Thrombopathies constitutionnelles

Les thrombopathies d'origine constitutionnelle sont un groupe hétérogène de pathologies rares. Elles peuvent concerner chaque étape de la physiologie plaquettaire. Elles sont isolées, associées à une thrombopénie ou à des atteintes hématologiques ou extra-hématologiques, on parle alors de thrombopathies syndromiques.

· 26 gènes impliqués



Intérêt de dépister les thrombopathies héréditaires

- Eviter l'errance diagnostique
- Dépister les complications extrahématologiques qui nécessitent une prise en charge adaptée : déficit immunitaire (LADIII),
- Prise en charge thérapeutique et diagnostic prénatal
- Améliorer les connaissances sur ces pathologies, permettant une meilleure compréhension, et donc amélioration de la prise en charge



Thrombopathies Comment les diagnostiquer

- Saignement cutanéo muqueux (epistaxis ecchymose, ménorragie)
- Histoire familiale
- Exploration biologique
 Coagulation normale
 Fibrinolyse normale
- Test globaux, agrégation plaquettaire, Cytométrie en flux, ME, gène



TYPE DE SAIGNEMENT oriente les explorations

| CARACTERISTIQUES CLINIQUES | DEFAUT PLAQUETTAIRE | DEFICIT DE COAGULATION |
|--|-------------------------------------|---------------------------------------|
| Site | Tissus superficiels | Tissus mous profonds |
| Pétechies | Présent | Absent |
| Ecchymoses | Petites, superficelles Muqueuses | Larges, palpables |
| Hémarthroses, hématomes | Rare | Commun |
| Saignement après coupure superficielle chirurgie | prolongé Immédiat modéré | Moins systématique Retardé, sévère |



Eliminer toute prise médicamenteuse (interrogatoire)

Antiplaquettaires

AINS

Antibiotiques, antifungiques

Inhibiteur de la recapture de la sérotonine

Cardiovasculaire

Hypolipémiant

Chimiothérapie

Valproate

Inhibiteurs de tyr-kinase (VEGF-R)

Augmentation cAMP or cGMP

Associations comorbides (interrogatoire, examen, NFS)

Anémie

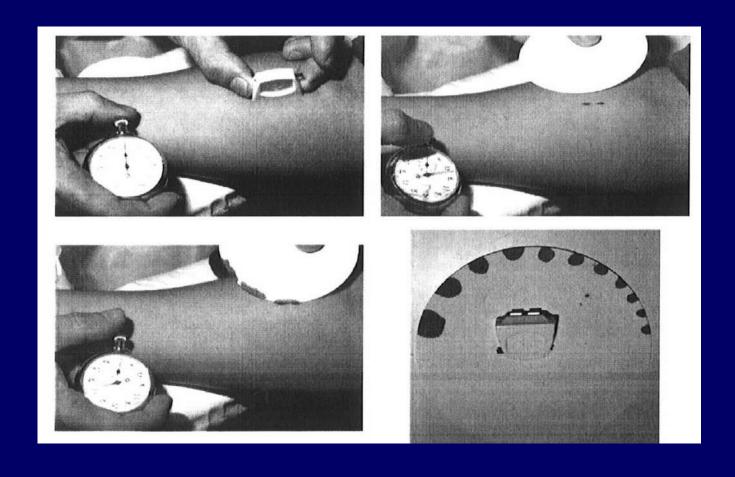
Insuffisance rénale

hémopathie maligne



Test de dépistage Temps de saignement

Duke 1910

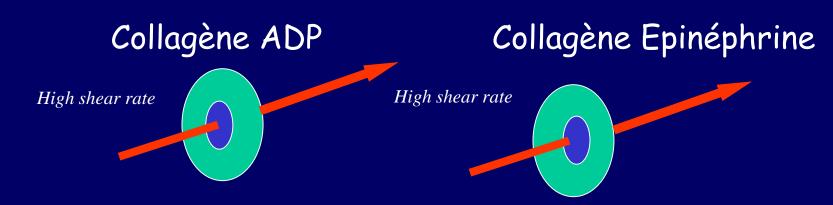




PFA-100 (Dade Behring)

Naissance en 1995





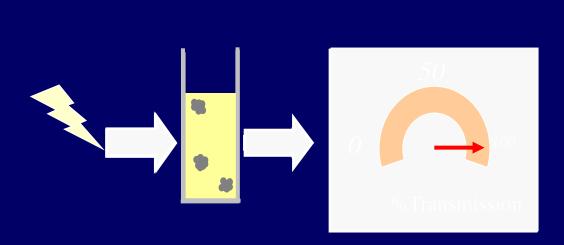




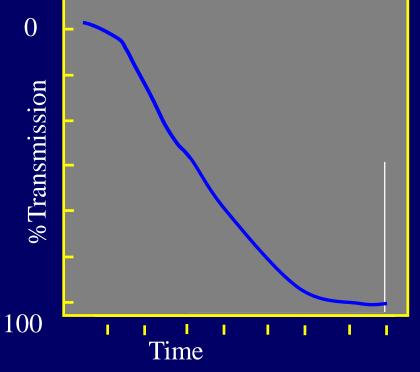
Agrégation plaquettaire

Mesure: transmission lumineuse

Agoniste: ADP, thrombine adrénaline, collagène

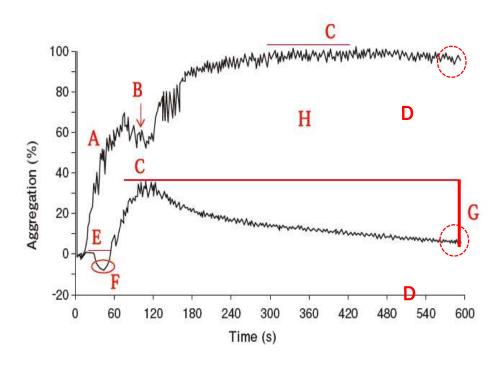


Agoniste ajouté au temps o





Measured parameters



The interpretation of these parameters is most of the time the first step in the biological diagnosis of platelet dysfunctions

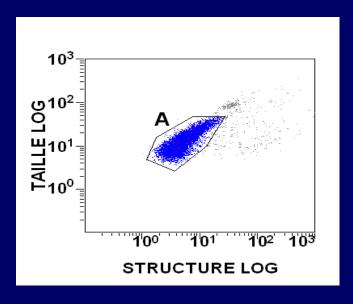
| | ISTH commonly |
|---|--|
| А | Slope pf aggregation |
| В | Secondary wave |
| С | Maximal amplitude or % aggregation |
| D | Amplitude of % aggregation at end of observation |
| Е | Measure of lag phase |
| F | presence of a shape change |
| G | Desaggregation |

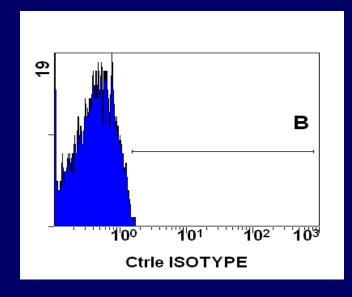


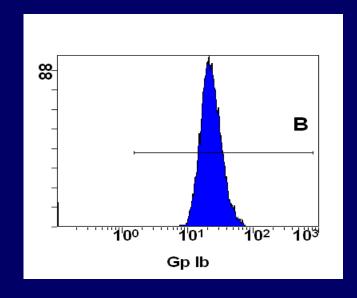
Exploration des GPP en CMF

-Principe : Recherche des GlycoProtéines membranaires des PLT: par cytométrie de flux, à l'aide d'Ac spécifiques marqués par des fluorochromes

-Anticorps utilisés : anti CD42b (GPIbα), CD41 (GPIIb), CD 61(GPIIIa), CD49b (GPIa), PAC-1 (GPIIbIIIa activée), CD62P (P-selectin), CD63 (GP53-LAMP3, granules denses)

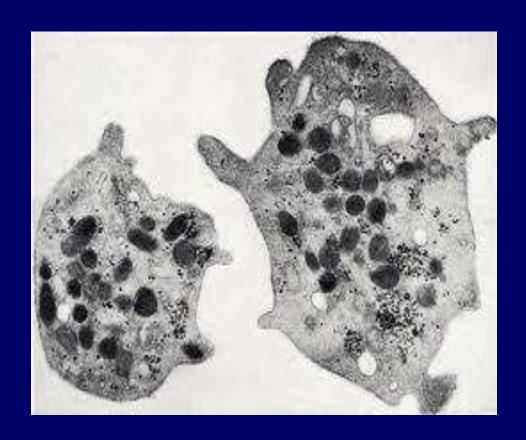


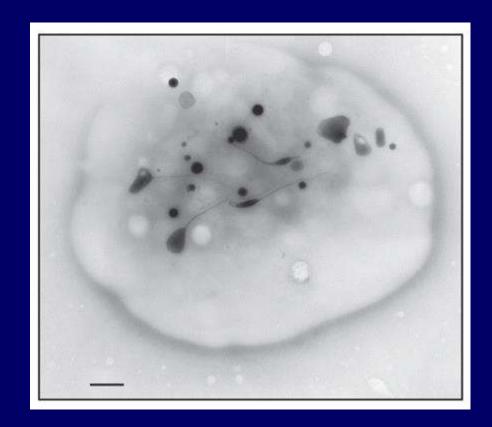






Microscopie Electronique



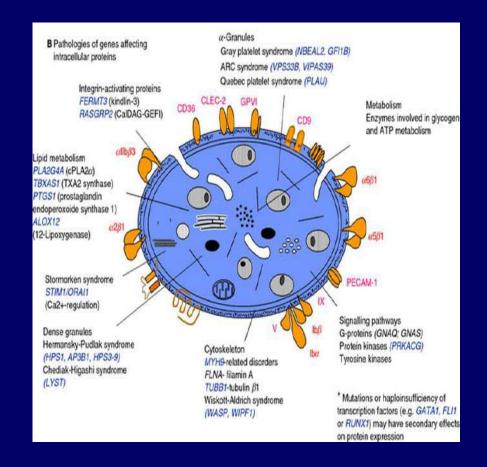




Pathologies of genes affecting surface constituents

A Pathologies of genes affecting surface consistuents Defective response to collagen TMEM16F ITGA2B, ITGB3 Scott syndrome: decreased Glanzmann thrombasthenia: thrombin formation no aggregation with natural agonists ITGA2 SNPs control density and collagen response P2RX1 Altered modulation of aggregation by ATP GPIBA, GPIBB, GP9 Bernard-Soulier P2RY12, TBXA2R, F2RL3 syndrome: Defective response to stimuli: ADP, lack of adhesion to VWF **GPIBA** TXA2, thrombin (PAR-4); may also include and abnormal response to Platelet-type VWD: adrenaline.. thrombin spontaneous binding of VWF to GP Iba

Pathologies of genes affecting Intracellular proteins





Platelet aggregtion First line assessment : ISTH recommendations

| Agonist | Concentration | |
|------------------|---------------|--|
| ADP | 2 μΜ | |
| Collagen (Horm) | 2 μg/ml | |
| Arachidonic acid | 1 mM | |
| Ristocetin | 1.2 mg/ml | |
| Epinephrine | 5 μΜ | |

Second line assessment

Higher concentrations of agonists,
Other agonists (Thrombin Receptor Activating Peptide-TRAP, U46419, ristocetin)

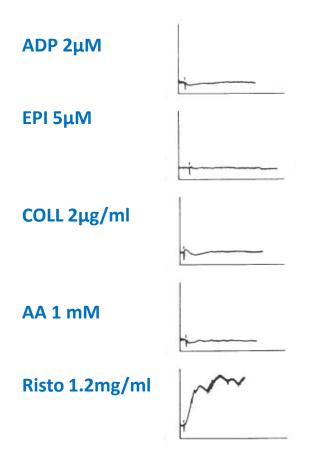


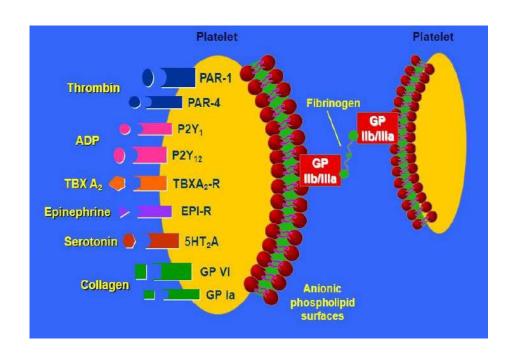
Contribution of the first-line assessment for the diagnosis of platelet dysfunctions

- No response to multiple agonists (except ristocetin)
- Reduced response to multiple agonists
- Reduced response to one agonist



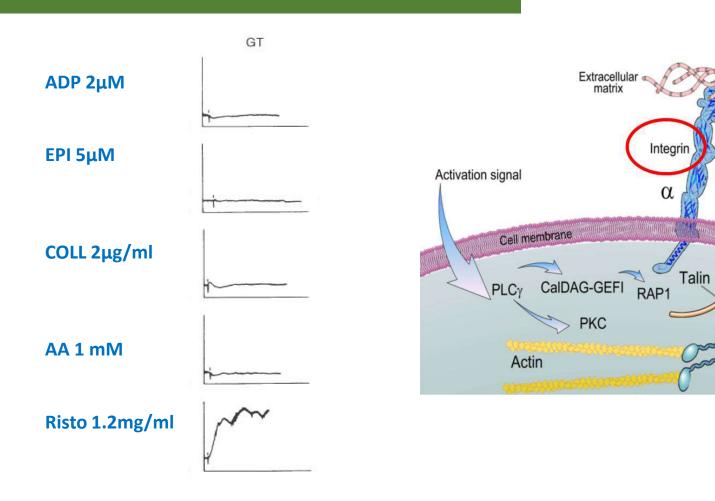
No response to multiple agonists







No response to multiple agonists



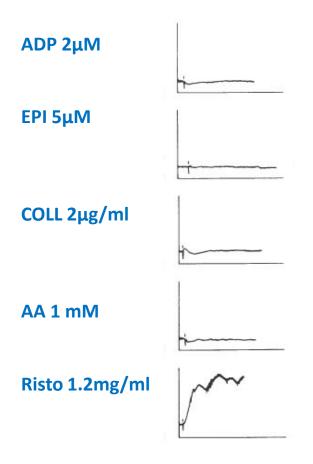


Kindlin 3

Migfilin

Filamin

No response to multiple agonists



| | GPIIbIIIa quantitative | GPIIbIIIa qualitative | Kindlin 3 |
|--------------|-----------------------------|--|-----------------------------|
| Bleeding | ++ | ++ | ++ |
| GPIIbIIIa | absent | normal | normal |
| Transmission | AR | AR | AR |
| Syndromic | No | No | Yes Immune deficiency |
| Disease | Glanzmann thrombasthenia | Glanzmann thrombasthenia variant | LADIII |



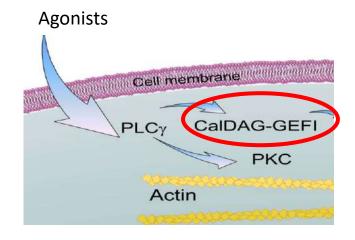
Contribution of the first-line assessment for the diagnosis of platelet dysfunctions

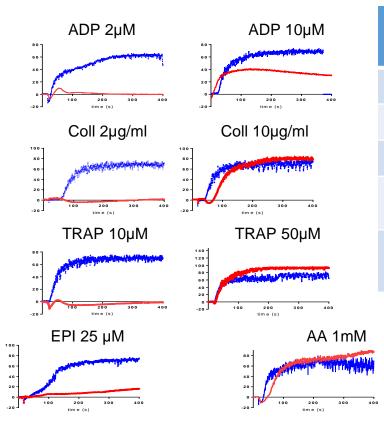
- No response to multiple agonists
- Reduced response to multiple agonists
- Reduced response to one agonist



Reduced response to multiple agonists





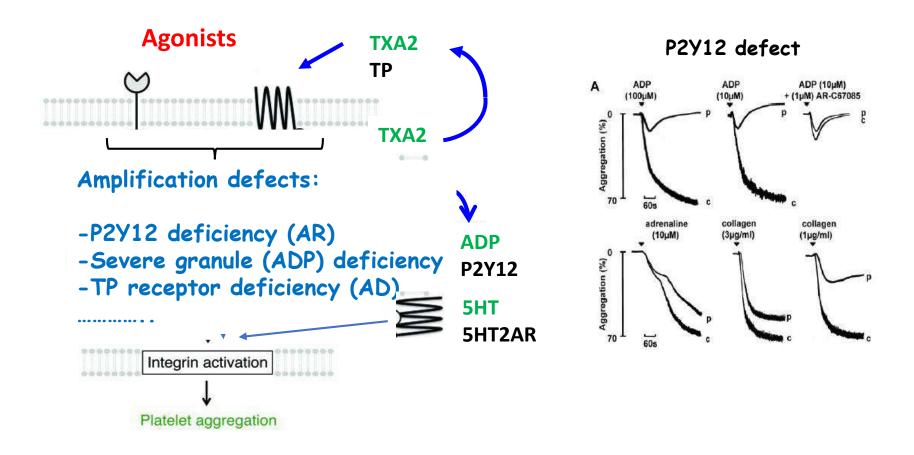


| | CalDAG-GEF1 |
|--------------|-------------|
| Bleeding | ++ |
| GPIIbIIIa | normal |
| Transmission | AR |
| Syndromic | No ? |
| Disease | CalDAG-GEF1 |

Canault M, J Exp Med 2014



Reduced response to multiple agonists



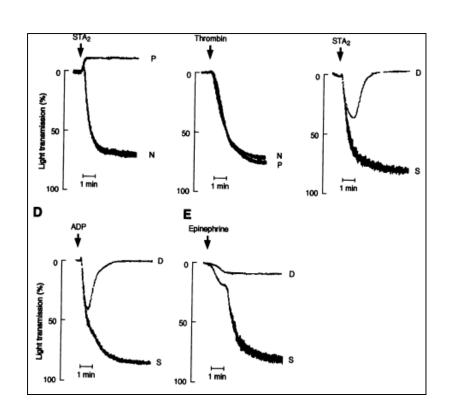


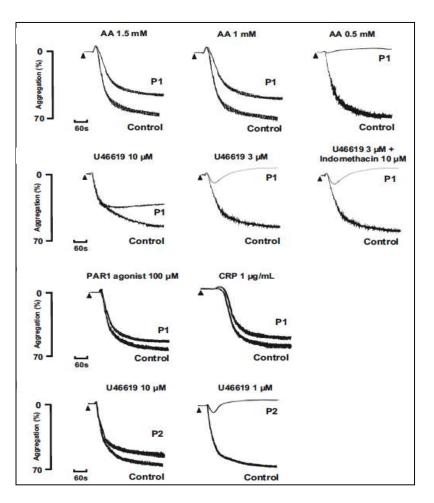
Anomalies des granules denses (dSPD)

- · Clinique : Syndrome hémorragique modéré,
 - · albinisme (Hermansky-Pudlak, Chediak-Higashi),
- Biologie:
- Compte plaquettaire et VMP normal
- Agreg. = réversiblité ADP, absente au collagène et normale à AA
- Cytométrie de flux : test à la mépacrine
- ↓ sérotonine intraplaquettaire ou ATP
- · Microscopie électronique
- Anomalies génétiques
 - HPS (8 gènes) = protéines impliquées dans le 'process' vésiculaire intracellulaire
 - LYST (régule l'organisation des organelles intracellulaires)



Défaut sévère de réponse à l'acide arachidonique : Mutations TP (AR)





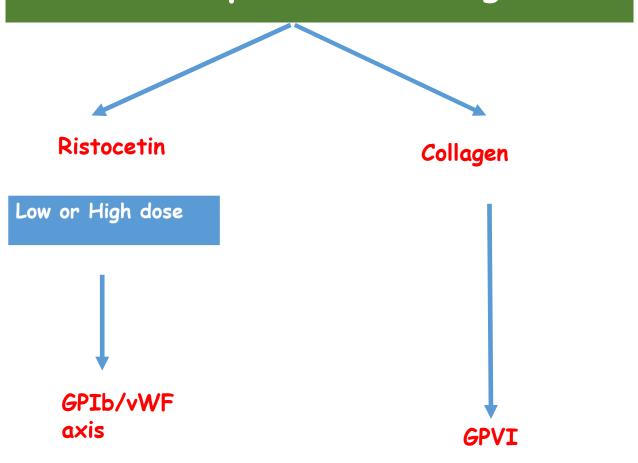


Contribution of the first-line assessment for the diagnosis of platelet dysfunctions

- No response to multiple agonists
- Reduced response to multiple agonists
- Reduced response to one agonist



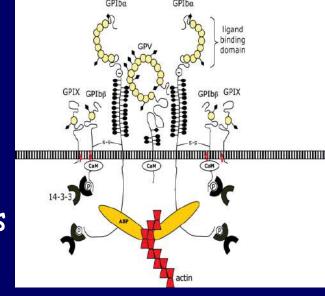
Reduced response to one agonist





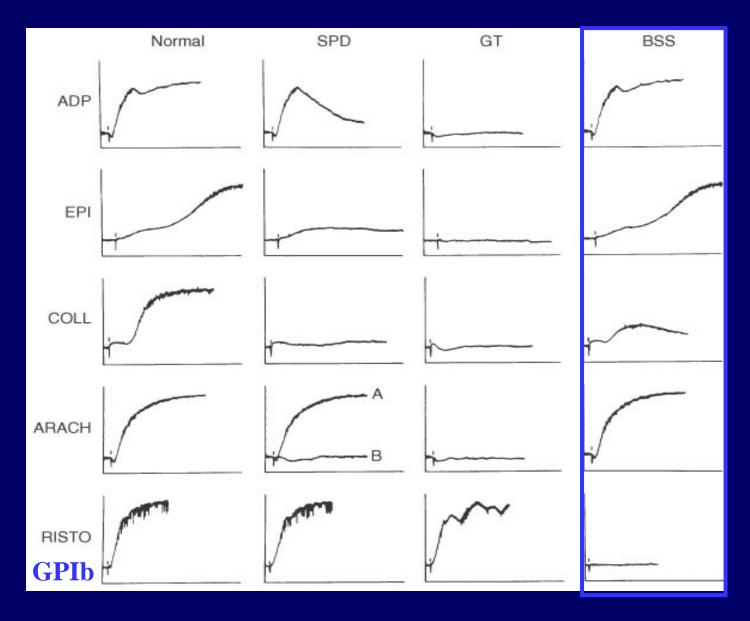
Le Complexe GPIb/IX/V

- Exprimé de façon constitutive
- GpIb α et β , Gp IX, Gp V : famille des protéines riches en Leucine
- Rôles principaux Ib α :
 - · Liaison au vWF (à forces de cisaillement élevées)
 - · Récepteur de la thrombine
- La partie intracellulaire du complexe est liée à de nombreuses protéines du cytosquelette : ABP, filamine, 14-3-3ζ, PI-3-kinase, SHIP-2 impliquées dans l'activation plaquettaire





Défaut d'agrégation à la ristocétine



Défaut d'agrégation Maladie de Jean Bernard Soulier (Autosomique Récessif)

Associé à une MacroThrombopénie à grosses plaquettes (JBS et forme monoallélique)

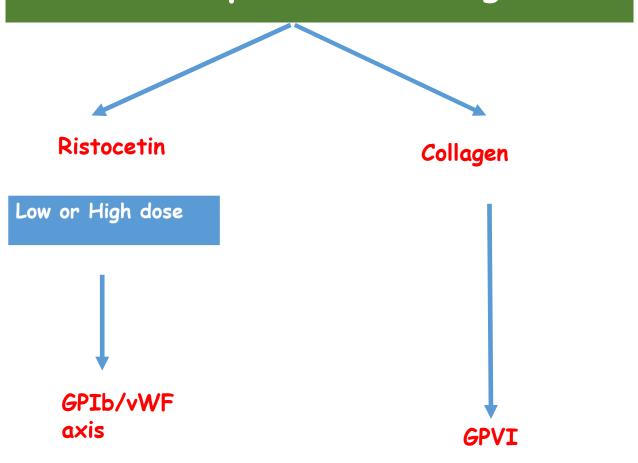


Défaut GPIb : mutation gain de fonction Pseudo-Willebrand

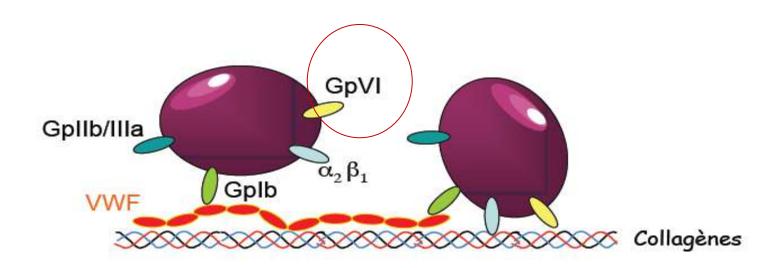
- Autosomal dominant
- 7 liaison vWF plaquettes
- GPIb α Gly233Val et Met239Val
- · Clinique et biologie : mime willebrand type IIb
 - syndrome hémorragique
 - thrombopénie
 - allongement du TS
 - excès d'agrégation aux faibles doses de ristocétine
 - Intérêt des tests d'agrégation croisés (plasma /plaq)



Reduced response to one agonist

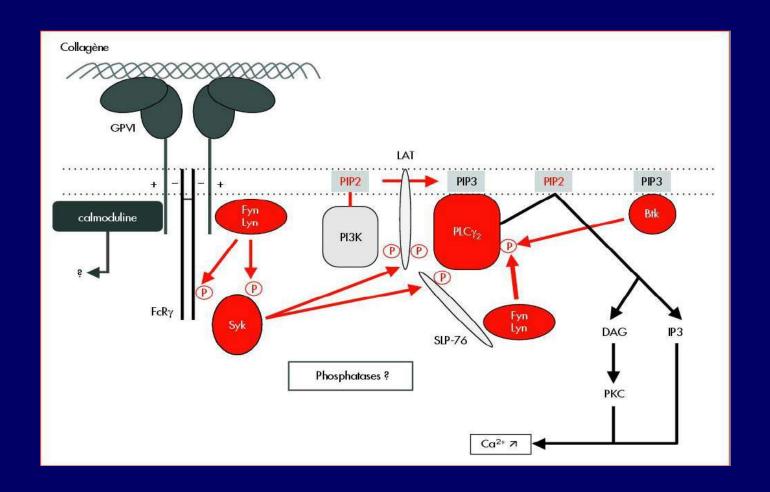






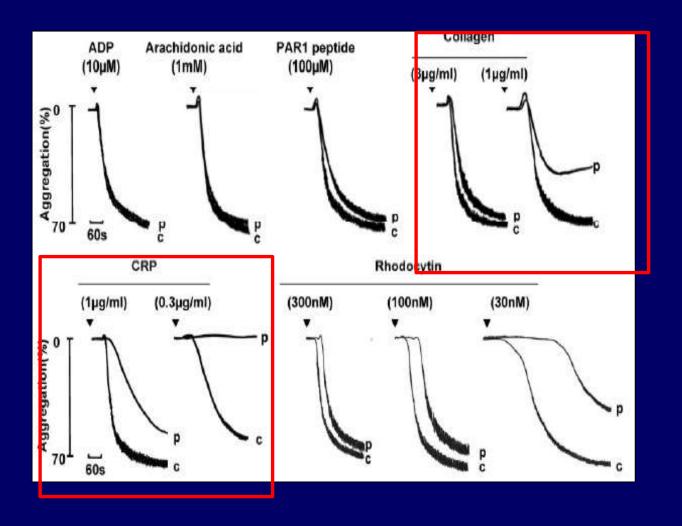


GPVI: réponse au collagène





Défaut de réponse au collagène (GPVI)





Défauts granulaires

Granule alpha

Coagulation proteins

Growth factors,

cytokines and

chemokines (

Grey syndrome

Syndrome Quebec



Chediak – Higashi Herrmansky pudlak Griscelli syndrome Pool vide

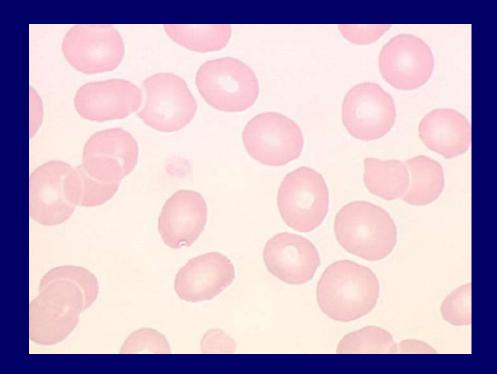


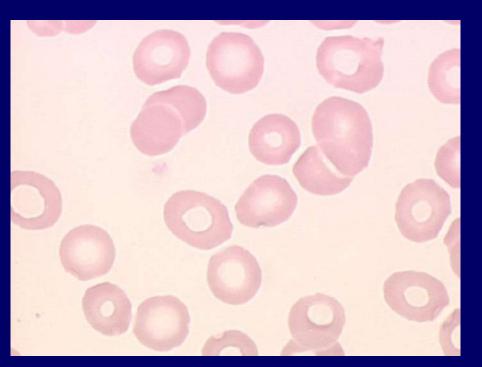
Anomalie des granules alpha

Syndrome des plaquettes grises (AR)

- · Anomalie génétique : NBEAL2
- Clinique:
 - Syndrome hémorragique,
- Biologie:
 - Morphologie plaquettaire
 - Allongement du TS
 - -Thrombopénie qui s'aggrave avec l'âge
 - Agrégation normale (ou anomalies modérées)
 - Dosage (CMF) des composants intraplaquettaires
 - Microscopie électronique

<u>Le syndrome d'arthrogrypose</u> - insuffisance rénale - cholestase (syndrome ARC - mutation gène VPS33bA)







Syndrome Quebec

- Saignement chirurgical ou traumatique nécessitant des transfusions
- Hématurie fréquente (50%)
- Saignement (43%)
- Saignement prolongé après coupure et extraction dentaire
- Saignement retardé (12-24h)

Plaquettes: Exces d'urokinase activation chronique de la fibrinolyse



Les difficultés du diagnostic basé sur le phénotype

Orientation vers un gène potentiellement impliqué possible, mais :

- « overlap » de certains phénotypes
- gène parfois de grande taille
- arbre décisionnel (peu de pathologies concernées)



Un diagnostic plus rapide pour plus de patients



Séquençage Sanger : 1 gène après l'autre

Si non informatif: étude de liaison et

identification

Des mois voire des années de travail

Obstacle méthodologique

Faible taux de diagnostic

Phénotypage du patient

Séquençage ciblé de 70 gènes
Serie de 24 à 48 patients
Série unique pour la détection de différentes
mutations
1 à 2 mois
(bioinformatique)
Cout raisonnable, délai acceptable
Pour de + en + de patients



ILLUSTRATION CAS CLINIQUE INTERET DU SEQUENCAGE DE PANEL DE GENES



1er cas

Fillette de 8 ans

- Plaq: 80 G/I

- # 50% de plaquettes de grande taille

Moelle: méga ++
 Fonctions plaq: N

Famille: contexte auto-immun (PAR)

- Diag : PTI

Ac anti-plaq : négatifs

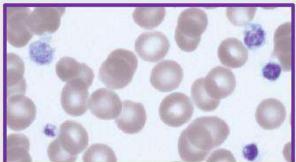
- Ac anti-nucléaires : + 1/320 moucheté

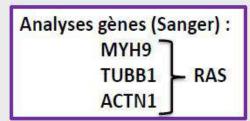
- Pas de contexte familial de thrombopénie

Nombreux épisodes épistaxis, ayant nécessité

TF GR + plaq.







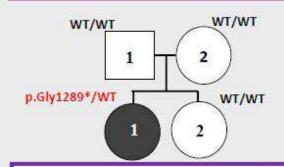


1er cas

Analyse NGS 4 ans après :

FLNA Htz (chX): c.3865G>T, p.Gly1289*

→ Diagnostic de filaminopathie





Filaminopathies: lié à l'X groupe de pathologies rares et hétérogènes: hétérotopie périventriculaire nodulaire, pseudoobstruction intestinale, anomalies valvulaires cardiaques ou malformations osseuses,

+/- macrothrombocytopénie

FLNA: rôle d'ancrage des GP plaquettaires au niveau du cytosquelette:

- → importance pour la production plaquettaire
- → plaquettes également défectueuses en termes d'agrégation et de sécrétion

- Diagnostic confirmé par IRM cérébrale
- ⇒ prise en charge adaptée sur le plan neurologique et cardiovasculaire.



2eme cas

- Fille de 8 ans adressée au CRPP pour exploration thrombopénie constitutionnelle
- Vu par hématopédiatre pour thrombopénie modérée avec notion de thrombopénie chez la mère

| | Fille | Mère |
|----------------------|--|--|
| Compte plaquettaires | 110 G/I | 124 G/I |
| VPM (Advia) | 10,4 fl | 10,8 fl |
| ATCD hémorragiques | Saignement prolongé aux coupures | Ménorragies |
| ATCD chirurgicaux | Adenoidectomie Extraction dentaire sous exacyl Strabisme congénital Greffe tympans : hémorragique (Aspirine) | appendicectomie ablation des dents de sagesse Cœlioscopie Greffe tympanique |
| ATCD médicaux | RGO sévère Troubles envahissants du comportement | FC tardive Corticoide + Tégélines |

Résultats NGS :

Un variant de séquence de signification non ambigüe sur le **gène de la Filamine A** et potentiellement impliqué dans la pathologie que présente la patiente a été mis en évidence.



Exploration maternelle

- Neurologique :
 - ✓IRM cérébrale : hétérotopie en bande péri-ventriculaire.
 - ✓ Crises partielles simples nécessitant un traitement
 - ✓ évaluation neuro-psychologique, qui confirme l'existence de troubles de la mémoire auto-biographique
- Pathologie vasculaire:
 - ✓ Insuffisance Aortique : surveillance simple
 - ✓ Insuffisance veineuse
 - ✓ Syndrome de Raynaud
- Hyperlaxité ligamentaire :prise en charge orthopédique
- Obstetricale : FC Tardive des fœtus males



Exploration de la petite fille

- Neurologique :
 - ✓ Trouble des apprentissages de type coordination
 - ✓ IRM : hétérotopie periventriculaire
 - ✓ EEG : pas de tracé pathologique
- Insuffisance Aortique : surveillance simple
- Hyperlaxité : subluxation épaule récidivante, suivi orthopédique, surveillance croissance
- Consultation génétique à prévoir lors d'un projet de grossesse.



4ème cas

Théo né le 25/05/1999

A 10 ans : hématome céphalique géant sur trauma cérébral

Thrombopénie très modérée : 120-150 G/L, N en situation inflammatoire

TS> 30 minutes, Minirin inefficace

Pas de trouble de la coagulation ni de la fibrinolyse

Déficit granulaire dense sévère (5HT effondrée, mépacrine, CD63 bas)

Myélogramme: moelle riche, mégacaryocytes nombreux très plaquettogènes

NGS

Variation HMZ HPS5: NM 0007216: exon 14: c1520+1G>A, p.?

Destruction d'un site d'épissage → probable saut d'exon

Actuellement: 10 sous-types de HPS (10 gènes impliqués)

gènes → protéines qui s'associent entre elles pour former des complexes protéiques (BLOCs) impliqués dans la biogénèse, maturation et traffic des lysosomes et

des organites associés lysosomes (mélanosomes, corps denses, granules lytiques, ...)

certains sous-types de HPS (HPS3, HPS5, HPS6 : BLOC2 déficient) :

phénotype clinique très modéré → sous diagnostiqué

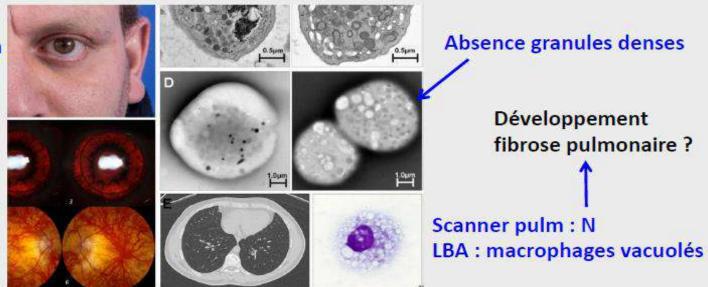


Hermansky-Pudlak syndrome subtype 5 (HPS-5) novel mutation in a 65 year-old with oculocutaneous hypopigmentation and mild bleeding diathesis: The importance of recognizing a subtle phenotype. J. Perez Botero et al. Platelets. 2017 Nov 1:1-4.

Cellular and molecular defects in a patient with Hermansky-Pudlak syndrome type 5. Stephen J et al. PLoS One. 2017 Mar 15;12(3):e0173682.

3 27 ans, nystagmus, réduction de l'acuité visuelle, épistaxis récurrents pas d'infection, pas de douleurs abdominales

hypopigmentation modérée



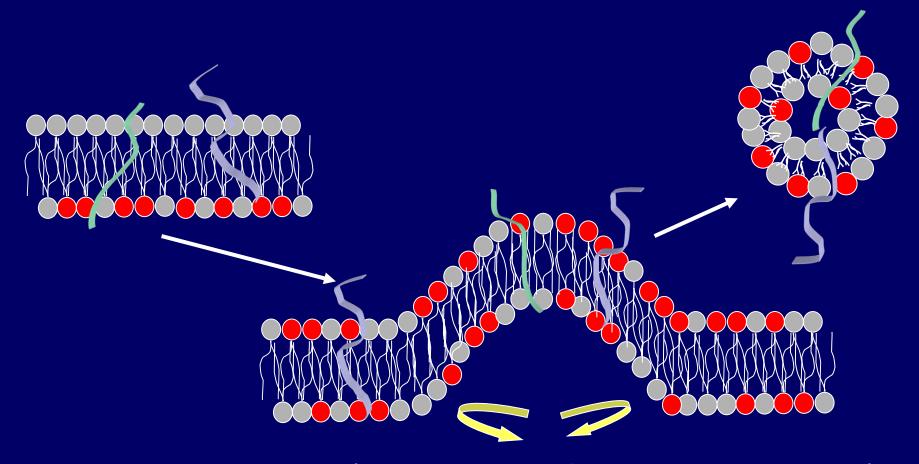
HPS5: NM_181507.1; c.285-10A>G, p.Ser95_Gln96insSerCysSer HMZ



PLAQUETTE ET COAGULATION

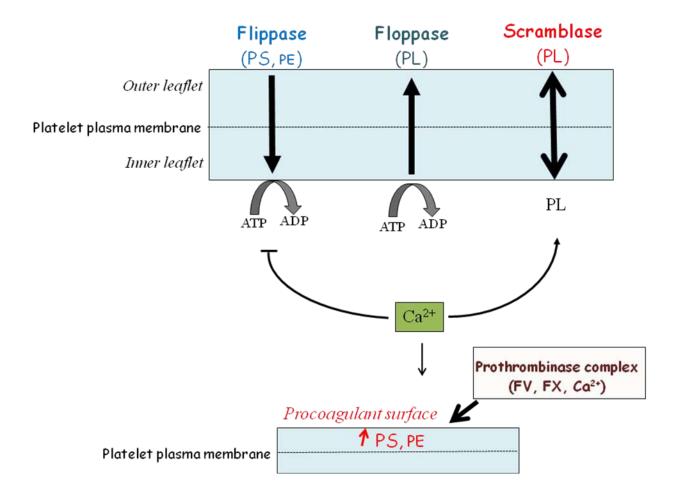


Activation plaquettaire : La composition et l'architecture lipidique de la membrane changent.



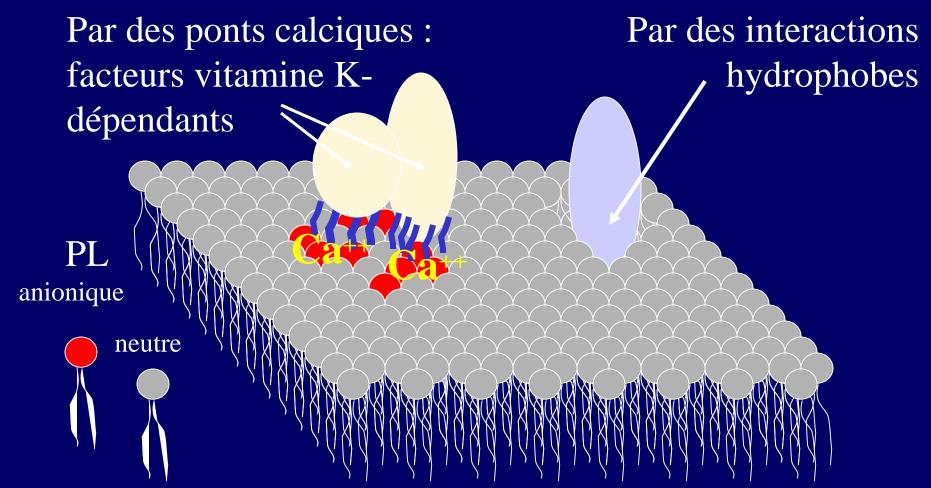
La membrane plaquettaire devient pro-coagulante et émet des microvésicules.







Comment les facteurs de coagulation se fixent sur les surfaces phospholipidiques





Syndrome de Scott

- · Transmission autosomale récessive
- Clinique : Syndrome hémorragique (post partum)
- Biologie:
 - Taux de plaquettes et morphologie normale
 - TS normal
 - Agrégation plaquettaire normale
 - 4 de la consommation de Prothrombine
 - Cytométrie de flux : évaluation de l'expression d'une surface procoagulante (annexine V)
 - Mutation gène TMEM16F (ANO6)



Prise en charge thérapeutique

Apprécier la gravité de l'hémorragie

En cas d'épistaxis

- · Position assise, tête légèrement en avant.
- · Mouchage et une compression bidigitale
- Méchage nasal (matériel résorbable de type Surgicel® ou Nasopore®, les mèches d'alginate de calcium (Algosteril®, Urgo-sorb®) et les mèches grasses (Jelonet®) Des colles résorbables à base de gélatine (Surgiflo®, Flo-seal®)
- application de froid (glaçon)
- Exacyl®
- Surveillance
- Persistance du saignement, récidive après déméchage, le saignement d'emblée important, la présence de comorbidités urgence

