, C., GANDRILLE, S., ZINZINDOHOUE, F., FISCHER, A. M., MUNDELL, S. J., GAUSSEM, P. & GROUP, U. G. S. 2013. Platelet dysfunction associated with the novel Trp29Cys thromboxane A(2) receptor variant. *J Thromb Haemost*, 11, 547-54.
- MUNNIX, I. C., HARMSMA, M., GIDDINGS, J. C., COLLINS, P. W., FEIJGE, M. A., COMFURIUS, P., HEEMSKERK, J. W. & BEVERS, E. M. 2003. Store-mediated calcium entry in the regulation of phosphatidylserine exposure in blood cells from Scott patients. *Thromb Haemost*, 89, 687-95.
- MUSTARD, J. F., PACKHAM, M. A., KINLOUGH-RATHBONE, R. L., PERRY, D. W. & REGOECZI, E. 1978. Fibrinogen and ADP-induced platelet aggregation. *Blood*, 52, 453-66.
- MUSTARD, J. F., PERRY, D. W., ARDLIE, N. G. & PACKHAM, M. A. 1972. Preparation of suspensions of washed platelets from humans. *Br J Haematol*, 22, 193-204.
- MUSTARD, J. F., PERRY, D. W., KINLOUGH-RATHBONE, R. L. & PACKHAM, M. A. 1975. Factors responsible for ADP-induced release reaction of human platelets. *Am J Physiol*, 228, 1757-65.
- NACHMAN, R. L. & FERRIS, B. 1972. Studies on the proteins of human platelet membranes. *J Biol Chem*, 247, 4468-75.
- NESBITT, W. S., KULKARNI, S., GIULIANO, S., GONCALVES, I., DOPHEIDE, S. M., YAP, C. L., HARPER, I. S., SALEM, H. H. & JACKSON, S. P. 2002. Distinct glycoprotein Ib/V/IX and integrin alpha IIb beta 3-dependent calcium signals cooperatively regulate platelet adhesion under flow. *J Biol Chem*, 277, 2965-72.
- NICHOLS, K. E., CRISPINO, J. D., PONCZ, M., WHITE, J. G., ORKIN, S. H., MARIS, J. M. & WEISS, M. J. 2000. Familial dyserythropoietic anaemia and thrombocytopenia due to an inherited mutation in GATA1. *Nat Genet*, 24, 266-70.
- NIESWANDT, B. & WATSON, S. P. 2003. Platelet-collagen interaction: is GPVI the central receptor? *Blood*, 102, 449-61.
- NIEUWENHUIS, H. K., AKKERMAN, J. W. & SIXMA, J. J. 1987. Patients with a prolonged bleeding time and normal aggregation tests may have storage pool deficiency: studies on one hundred six patients. *Blood*, 70, 620-3.
- NIGHTINGALE, T. & CUTLER, D. 2013. The secretion of von Willebrand factor from endothelial cells; an increasingly complicated story. *J Thromb Haemost*, 11 Suppl 1, 192-201.
- NISAR, S. P., LORDKIPANIDZE, M., JONES, M. L., DAWOOD, B., MURDEN, S., CUNNINGHAM, M. R., MUMFORD, A. D., WILDE, J. T., WATSON, S. P., MUNDELL, S. J., LOWE, G. C. & GROUP, U. G. S. 2014. A novel thromboxane A2 receptor N42S variant results in reduced surface expression and platelet dysfunction. *Thromb Haemost*, 111, 923-32.
- NISHIBORI, M., CHAM, B., MCNICOL, A., SHALEV, A., JAIN, N. & GERRARD, J. M. 1993. The protein CD63 is in platelet dense granules, is deficient in a patient with Hermansky-Pudlak syndrome, and appears identical to granulophysin. *J Clin Invest*, 91, 1775-82.
- NORIS, P., BIINO, G., PECCI, A., CIVASCHI, E., SAVOIA, A., SERI, M., MELAZZINI, F., LOFFREDO, G., RUSSO, G., BOZZI, V., NOTARANGELO, L. D., GRESELE, P., HELLER, P. G., PUJOL-MOIX, N., KUNISHIMA, S., CATTANEO, M., BUSSEL, J., DE CANDIA, E., CAGIONI, C., RAMENGHI, U., BAROZZI, S., FABRIS, F. & BALDUINI, C. L. 2014a. Platelet diameters in inherited thrombocytopenias: analysis of 376 patients with all known disorders. *Blood*, 124, e4-e10.
- NORIS, P., PERROTTA, S., BOTTEGA, R., PECCI, A., MELAZZINI, F., CIVASCHI, E., RUSSO, S., MAGRIN, S., LOFFREDO, G., DI SALVO, V., RUSSO, G., CASALE, M., DE ROCCO,

- D., GRIGNANI, C., CATTANEO, M., BARONCI, C., DRAGANI, A., ALBANO, V., JANKOVIC, M., SCIANGUETTA, S., SAVOIA, A. & BALDUINI, C. L. 2012. Clinical and laboratory features of 103 patients from 42 Italian families with inherited thrombocytopenia derived from the monoallelic Ala156Val mutation of GPIIb/IIIa (Bolzano mutation). *Haematologica*, 97, 82-8.
- NORIS, P., SCHLEGEL, N., KLERSY, C., HELLER, P. G., CIVASCHI, E., PUJOL-MOIX, N., FABRIS, F., FAVIER, R., GRESELE, P., LATGER-CANNARD, V., CUKER, A., NURDEN, P., GREINACHER, A., CATTANEO, M., DE CANDIA, E., PECCI, A., HURTAUD-ROUX, M. F., GLEMBOTSKY, A. C., MUNIZ-DIAZ, E., RANDI, M. L., TRILLOT, N., BURY, L., LECOMPTE, T., MARCONI, C., SAVOIA, A., BALDUINI, C. L., BAYART, S., BAUTERS, A., BENABDALLAH-GUEDIRA, S., BOEHLEN, F., BORG, J. Y., BOTTEGA, R., BUSSEL, J., DE ROCCO, D., DE MAISTRE, E., FALESCHINI, M., FALCINELLI, E., FERRARI, S., FERSTER, A., FIERRO, T., FLEURY, D., FONTANA, P., JAMES, C., LANZA, F., LE CAM DUCHEZ, V., LOFFREDO, G., MAGINI, P., MARTIN-COIGNARD, D., MENARD, F., MERCIER, S., MEZZASOMA, A., MINUZ, P., NICHELE, I., NOTARANGELO, L. D., PIPPUCCI, T., PODDA, G. M., POUYMAYOU, C., RIGOUZZO, A., ROYER, B., SIE, P., SIGURET, V., TRICHET, C., TUCCI, A., SAPOSNIK, B., VENERI, D., EUROPEAN HEMATOLOGY ASSOCIATION - SCIENTIFIC WORKING GROUP ON, T. & PLATELET FUNCTION, D. 2014b. Analysis of 339 pregnancies in 181 women with 13 different forms of inherited thrombocytopenia. *Haematologica*, 99, 1387-94.
- NURDEN, A. T. 2007. Platelet membrane glycoproteins: a look back into the past and a view to the future. *Thromb Haemost*, 98, 49-54.
- NURDEN, A. T. & CAEN, J. P. 1974. An abnormal platelet glycoprotein pattern in three cases of Glanzmann's thrombasthenia. *Br J Haematol*, 28, 253-60.
- NURDEN, A. T., FIORE, M., NURDEN, P. & PILLOIS, X. 2011a. Glanzmann thrombasthenia: a review of ITGA2B and ITGB3 defects with emphasis on variants, phenotypic variability, and mouse models. *Blood*, 118, 5996-6005.
- NURDEN, A. T., FRESON, K. & SELIGSOHN, U. 2012. Inherited platelet disorders. *Haemophilia*, 18 Suppl 4, 154-60.
- NURDEN, A. T., PILLOIS, X., FIORE, M., ALESSI, M. C., BONDUEL, M., DREYFUS, M., GOUEMAND, J., GRUEL, Y., BENABDALLAH-GUERIDA, S., LATGER-CANNARD, V., NEGRIER, C., NUGENT, D., OIRON, R. D., RAND, M. L., SIE, P., TROSSAERT, M., ALBERIO, L., MARTINS, N., SIRVAIN-TRUKNIEWICZ, P., COULOUX, A., CANAULT, M., FRONTHROTH, J. P., FRETIGNY, M., NURDEN, P., HEILIG, R. & VINCIGUERRA, C. 2015. Expanding the Mutation Spectrum Affecting alphaIIb beta3 Integrin in Glanzmann Thrombasthenia: Screening of the ITGA2B and ITGB3 Genes in a Large International Cohort. *Hum Mutat*, 36, 548-61.
- NURDEN, P., DEBILI, N., COUPRY, I., BRYCKAERT, M., YOLYUOZ-MARFAK, I., SOLE, G., PONS, A. C., BERROU, E., ADAM, F., KAUSKOT, A., LAMAZIERE, J. M., RAMEAU, P., FERGELOT, P., ROORYCK, C., CAILLEY, D., ARVEILER, B., LACOMBE, D., VAINCHENKER, W., NURDEN, A. & GOIZET, C. 2011b. Thrombocytopenia resulting from mutations in filamin A can be expressed as an isolated syndrome. *Blood*, 118, 5928-37.
- NURDEN, P., JANDROT-PERRUS, M., COMBRIE, R., WINCKLER, J., AROCAS, V., LECUT, C., PASQUET, J. M., KUNICKI, T. J. & NURDEN, A. T. 2004. Severe deficiency of glycoprotein VI in a patient with gray platelet syndrome. *Blood*, 104, 107-14.
- NURDEN, P., SAVI, P., HEILMANN, E., BIHOUR, C., HERBERT, J. M., MAFFRAND, J. P. & NURDEN, A. 1995. An inherited bleeding disorder linked to a defective interaction between

- ADP and its receptor on platelets. Its influence on glycoprotein IIb-IIIa complex function. *J Clin Invest*, 95, 1612-22.
- O'BRIEN J, R. 1962. Platelet aggregation: Part I Some effects of the adenosine phosphates, thrombin, and cocaine upon platelet adhesiveness. *J Clin Pathol*, 15, 446-52.
- OCHS, H. D. 2009. Mutations of the Wiskott-Aldrich Syndrome Protein affect protein expression and dictate the clinical phenotypes. *Immunol Res*, 44, 84-8.
- OHKAWA, R., HIROWATARI, Y., NAKAMURA, K., OHKUBO, S., IKEDA, H., OKADA, M., TOZUKA, M., NAKAHARA, K. & YATOMI, Y. 2005. Platelet release of beta-thromboglobulin and platelet factor 4 and serotonin in plasma samples. *Clin Biochem*, 38, 1023-6.
- OHLMANN, P., LECCHI, A., EL-TAYEB, A., MULLER, C. E., CATTANEO, M. & GACHET, C. 2013. The platelet P2Y₁₂ receptor under normal and pathological conditions. Assessment with the radiolabeled selective antagonist [(3)H]PSB-0413. *Purinergic Signal*, 9, 59-66.
- OSATO, M. 2004. Point mutations in the RUNX1/AML1 gene: another actor in RUNX leukemia. *Oncogene*, 23, 4284-96.
- PATEL, Y. M., LORDKIPANIDZE, M., LOWE, G. C., NISAR, S. P., GARNER, K., STOCKLEY, J., DALY, M. E., MITCHELL, M., WATSON, S. P., AUSTIN, S. K. & MUNDELL, S. J. 2014. A novel mutation in the P2Y₁₂ receptor and a function-reducing polymorphism in protease-activated receptor 1 in a patient with chronic bleeding. *J Thromb Haemost*, 12, 716-25.
- PECCI, A., KLERSY, C., GRESELE, P., LEE, K. J., DE ROCCO, D., BOZZI, V., RUSSO, G., HELLER, P. G., LOFFREDO, G., BALLMAIER, M., FABRIS, F., BEGGIATO, E., KAHR, W. H., PUJOL-MOIX, N., PLATOKOUKI, H., VAN GEET, C., NORIS, P., YERRAM, P., HERMANS, C., GERBER, B., ECONOMOU, M., DE GROOT, M., ZIEGER, B., DE CANDIA, E., FRATICELLI, V., KERSSEBOOM, R., PICCOLI, G. B., ZIMMERMANN, S., FIERRO, T., GLEMBOTSKY, A. C., VIANELLO, F., ZANINETTI, C., NICCHIA, E., GUTHNER, C., BARONCI, C., SERI, M., KNIGHT, P. J., BALDUINI, C. L. & SAVOIA, A. 2014. MYH9-related disease: a novel prognostic model to predict the clinical evolution of the disease based on genotype-phenotype correlations. *Hum Mutat*, 35, 236-47.
- PHILLIPS, J. D., STEENSMA, D. P., PULSIPHER, M. A., SPANGRUDE, G. J. & KUSHNER, J. P. 2007. Congenital erythropoietic porphyria due to a mutation in GATA1: the first trans-acting mutation causative for a human porphyria. *Blood*, 109, 2618-21.
- QUIROGA, T., GOYCOOLEA, M., PANES, O., ARANDA, E., MARTINEZ, C., BELMONT, S., MUNOZ, B., ZUNIGA, P., PEREIRA, J. & MEZZANO, D. 2007. High prevalence of bleeders of unknown cause among patients with inherited mucocutaneous bleeding. A prospective study of 280 patients and 299 controls. *Haematologica*, 92, 357-65.
- REMIJN, J. A., MJ, I. J., STRUNK, A. L., ABBES, A. P., ENGEL, H., DIKKESCHEI, B., DOMPELING, E. C., DE GROOT, P. G. & SLINGERLAND, R. J. 2007. Novel molecular defect in the platelet ADP receptor P2Y₁₂ of a patient with haemorrhagic diathesis. *Clin Chem Lab Med*, 45, 187-9.
- SAKAMOTO, S., MIYAJI, T., HIASA, M., ICHIKAWA, R., UEMATSU, A., IWATSUKI, K., SHIBATA, A., UNEYAMA, H., TAKAYANAGI, R., YAMAMOTO, A., OMOTE, H., NOMURA, M. & MORIYAMA, Y. 2014. Impairment of vesicular ATP release affects glucose metabolism and increases insulin sensitivity. *Sci Rep*, 4, 6689.
- SANGER, F., NICKLEN, S. & COULSON, A. R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74, 5463-7.
- SANKARAN, V. G., GHAZVINIAN, R., DO, R., THIRU, P., VERGILIO, J. A., BEGGS, A. H., SIEFF, C. A., ORKIN, S. H., NATHAN, D. G., LANDER, E. S. & GAZDA, H. T. 2012. Exome sequencing identifies GATA1 mutations resulting in Diamond-Blackfan anemia. *J Clin Invest*, 122, 2439-43.

- SAVI, P., PEREILLO, J. M., UZABIAGA, M. F., COMBALBERT, J., PICARD, C., MAFFRAND, J. P., PASCAL, M. & HERBERT, J. M. 2000. Identification and biological activity of the active metabolite of clopidogrel. *Thromb Haemost*, 84, 891-6.
- SAVI, P., ZACHAYUS, J. L., DELESQUE-TOUCHARD, N., LABOURET, C., HERVE, C., UZABIAGA, M. F., PEREILLO, J. M., CULOUSCOU, J. M., BONO, F., FERRARA, P. & HERBERT, J. M. 2006. The active metabolite of Clopidogrel disrupts P2Y₁₂ receptor oligomers and partitions them out of lipid rafts. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 11069-74.
- SAVOIA, A., KUNISHIMA, S., DE ROCCO, D., ZIEGER, B., RAND, M. L., PUJOL-MOIX, N., CALISKAN, U., TOKGOZ, H., PECCI, A., NORIS, P., SRIVASTAVA, A., WARD, C., MOREL-KOPP, M. C., ALESSI, M. C., BELLUCCI, S., BEURRIER, P., DE MAISTRE, E., FAVIER, R., HEZARD, N., HURTAUD-ROUX, M. F., LATGER-CANNARD, V., LAVENU-BOMBLED, C., PROULLE, V., MEUNIER, S., NEGRIER, C., NURDEN, A., RANDRIANAIVO, H., FABRIS, F., PLATOKOUKI, H., ROSENBERG, N., HADJKACEM, B., HELLER, P. G., KARIMI, M., BALDUINI, C. L., PASTORE, A. & LANZA, F. 2014. Spectrum of the mutations in Bernard-Soulier syndrome. *Hum Mutat*, 35, 1033-45.
- SAVOIA, A., PASTORE, A., DE ROCCO, D., CIVASCHI, E., DI STAZIO, M., BOTTEGA, R., MELAZZINI, F., BOZZI, V., PECCI, A., MAGRIN, S., BALDUINI, C. L. & NORIS, P. 2011. Clinical and genetic aspects of Bernard-Soulier syndrome: searching for genotype/phenotype correlations. *Haematologica*, 96, 417-23.
- SAWADA, K., ECHIGO, N., JUGE, N., MIYAJI, T., OTSUKA, M., OMOTE, H., YAMAMOTO, A. & MORIYAMA, Y. 2008. Identification of a vesicular nucleotide transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 5683-6.
- SCHAFER, A. A. 2013. Digenic inheritance in medical genetics. *J Med Genet*, 50, 641-52.
- SCHOBBER, J. M., LAM, S. C. & WENCEL-DRAKE, J. D. 2003. Effect of cellular and receptor activation on the extent of integrin α IIb β 3 internalization. *J Thromb Haemost*, 1, 2404-10.
- SEPULVEDA, F. E., BURGESS, A., HEILIGENSTEIN, X., GOUDIN, N., MENAGER, M. M., ROMAO, M., COTE, M., MAHLAOU, N., FISCHER, A., RAPOSO, G., MENASCHE, G. & DE SAINT BASILE, G. 2015. LYST controls the biogenesis of the endosomal compartment required for secretory lysosome function. *Traffic*, 16, 191-203.
- SERI, M., CUSANO, R., GANGAROSSA, S., CARIDI, G., BORDO, D., LO NIGRO, C., GHIGGERI, G. M., RAVAZZOLO, R., SAVINO, M., DEL VECCHIO, M., D'APOLITO, M., IOLASCON, A., ZELANTE, L. L., SAVOIA, A., BALDUINI, C. L., NORIS, P., MAGRINI, U., BELLETTI, S., HEATH, K. E., BABCOCK, M., GLUCKSMAN, M. J., ALIPRANDIS, E., BIZZARO, N., DESNICK, R. J. & MARTIGNETTI, J. A. 2000. Mutations in MYH9 result in the May-Hegglin anomaly, and Fechtner and Sebastian syndromes. The May-Hegglin/Fechtner Syndrome Consortium. *Nat Genet*, 26, 103-5.
- SHATTIL, S. J., O'TOOLE, T., EIGENTHALER, M., THON, V., WILLIAMS, M., BABIOR, B. M. & GINSBERG, M. H. 1995. Beta 3-endonexin, a novel polypeptide that interacts specifically with the cytoplasmic tail of the integrin β 3 subunit. *J Cell Biol*, 131, 807-16.
- SHEN, B., ZHAO, X., O'BRIEN, K. A., STOJANOVIC-TERPO, A., DELANEY, M. K., KIM, K., CHO, J., LAM, S. C. & DU, X. 2013. A directional switch of integrin signalling and a new anti-thrombotic strategy. *Nature*, 503, 131-5.
- SLADKY, J. L., KLIMA, J., GROOMS, L., KERLIN, B. A. & O'BRIEN, S. H. 2012. The PFA-100 (R) does not predict delta-granule platelet storage pool deficiencies. *Haemophilia*, 18, 626-9.
- SMITH, S. A. & MORRISSEY, J. H. 2008. Polyphosphate enhances fibrin clot structure. *Blood*, 112, 2810-6.
- SONG, W. J., SULLIVAN, M. G., LEGARE, R. D., HUTCHINGS, S., TAN, X., KUFRIN, D., RATAJCZAK, J., RESENDE, I. C., HAWORTH, C., HOCK, R., LOH, M., FELIX, C., ROY,

- D. C., BUSQUE, L., KURNIT, D., WILLMAN, C., GEWIRTZ, A. M., SPECK, N. A., BUSHWELLER, J. H., LI, F. P., GARDINER, K., PONCZ, M., MARIS, J. M. & GILLILAND, D. G. 1999. Haploinsufficiency of CBFA2 causes familial thrombocytopenia with propensity to develop acute myelogenous leukaemia. *Nat Genet*, 23, 166-75.
- SONGDEJ, N. & RAO, A. K. 2015. Hematopoietic transcription factor mutations and inherited platelet dysfunction. *F1000Prime Rep*, 7, 66.
- STARCEVIC, M. & DELL'ANGELICA, E. C. 2004. Identification of snapin and three novel proteins (BLOS1, BLOS2, and BLOS3/reduced pigmentation) as subunits of biogenesis of lysosome-related organelles complex-1 (BLOC-1). *J Biol Chem*, 279, 28393-401.
- STEVENSON, W. S., MOREL-KOPP, M. C., CHEN, Q., LIANG, H. P., BROMHEAD, C. J., WRIGHT, S., TURAKULOV, R., NG, A. P., ROBERTS, A. W., BAHLO, M. & WARD, C. M. 2013. GFI1B mutation causes a bleeding disorder with abnormal platelet function. *J Thromb Haemost*, 11, 2039-47.
- STEVENSON, W. S., RABBOLINI, D. J., BEUTLER, L., CHEN, Q., GABRIELLI, S., MACKAY, J. P., BRIGHTON, T. A., WARD, C. M. & MOREL-KOPP, M. C. 2015. Paris-Trousseau thrombocytopenia is phenocopied by the autosomal recessive inheritance of a DNA-binding domain mutation in FLI1. *Blood*, 126, 2027-30.
- SUGIYAMA, T., OKUMA, M., USHIKUBI, F., SENSACKI, S., KANAJI, K. & UCHINO, H. 1987. A novel platelet aggregating factor found in a patient with defective collagen-induced platelet aggregation and autoimmune thrombocytopenia. *Blood*, 69, 1712-20.
- SUZUKI, J., UMEDA, M., SIMS, P. J. & NAGATA, S. 2010. Calcium-dependent phospholipid scrambling by TMEM16F. *Nature*, 468, 834-8.
- SVENSSON, L., HOWARTH, K., MCDOWALL, A., PATZAK, I., EVANS, R., USSAR, S., MOSER, M., METIN, A., FRIED, M., TOMLINSON, I. & HOGG, N. 2009. Leukocyte adhesion deficiency-III is caused by mutations in KINDLIN3 affecting integrin activation. *Nat Med*, 15, 306-12.
- TAKAHASHI, H., YOSHINO, N. & SHIBATA, A. 1988. Measurement of platelet factor 4 and beta-thromboglobulin by an enzyme-linked immunosorbent assay. *Clin Chim Acta*, 175, 113-4.
- THOMPSON, A. A. & NGUYEN, L. T. 2000. Amegakaryocytic thrombocytopenia and radio-ulnar synostosis are associated with HOXA11 mutation. *Nat Genet*, 26, 397-8.
- THON, J. N. & ITALIANO, J. E. 2010. Platelet formation. *Semin Hematol*, 47, 220-6.
- TIMMONS, S., KLOCZEWIAK, M. & HAWIGER, J. 1984. ADP-dependent common receptor mechanism for binding of von Willebrand factor and fibrinogen to human platelets. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 81, 4935-9.
- TUBMAN, V. N., LEVINE, J. E., CAMPAGNA, D. R., MONAHAN-EARLEY, R., DVORAK, A. M., NEUFELD, E. J. & FLEMING, M. D. 2007. X-linked gray platelet syndrome due to a GATA1 Arg216Gln mutation. *Blood*, 109, 3297-9.
- VAN DER LINDEN, N., KLINKENBERG, L. J., MEEX, S. J., BECKERS, E. A., DE WIT, N. C. & PRINZEN, L. 2014. Immature platelet fraction measured on the Sysmex XN hemocytometer predicts thrombopoietic recovery after autologous stem cell transplantation. *Eur J Haematol*, 93, 150-6.
- VAN KRUCHTEN, R., MATTHEIJ, N. J., SAUNDERS, C., FEIJGE, M. A., SWIERINGA, F., WOLFS, J. L., COLLINS, P. W., HEEMSKERK, J. W. & BEVERS, E. M. 2013. Both TMEM16F-dependent and TMEM16F-independent pathways contribute to phosphatidylserine exposure in platelet apoptosis and platelet activation. *Blood*, 121, 1850-7.
- VERSTEEG, H. H., HEEMSKERK, J. W., LEVI, M. & REITSMA, P. H. 2013. New fundamentals in hemostasis. *Physiol Rev*, 93, 327-58.
- VU, T. K., HUNG, D. T., WHEATON, V. I. & COUGHLIN, S. R. 1991. Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. *Cell*, 64, 1057-68.

- WANG, Q., STACY, T., BINDER, M., MARIN-PADILLA, M., SHARPE, A. H. & SPECK, N. A. 1996. Disruption of the Cbfa2 gene causes necrosis and hemorrhaging in the central nervous system and blocks definitive hematopoiesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 3444-9.
- WANG, R., SHATTIL, S. J., AMBRUSO, D. R. & NEWMAN, P. J. 1997. Truncation of the cytoplasmic domain of beta3 in a variant form of Glanzmann thrombasthenia abrogates signaling through the integrin alpha(IIb)beta3 complex. *J Clin Invest*, 100, 2393-403.
- WARNER, T. D. 1996. Influence of endothelial mediators on the vascular smooth muscle and circulating platelets and blood cells. *Int Angiol*, 15, 93-9.
- WEBB, T. E., BATESON, A. N. & BARNARD, E. A. 1993. Isolation and characterization of a novel family of G protein-coupled receptors. *Biochem Soc Trans*, 21, 199S.
- WEISS, H. J., MEYER, D., RABINOWITZ, R., PIETU, G., GIRMA, J. P., VICIC, W. J. & ROGERS, J. 1982. Pseudo-von Willebrand's disease. An intrinsic platelet defect with aggregation by unmodified human factor VIII/von Willebrand factor and enhanced adsorption of its high-molecular-weight multimers. *N Engl J Med*, 306, 326-33.
- WESTBROEK, W., TUCHMAN, M., TINLOY, B., DE WEVER, O., VILBOUX, T., HERTZ, J. M., HASLE, H., HEILMANN, C., HELIP-WOOLEY, A., KLETA, R. & GAHL, W. A. 2008. A novel missense mutation (G43S) in the switch I region of Rab27A causing Griscelli syndrome. *Mol Genet Metab*, 94, 248-54.
- WHITE, J. G. 1968. The substructure of human platelet microtubules. *Blood*, 32, 638-48.
- WHITE, J. G. & ESCOLAR, G. 1991. The blood platelet open canalicular system: a two-way street. *Eur J Cell Biol*, 56, 233-42.
- WHITE, J. G. & GERRARD, J. M. 1976. Ultrastructural features of abnormal blood platelets. A review. *Am J Pathol*, 83, 589-632.
- WHITE, J. G., GERRARD, J. M., RAO, G. H., EDSON, J. R. & WITKOP, C. J. 1975. Proceedings: Differences in platelet storage pool deficiency (SPD) of Hermansky Pudlak syndrome (HPS) and non-albinos (NA). *Thromb Diath Haemorrh*, 34, 360-1.
- WHITE, J. G. & RAO, G. H. 1998. Microtubule coils versus the surface membrane cytoskeleton in maintenance and restoration of platelet discoid shape. *Am J Pathol*, 152, 597-609.
- WINK, M. R., BRAGANHOL, E., TAMAJUSUKU, A. S., LENZ, G., ZERBINI, L. F., LIBERMANN, T. A., SEVIGNY, J., BATTASTINI, A. M. & ROBSON, S. C. 2006. Nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-2 (NTPDase2/CD39L1) is the dominant ectonucleotidase expressed by rat astrocytes. *Neuroscience*, 138, 421-32.
- WU, Y., SPAN, L. M., NYGREN, P., ZHU, H., MOORE, D. T., CHENG, H., RODER, H., DEGRADO, W. F. & BENNETT, J. S. 2015. The Tyrosine Kinase c-Src Specifically Binds to the Active Integrin alphaIIb beta3 to Initiate Outside-in Signaling in Platelets. *J Biol Chem*, 290, 15825-34.
- YOUSSEFIAN, T., MASSE, J. M., RENDU, F., GUICHARD, J. & CRAMER, E. M. 1997. Platelet and megakaryocyte dense granules contain glycoproteins Ib and IIb-IIIa. *Blood*, 89, 4047-57.
- ZAHID, M., MANGIN, P., LOYAU, S., HECHLER, B., BILLIALD, P., GACHET, C. & JANDROT-PERRUS, M. 2012. The future of glycoprotein VI as an antithrombotic target. *J Thromb Haemost*, 10, 2418-27.
- ZHANG, G., XIANG, B., YE, S., CHRZANOWSKA-WODNICKA, M., MORRIS, A. J., GARTNER, T. K., WHITEHEART, S. W., WHITE, G. C., 2ND, SMYTH, S. S. & LI, Z. 2011. Distinct roles for Rap1b protein in platelet secretion and integrin alphaIIb beta3 outside-in signaling. *J Biol Chem*, 286, 39466-77.
- ZHANG, J., ZHANG, K., GAO, Z. G., PAOLETTA, S., ZHANG, D., HAN, G. W., LI, T., MA, L., ZHANG, W., MULLER, C. E., YANG, H., JIANG, H., CHEREZOV, V., KATRITCH, V., JACOBSON, K. A., STEVENS, R. C., WU, B. & ZHAO, Q. 2014a. Agonist-bound structure of the human P2Y12 receptor. *Nature*, 509, 119-22.

- ZHANG, K., ZHANG, J., GAO, Z. G., ZHANG, D., ZHU, L., HAN, G. W., MOSS, S. M., PAOLETTA, S., KISELEV, E., LU, W., FENALTI, G., ZHANG, W., MULLER, C. E., YANG, H., JIANG, H., CHEREZOV, V., KATRITCH, V., JACOBSON, K. A., STEVENS, R. C., WU, B. & ZHAO, Q. 2014b. Structure of the human P2Y₁₂ receptor in complex with an antithrombotic drug. *Nature*, 509, 115-8.
- ZHANG, Y., CONTI, M. A., MALIDE, D., DONG, F., WANG, A., SHMIST, Y. A., LIU, C., ZERFAS, P., DANIELS, M. P., CHAN, C. C., KOZIN, E., KACHAR, B., KELLEY, M. J., KOPP, J. B. & ADELSTEIN, R. S. 2012. Mouse models of MYH9-related disease: mutations in nonmuscle myosin II-A. *Blood*, 119, 238-50.
- ZHOU, Y. F., ENG, E. T., ZHU, J., LU, C., WALZ, T. & SPRINGER, T. A. 2012. Sequence and structure relationships within von Willebrand factor. *Blood*, 120, 449-58.
- ZUCKER, M. B., PERT, J. H. & HILGARTNER, M. W. 1966. Platelet function in a patient with thrombasthenia. *Blood*, 28, 524-34.

Arnaud DUPUIS

DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE, CARACTERISATION MOLECULAIRE ET IDENTIFICATION DE NOUVEAUX GENES IMPLIQUES DANS DES THROMBOPATHIES CONGENITALES NON ETIQUETTES

Résumé

Les thrombopathies congénitales sont des pathologies au phénotype hémorragique hétérogène dues à des anomalies fonctionnelles des plaquettes sanguines parfois associées à des anomalies morphologiques et/ou à une thrombopénie. Les outils diagnostic disponibles permettent de corréler une anomalie fonctionnelle plaquettaire à un déficit protéique voire à une mutation d'un gène spécifique. Cependant, en 2015, au moins 50% des thrombopathies restent non étiquetées. Dans ce contexte, le laboratoire d'hémostase de l'EFS Alsace et l'unité INSERM UMR S949 travaillent de concert à l'identification et à la caractérisation de ces pathologies. Ainsi, nous avons mis en évidence trois nouvelles mutations du récepteur P2Y₁₂ dans trois familles différentes. La mutation p.His187Gln a été entièrement caractérisée sur des plaquettes fraîches du patient et dans un modèle cellulaire adapté. La reproduction des deux autres mutations (p.Tyr259Cys et p.Phe95Ser) est en cours. Nous avons par ailleurs identifié une famille dont trois membres sont atteints d'une maladie du pool vide non syndromique et nous suspectons grâce au séquençage d'exome effectué que le transporteur de nucléotides VNUT est impliqué dans la pathologie.

Mots clés : thrombopathies congénitales, maladie du pool vide, récepteur P2Y₁₂

Summary

Inherited platelets disorders (IPD) are pathologies associated with heterogeneous bleeding phenotypes. They are due to functional platelets deficiency that may come with morphological abnormalities and/or thrombocytopenia. Available diagnosis tools are used to link a functional deficiency to a protein defect and in some instances to a specific genetic mutation. However, in 2015 at least 50% of IPD are still not identified. In this context, the haemostasis laboratory of the EFS Alsace together with INSERM UMR S949 team are working to diagnose and characterize these pathologies. Thus, we found three new P2Y₁₂ receptor variants in three different families. The mutation p.His187Gln has been fully characterized on blood fresh platelets coming from one patient and in an appropriate cellular model. The reproduction of the two other mutations (p.Tyr259Cys and p.Phe95Ser) is currently ongoing. We also studied a family in which three members are carrying a delta storage pool disease. The full exome sequencing analysis leads us to suspect the involvement of the nucleotides transporter VNUT in this pathology.

Key words : inherited platelet disorders, δ -storage pool disease, P2Y₁₂ receptor