

THROMBOPENIES CONSTITUTIONNELLES

ACTUALITES DIAGNOSTIQUES

Rémi FAVIER ^{1,2}

1 Hôpital d'Enfants Armand Trousseau, CRPP, PARIS

2 Inserm U1009, VILLEJUIF



Les thrombopénies constitutionnelles sont des pathologies rares plaquettaires souvent confondues avec des thrombopénies immunologiques

Cette confusion a pu entraîner des traitements non seulement inefficaces mais aussi inappropriés

Depuis 1975 (BSS), les anomalies moléculaires d'un nombre croissant de thrombopénies constitutionnelles ont été identifiées

Du fait des coûts des techniques d'évaluation et d'identification moléculaire, le défi reste bien la détection de patients devant bénéficier de ces explorations

QUAND PENSER A UNE THROMBOPENIE CONSTITUTIONNELLE (TC)

- 1 Notion de thrombopénie familiale ou d'autres pathologies hématologiques
 - Atteinte de membres de la famille surtout si premier degré : parents-enfants, oncles-neveux (notion de consanguinité)
 - Si elle est présente, le type de transmission : autosomal dominant, lié à l'**X**, récessif
 - Attention : cas sporadiques dû à des mutations de novo
double transmission dans certaines entités : dominant, récessif

QUAND PENSER A UNE THROMBOPENIE CONSTITUTIONNELLE (TC)

2 Ancienneté de la thrombopénie

- Dater la survenue de la thrombopénie est une démarche importante (et fastidieuse) : taux des plaquettes lors d'une intervention chirurgicale? lors d'une grossesse? Depuis la naissance?
- Dans le cadre des thrombopénies constitutionnelles, la thrombopénie est constante (parfois discrète puis s'aggravant)
- Attention : un taux normal de plaquettes n'élimine pas l'hypothèse diagnostique
le caractère oscillant spontanément serait discriminatif?

QUAND PENSER A UNE THROMBOPENIE CONSTITUTIONNELLE (TC)

3 Présence d'anomalies morphologiques ou cliniques

- Anomalies cardiaques, insuffisance parathyroïdienne avec hypocalcémie
- Dysmorphie (fente palatine), anomalies osseuses
- Troubles cognitifs et/ou psychiatriques : épilepsie, heterotopie
- hétéro nodulaire peri ventriculaire
- Infections à répétition à germes encapsulés et eczéma
- Troubles de l'audition, cataracte, glomérulonéphrite

4 Syndrome hémorragique associé

- Son absence n'est pas un argument d'élimination
- Saignements dans l'enfance plus évocatrice
- Utilite d'un score hémorragique (JTH)
- Si présent : plus important que le degré de la thrombopénie?

QUAND PENSER A UNE THROMBOPENIE CONSTITUTIONNELLE (TC)

5 Mauvaise réponse plaquettaire après traitement pour PTI

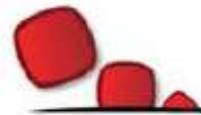
L'absence de réponse à au moins 2 traitements (corticoïdes, Immunoglobulines intraveineuses, splénectomie) chez un patient thrombopénique sans hémogramme doit conduire à évoquer une TC

Attention : augmentation significative après traitement soit parce qu'il y a une composante auto immune associée ou une clearance des plaquettes aberrantes.

EN CONCLUSION

Devant tout PTI chronique , il est nécessaire d'éliminer une TC

- si le début est précoce (avant 18 mois)
- si la thrombopénie est modérée ou de découverte fortuite
- s'il existe un contexte syndromique ou des antécédents familiaux
- si la thrombopénie ne se corrige pas ou insuffisamment avec les traitements de première ligne



Hiérarchie de l'exploration

L'exploration est hiérarchisée en niveaux selon les visites successives :

- ***Niveau 1 (1^{ère} visite)*** : exclure ou orienter vers une pathologie plaquettaire constitutionnelle ou acquise
- ***Niveau 2 (2^{ème} visite)*** : confirmer l'orientation diagnostic des résultats de la 1^{ère} visite
- ***Niveau 3 (visites ultérieures)*** : explorations très spécialisées

QUELS EXAMENS DEMANDER DANS UN PREMIER TEMPS

1- Analyse de l'hémogramme : le volume moyen plaquettaire

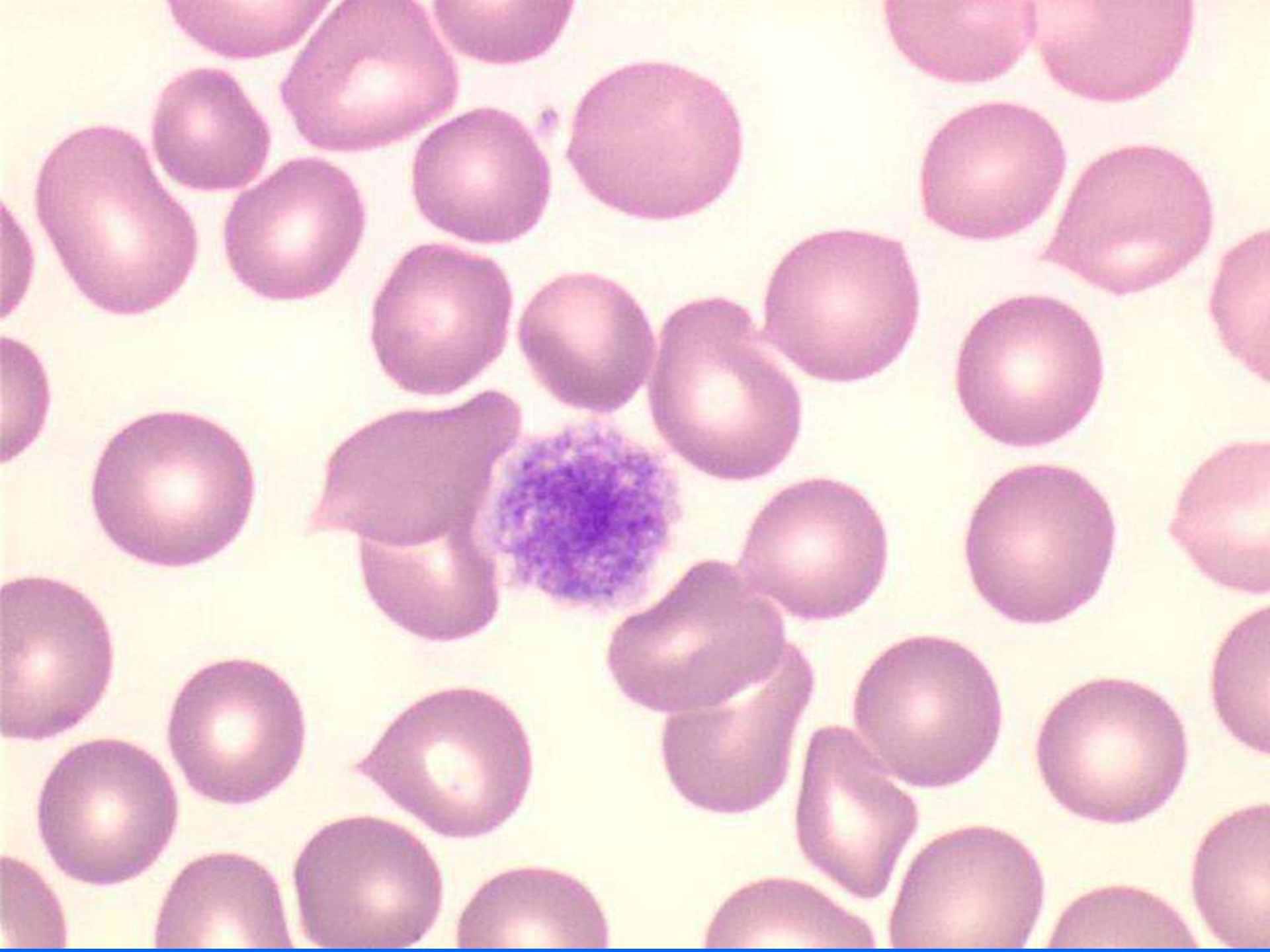
- Valeur
- Courbe de distribution

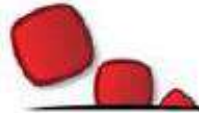
Les autres paramètres : anémie

2- Analyse du frottis sanguin :

- Taille des plaquettes : Géantes? Grandes? Petites? Normales?
- Anomalies morphologiques extra plaquettaires

3- Plaquettes réticulées (expérience personnelle)





Niveau 1 (1^{ère} visite) :

- **Bilan de coagulation standard (TP, TCA, Fg, TT) :**
Diagnostic différentiel d'une anomalie modérée ou mineure de la coagulation
- **Temps de saignement :** à éviter
 - Invasif
 - Peu sensible
 - Peu reproductible



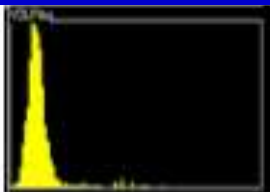
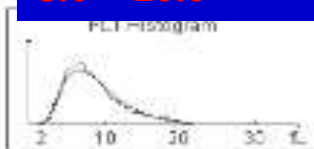
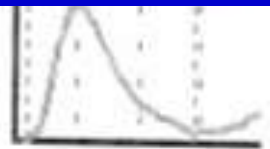
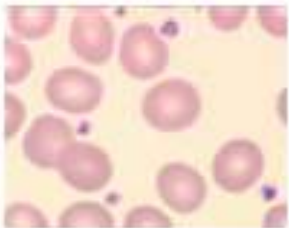
VOLUME PLAQUETTAIRE : AIDE A LA CLASSIFICATION

V. Latger – Cannard Int J Lab Hem 2012

- VPM
 - . Mesure idéalement 3h après prélèvement Nature de l'automate, du mode de lecture
 - . Mis en échec en cas de thrombopénie sévère $< 20\text{G/L}$ ou de plaquettes géantes
- Mesure du diamètre plaquettaire (micromètre) : précis, mais non adapté à la biologie usuelle
- Frottis :
 - . Plaquettes géantes : taille $\geq \text{GR}$
 - . Plaquettes de grande taille (macro-plaquettes) : taille $< \text{GR}$

Tableau I



	normo
Advia 2120	7.1 – 9.1 
LH750	8.0 – 10.0* 
XE-2100D	9.1 – 11.1 
Aspect cytologique Frottis coloré au MGG	

VPM (fL)

* intervalle de
référence

VPM (fL)
 * intervalle de
 référence

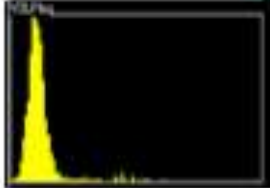
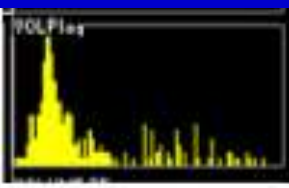
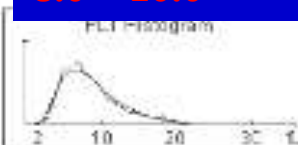
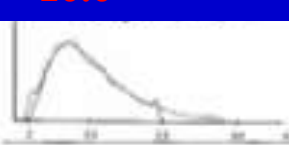
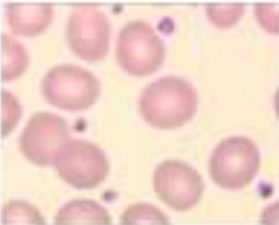
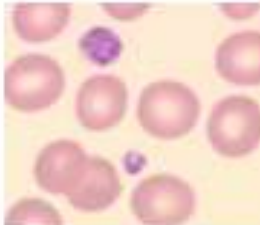
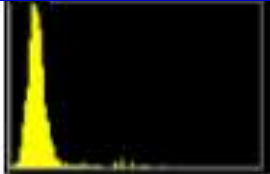
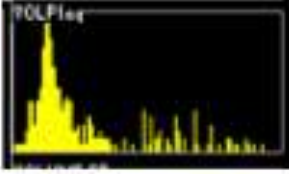
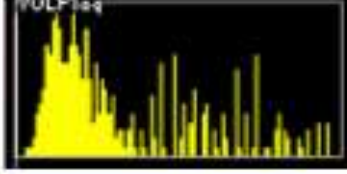
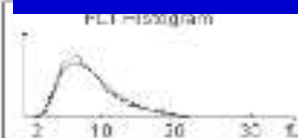
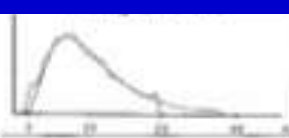
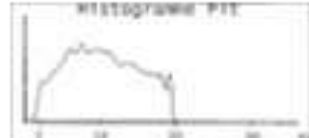
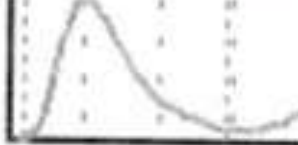
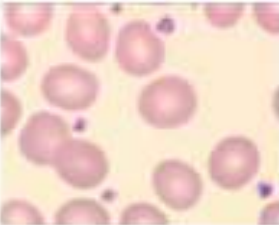
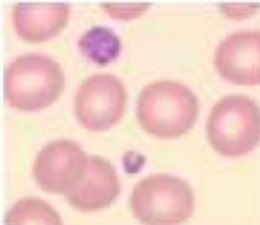
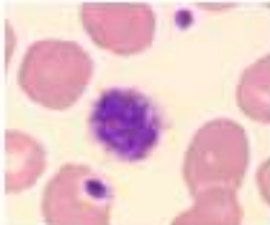
	normo	macro
Advia 2120	7.1 – 9.1 	>9.1 
LH750	8.0 – 10.0* 	>10.0 
XE-2100D	9.1 – 11.1 	>11.1 
Aspect cytologique Frottis coloré au MGG		

Tableau I



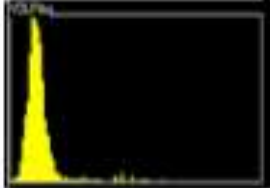
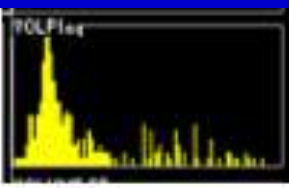
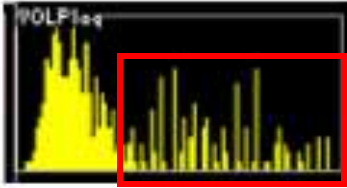
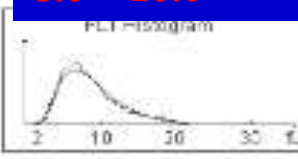
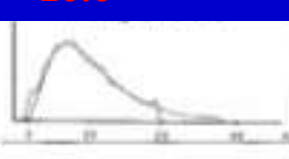
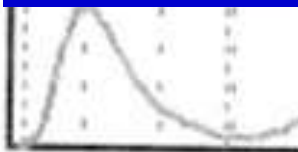
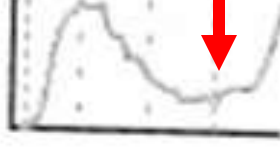
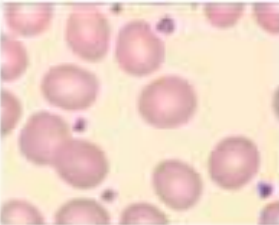
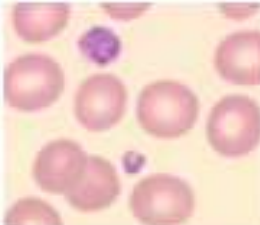
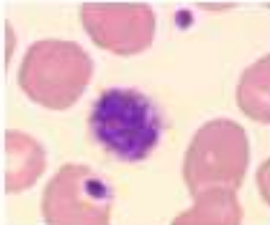
	normo	macro	géant
Advia 2120			
LH750	8.0 – 10.0* 	>10.0 	
XE-2100D			
Aspect cytologique Frottis coloré au MGG			



VPM (fL)
* intervalle
de
référence

Tableau I



	normo	macro	giant
Advia 2120	7.1 – 9.1 	>9.1 	
LH750	8.0 – 10.0* 	>10.0 	
XE-2100D	9.1 – 11.1 	>11.1 	
Aspect cytologique Frottis coloré au MGG			



VPM (fL)

* intervalle de
référence

Tableau I



	normo	macro	géant
Advia 2120			
LH750	8.0 – 10.0*	>10.0	
XE-2100D			
Aspect cytologique Frottis coloré au MGG			

VPM (fL)
* intervalle
de
référence

THROMBOPENIES CONSTITUTIONNELLES

TAILLE PLAQUETTES EXAMENS FROTTIS

Diagnostic	n	% plaquettes avec Ø		
		< 4µm	4 < 8µm	> 8µm
BSS hétéroZ	9	77,0 ± 11,0	20,1 ± 10,4	2,7 ± 1,5
BSS homoZ	4	64,3 ± 19,0	29,7 ± 13,8	6,0 ± 5,4
MYH9-associé	34	52,0 ± 19,8	31,2 ± 9,5	16,8 ± 12,8
Témoins	44	96,7 ± 4,3	3,1 ± 3,2	0,2 ± 0,3

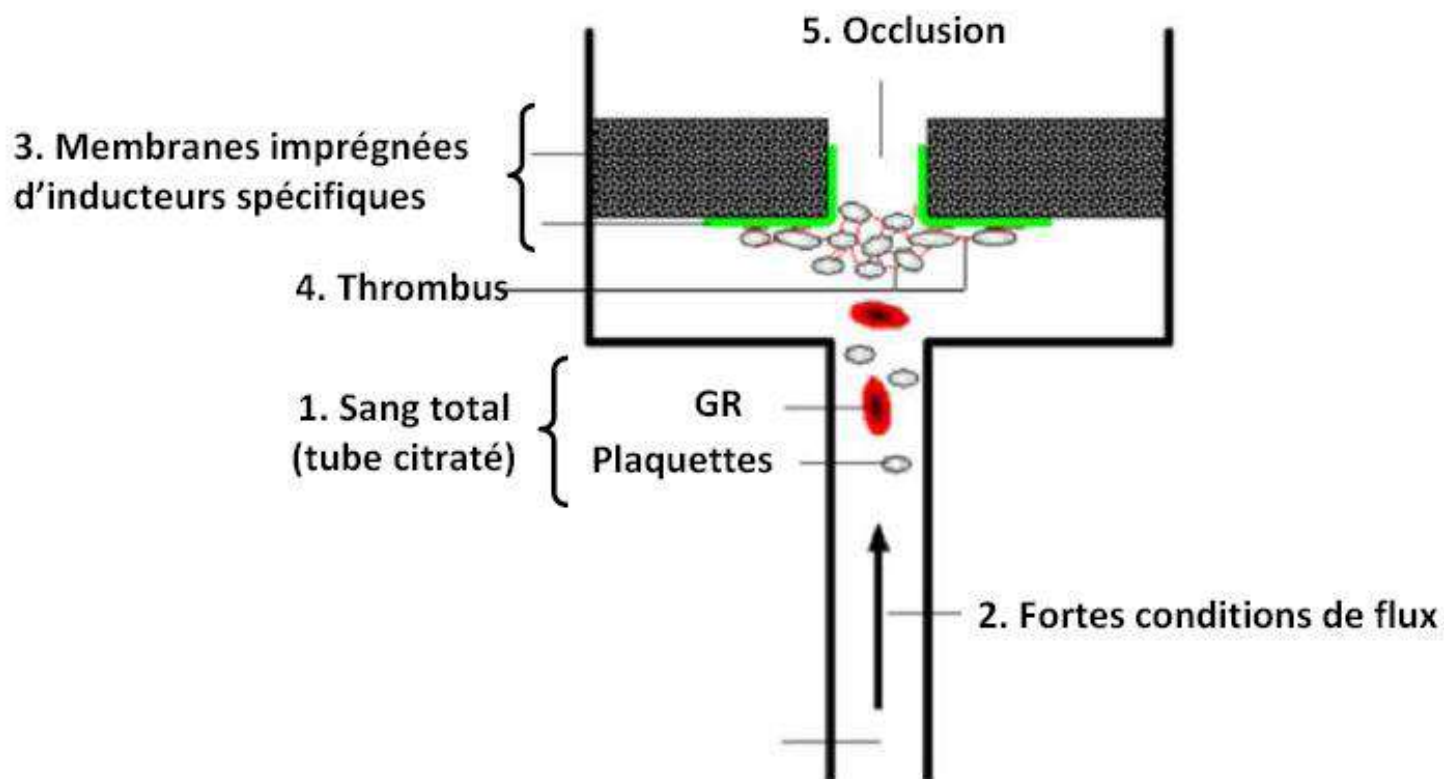
300 plaquettes examinées / frottis

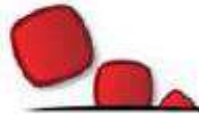
d'après Balduini et al Haematologica 2003 ; 88 : 582-592



Niveau 1 (1^{ère} visite)

PFA-100 : hémostase primaire en condition de flux





Platelet Function Analyser (PFA-100)

Processus d'occlusion



T-15 SEC.



T-45 SEC.



T-80 SEC.



T-110 SEC.

*Siemens Healthcare
Diagnostics,
Inc., Deerfield IL*



- **Avantages** : simple; rapide; faible quantité de sang total
- **Limites** : dépend du taux de plt et Ht; aspirine

Un résultat normal n'a pas valeur d'exclusion d'une anomalie modérée des plaquettes



Niveau 1 (1^{ère} visite)

Examen de référence : agrégation plaquettaire

« Standardisation de l'agrégation plaquettaire »

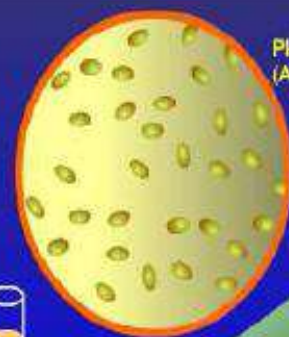
Turbidimétrie = mesure de la variation de l'intensité d'un rayon lumineux à travers une suspension

Centrifugation = Plasma Riche en Plaquettes



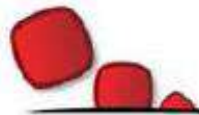
Whole blood

Tubes citratés



Platelets in suspension
(Aggregation: 0%)

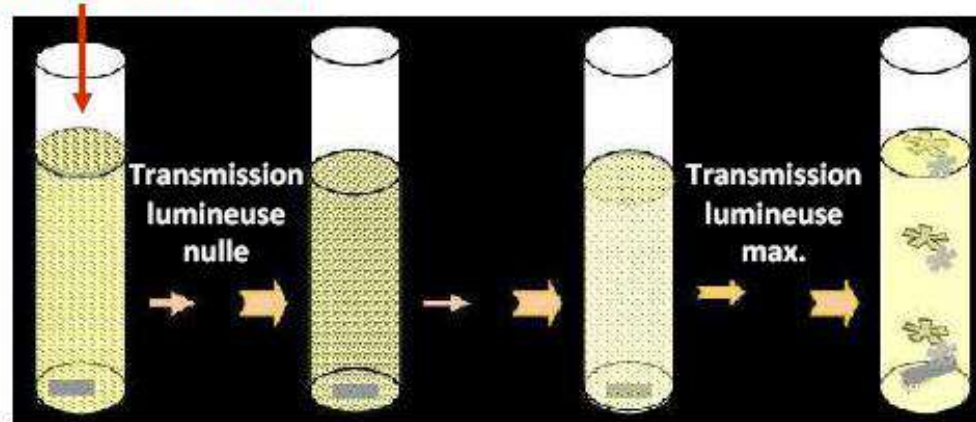




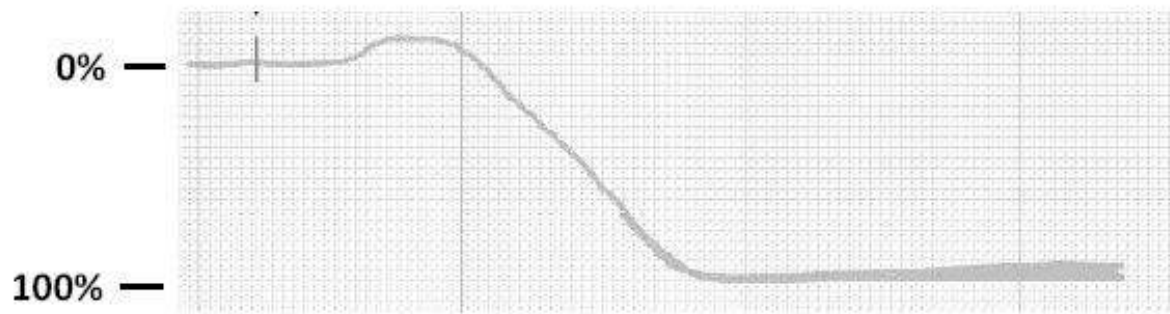
Agrégation plaquettaire

Agoniste (ou inducteur)

Plaquettes non
agrégées



Plaquettes
agrégées



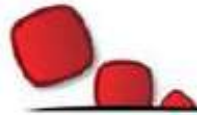
Principaux agonistes : ADP, collagène, acide arachidonique, ristocétine

Niveau 2 (2^{ème} visite)
***Confirmer l'orientation diagnostic
des résultats de la 1^{ère} visite***

Thrombopénie confirmée et sans élément d'orientation décisif

- axe vWF – GPIb (avec RIPA test)
- α IIb β 3
- étude fonctionnelle plaquettaire avec sécrétion

apport de la CMF



Niveau 2 (2^{ème} visite)

- Étude des protéines plaquettaires par cytométrie en flux :

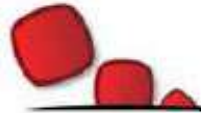
PRP sur tubes citratés (faibles volumes)

- Principales glycoprotéines : GPIIb-IIIa (Glanzmann), GPIb-IX-V (Bernard-Soulier)
- Étude de la sécrétion plaquettaire après activation des plaquettes (P-selectine,...)
- Marquage des granules denses (mépacrine)
- Étude de récepteurs spécifiques : GPVI (collagène)



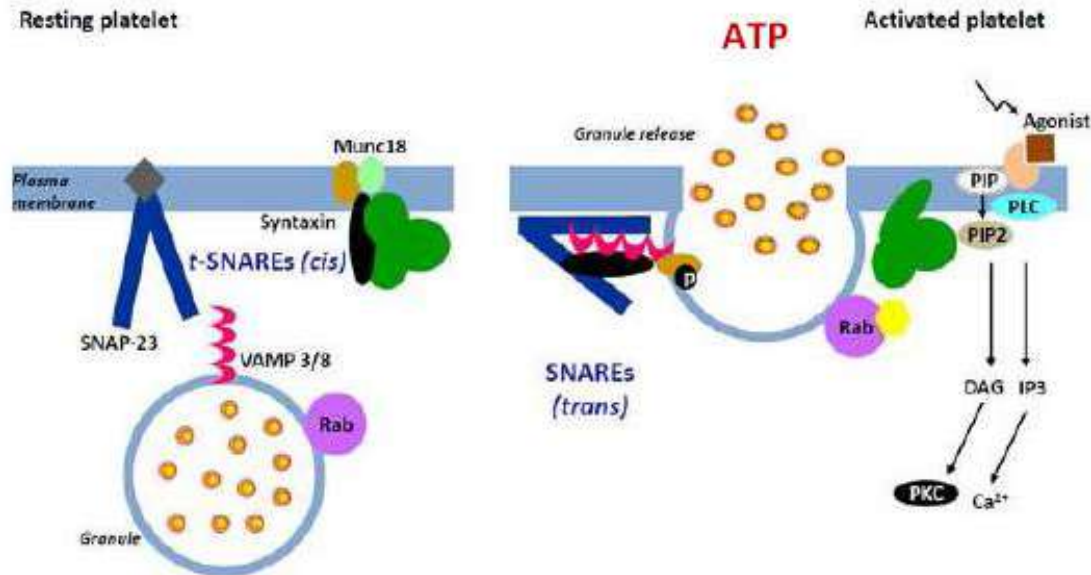
Niveau 2 (2^{ème} visite)

- Contrôle des résultats d'agrégation plaquettaire
+/- autres agonistes
 - **U46619** (agoniste du récepteur au TxA2) si réponse anormale à l'AA
 - **Convulxine** (agoniste du récepteur GPVI au collagène), si réponse anormale aux fortes doses de collagène
 - **TRAP** (peptide agoniste du récepteur de la thrombine), si hypo-agrégation à l'ADP forte dose



Niveau 2 (2^{ème} visite)

Étude de la sécrétion plaquettaire



Granules denses

Réaction de bioluminescence :
complexe luciférine-luciférase (luciole)

(Luciférine + ATP) + (Luciférase + O₂) -> Oxyluciférine + Photons



Niveau 3 (visites ultérieures)

Examens plus spécialisés

AUTRES OUTILS DIAGNOSTIQUES

- Dosage du facteur willebrand
- Cytometrie de flux plaquettaire
- I. Fluorescence : MYH9, filaminopathies
- ME : GPS
- Myélogramme : en cas d'anomalie cytologique associée : CAMT, thrombopénie et dysérythropoïèse congénitale, AML1
- Biologie moléculaire
- Culture progéniteurs mégacaryocytaires?

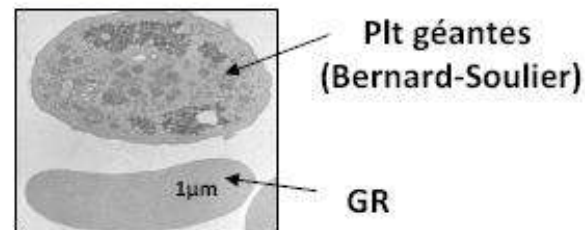


Niveau 3

Selon le diagnostic évoqué, d'autres examens spécialisés pourront être réalisés par les laboratoires du CRPP ayant l'expertise de ces techniques

1) Microscopie électronique

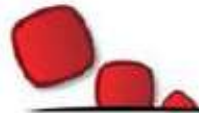
- Morphologie : taille, hétérogénéité
- Étude des granules (denses et alpha)



2) Études de la signalisation plaquettaire

- En cas de profil d'agrégation plaquettaire atypique
- Permet de définir la voie de signalisation anormale

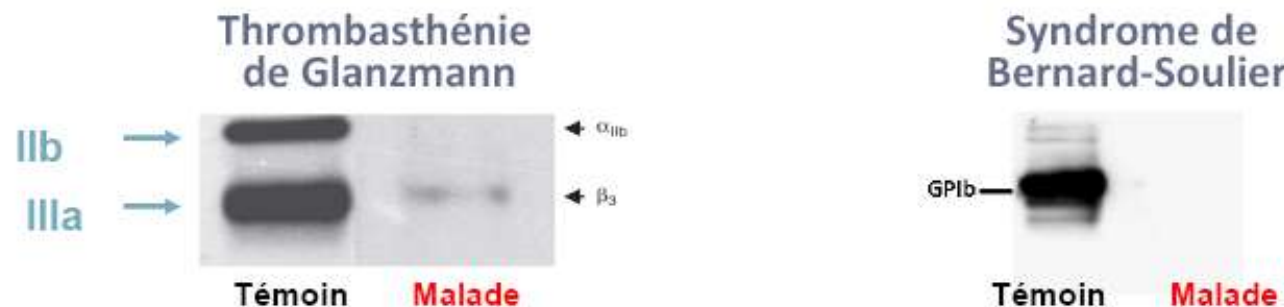




Niveau 3

3) Étude des protéines plaquettaires par Western-blot

Étude de récepteurs ou de constituants intra-plaquettaires



4) Dosage de la thrombopoïétine (TPO) :

Un taux élevé de TPO orientera vers une diminution du nombre de mégacaryocytes ou vers une anomalie du récepteur cMPL à la TPO

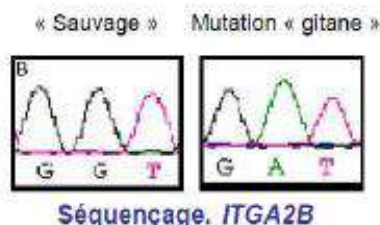


Niveau 3

- **Mesure des contenus granulaires (nucléotides, sérotonine, fibrinogène, Willebrand...) :**
Anomalie de stockage des granules (storage pool disease)

- **Études génétiques :**
 - Liste des laboratoires pratiquant ces analyses
 - Consentement du patient

→ www.maladies-plaquettes.org



platelets' size	disease (abbreviation, MIM #)	reference	inheritance	gene (localization)	other features
large	biallelic (BSS, 231200) and monoallelic Bernard-Soulier syndrome (nd, nd)	(10) (11)	AR-AD	<i>GP1BA</i> (17p13), <i>GPIBB</i> (22q11), <i>GP9</i> (3q21)	none
	<i>MYH9</i> -related disease (<i>MYH9</i> -RD, nd)	(1)	AD	<i>MYH9</i> (22q12–13)	● leukocyte inclusions ● cataracts ● nephropathy and/or deafness
	dyserythropoietic anaemia with thrombocytopenia (nd, 300367)	(13)	X-L	<i>GATA1</i> (Xp11)	haemolytic anaemia
	X-linked thrombocytopenia with thalassemia (XLTT, 314050)	(14)			● haemolytic anaemia ● unbalanced globin chain synthesis
	Paris-Trousseau thrombocytopenia (TCPT, 188025/600588), Jacobsen syndrome (JBS, 147791)	(64)	AD	large deletion (11q23)	● cardiac and facial defects ● developmental delay ± other defects
	gray platelet syndrome (GPS, 139090)	(65-68)	AR	<i>NBEAL2</i> (3p21.1)	● “pale” platelets ● myelofibrosis ● splenomegaly ● high serum vitamin B12
	sitosterolaemia (STSL, 21025)	(6)	AR	<i>ABCG5</i> , <i>ABCG8</i> (2p21)	● stomatocytosis ● possible anaemia, ● tendon xanthomas, ● atherosclerosis
	platelet-type von Willebrand disease (PT-VWD, 177820)	(69)	AD	<i>GPIBA</i> (17pter-p12)	The platelet count goes down under stress.
	<i>ITGA2/ITGB3</i> -related thrombocytopenia (nd, nd)	(70)	AD	<i>ITGB3</i> (17q21.32)	none
	<i>TUBB1</i> -related macrothrombocytopenia (nd, nd)	(71)	AD	<i>TUBB1</i> (6p21.3)	none
	<i>FLNA</i> -related macrothrombocytopenia (nd,nd)	(72)	X-L	<i>FLNA</i> (Xq28)	● possible periventricular nodular heterotopia ● bone dysplasia ● mental retardation, and ● other malformations

platelets' size	disease (abbreviation, MIM #)	reference	inheritance	gene (localization)	other features
normal	<i>ANKRD26</i> -related thrombocytopenia (THC2, 313900)	(2, 3)	AD	<i>ANKRD26</i> (10p2)	risk of leukaemia?
	congenital amegakaryocytic thrombocytopenia (CAMT, 604498)	(18)	AR	<i>c-MPL</i> (1p34)	● reduced megakaryocytes ● evolution into bone marrow aplasia
	congenital amegakaryocytic thrombocytopenia with radio-ulnar synostosis (CTRUS, 605432)	(19)	AD	<i>HOXA11</i> (7p15–14)	● reduced megakaryocytes ● possible evolution into aplastic anaemia ● radio-ulnar synostosis ± other defects
	familial platelet disorder and predisposition to acute myelogenous leukaemia (FPD/AML, 601399)	(20)	AD	<i>CBFA2</i> (21q22)	development of leukaemia or MDS in 40% of patients
	thrombocytopenia with absent radii (TAR, 274000)	(73)	AR	<i>RBM8A</i> (1q21.1)	● Platelet count tends to rise and often normalizes in adult life. ● reduced megakaryocytes ● bilateral radial aplasia ± other malformations
	CYCS-related thrombocytopenia (THC4, 612004)	(74)	AD	<i>CYCS</i> (7p15.3)	none
small	Wiskott-Aldrich syndrome (WAS, 301000)	(75)	X-L	<i>WAS</i> (Xp11)	severe immunodeficiency
	X-linked thrombocytopenia (XLT, 313900)				no or mild immunodeficiency

PATHOLOGIES DES RECEPTEURS GLYCOPROTEIQUES DES PROTEINES ADHESIVES

BIOLOGIE

SYNDROME DE BERNARD SOULIER

(Dystrophie thrombocytaire hémorragiparre de Bernard Soulier)

- **Thrombopénie variable, s'aggrave avec l'évolution**
- **Dystrophie plaquettaire**
- **Plaquettes de grande taille (12 à 15fl), parfois géantes**
- **Défaut d'agglutination en présence de ristocétine**
- **Défaut d'expression de la GPIb (et de tout le complexe GPIb/IX/V)**

PATHOLOGIES DES RECEPTEURS GLYCOPROTEIQUES DES PROTEINES ADHESIVES

PHYSIOPATHOLOGIE

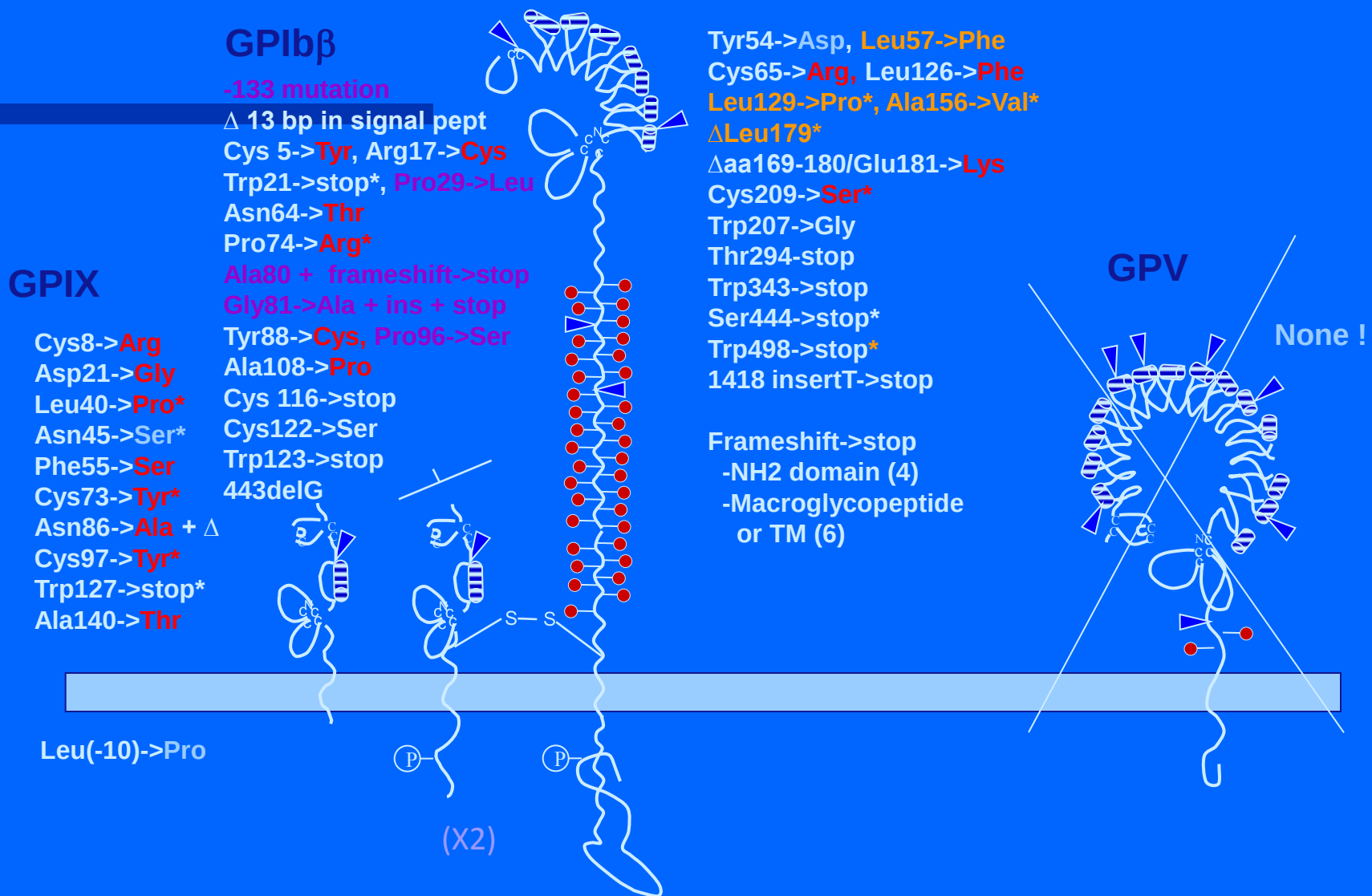
SYNDROME DE BERNARD SOULIER

(Dystrophie thrombocytaire hémorragique de Bernard Soulier)

- Complexe GpIb IX V situé sur la membrane des cellules mégacaryocytaires/ plaquettes
- Défaut d'adhésion au sous-endothélium
- Diminution de l'agrégation
- ➔ le complexe GPIb/IX, après fixation du facteur Von Willebrand se comporte comme un récepteur induisant une transduction du signal dépendant de la concentration intracellulaire de Ca^{++}

Mutations responsables de syndrome Bernard-Soulier

GPIb α



Association de syndrome de DiGeorge

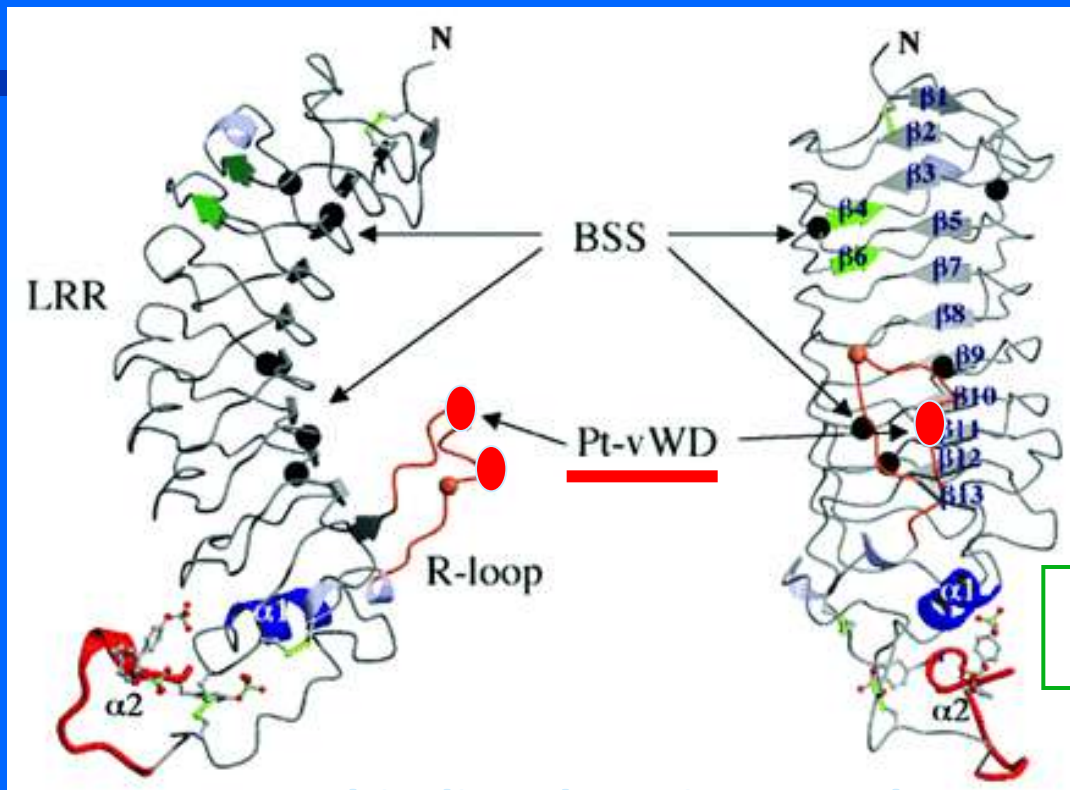
SYNDROME DE BOLZANO

P. Noris, haematologica 2011

- Thrombopénie, macro-plaquettes liées mutation *GIBA* (Ala156Val)
- Thrombopénie en règle modérée
- Transmission autosomale dominante
- Expression hémorragique modérée, variable
- Diminution RIPA, GPIIb α

Pseudo-VWD

Platelet-type vWD



VWF-binding domain to GPIb

Probably often misdiagnosed
Interest of molecular biology studies

Mutations in GPIBA

- Gly233Val
- Gly233Ser
- Met239Val
- 27-bp deletion in macroglycopeptide encoding domain

RIPA positive for all patients with 0.5 mg/ml ristocetin

Platelet count decreased or normal

HMW decreased Ratio VWF
RCo/Ag < 0.7

THROMBOCYTOPENIES SYNDROMIQUES :

MACROTHROMBOPENIES

MUTATIONS IIGA2B ET ITGB3

	Signes hémorragiques	Agrégation	Mutation α IIb ou β 3	Taux de α IIb β 3	Fixation de PAC1
Patient 1	modérés	ADP : peu	. Arg 955 Gln (S) . Pas d'expression de l'autre allèle (M)	bas	spontané
Patient 2			Arg 995 Trp	50%	spontané
Patient 3		Normale	Asp 732 His (β 3)		
Patient 4	Sévère	Très réduite	Del β 3.39aa	bas	normal
Patient 5	Sévère	Très réduite défaut	Leu 718 Pro β 3	bas	

TROUBLES SECRETOIRES : α GRANULAIRES

Macro-thrombopénie modérée mais variable

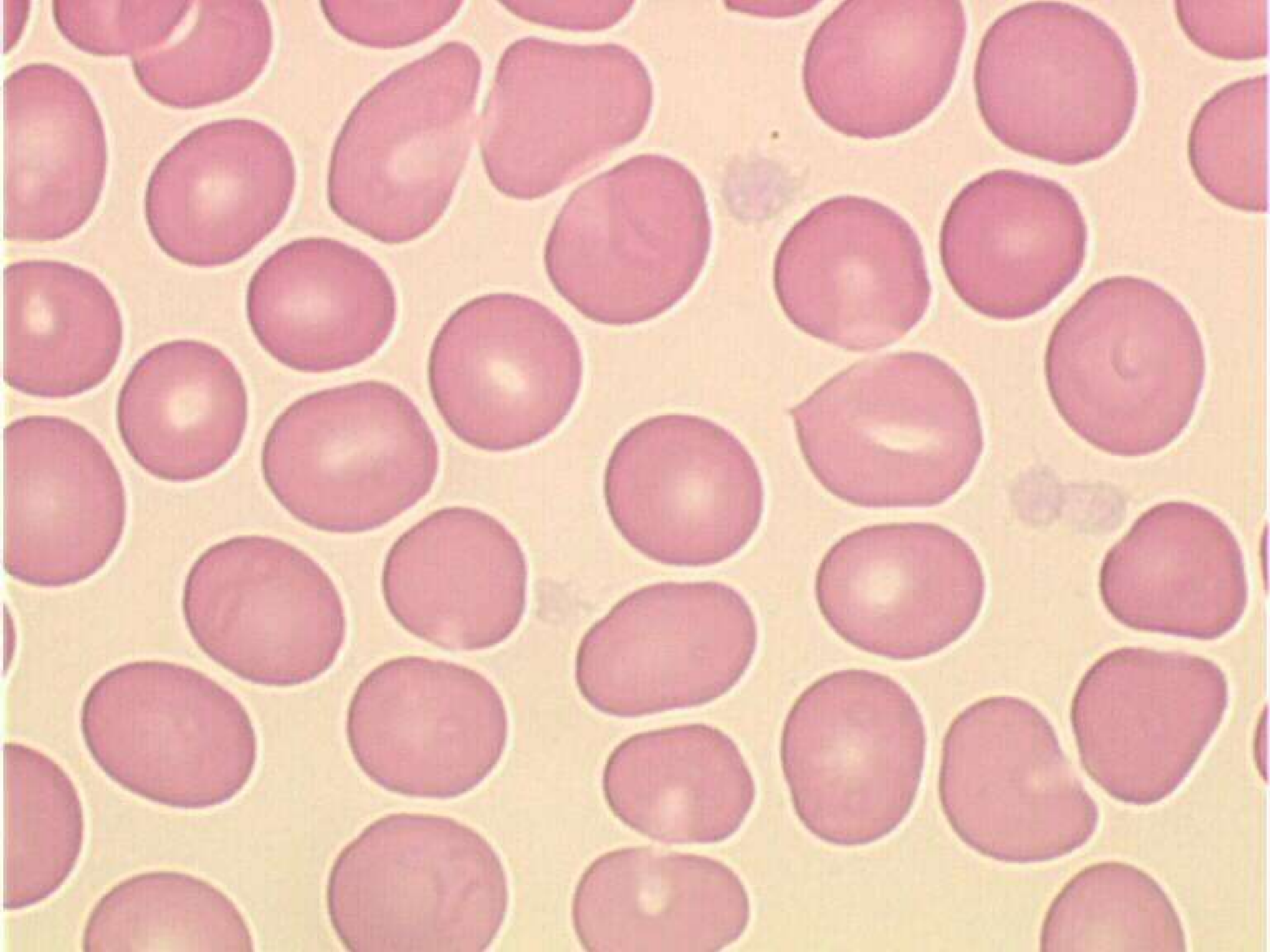
Syndrome hémorragique discordant avec le taux des plaquettes

Apparence grise sur un frottis MGG

Mégacaryocytes agranulaires vacuolés

Autosomal récessive

Développement d'une myélofibrose.

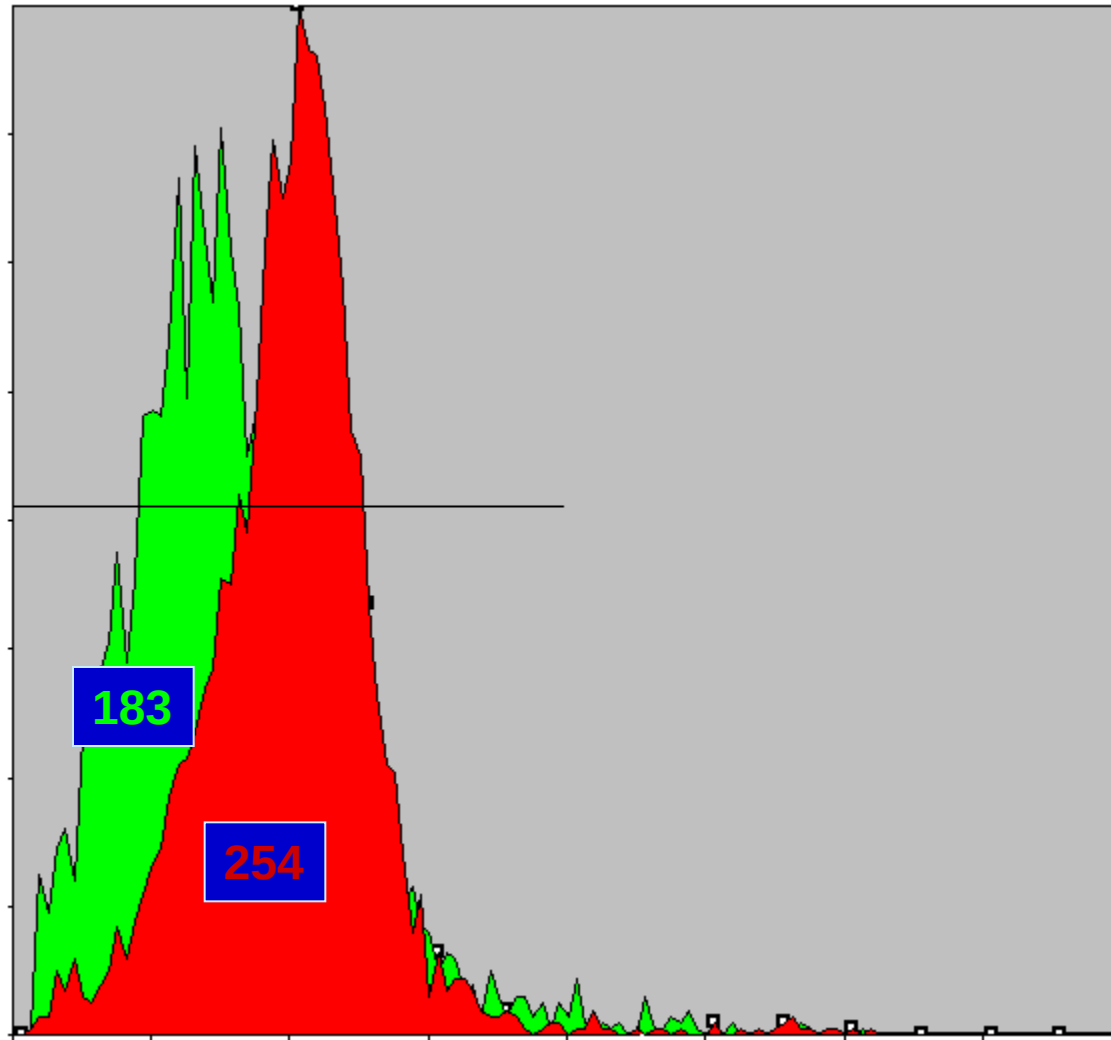


Données biocliniques publiées

CAS		PLTS		Agrégation		〈 protéines			Syindr
x10 ³ /μl		ADP	COLL	THRB		déficitaires	Myélofib	hémorr	
1	US	25–150	+	+	+	ⓈTG, PF4, PDGF, TSP, Fg, Fn		NR	+
2	US	100–150	+	+	+	ⓈTG, PF4, PDGF, TSP, Fg, Fn		NR	+
3, 4	FR	75, 80	++	-	+	ⓈTG, PF4, TSP, Fg, Fn, Alb, Fact V		+, +	+
5, 6	AUS	44, 61	++	++	++	ⓈTG, TSP, Fg, Alb, VWF, Ig		NR, +	+
7	NZ	50–150	++	+	++	ⓈTG, PF4, TSP, Fg, Alb, VWF		+	+
8, 9	ALL	33–150	++	+	NR	ⓈTG, PF4,		+	+
10	JPN	100-Nal	+	-	+	ⓈTG, PF4, PDGF, VWF, Fg, Fn		-	+/-
11	UK	104–162	++	++	±	ⓈTG, PF4, TSP, Fg, VWF, Fn, PDGF		+	+
12	BE	20–120	++	++	NR	PF4, ⓈTG, PAI-1		-	+/-
13	FR	70	++	-	+	TSP, OSTn, PF4, Fg, PDGF, TGF-Ⓢ1		+	+
14	FR	100	+	+	+	ⓈTG, PF4, Fg, VWF		Fib Plm Id	+
15	FI	20–60	++	+	NR	NR		+	+
16	PR	46–120	++	++	+	ⓈTG, Fg, VWF, Fact V		+	+
17, 18	ISR	80, 95	++	++	NR	Fg, Fn, VWF		+, NR	+

d'après Nurden & Nurden. Blood Reviews. 2007; 21:21-36

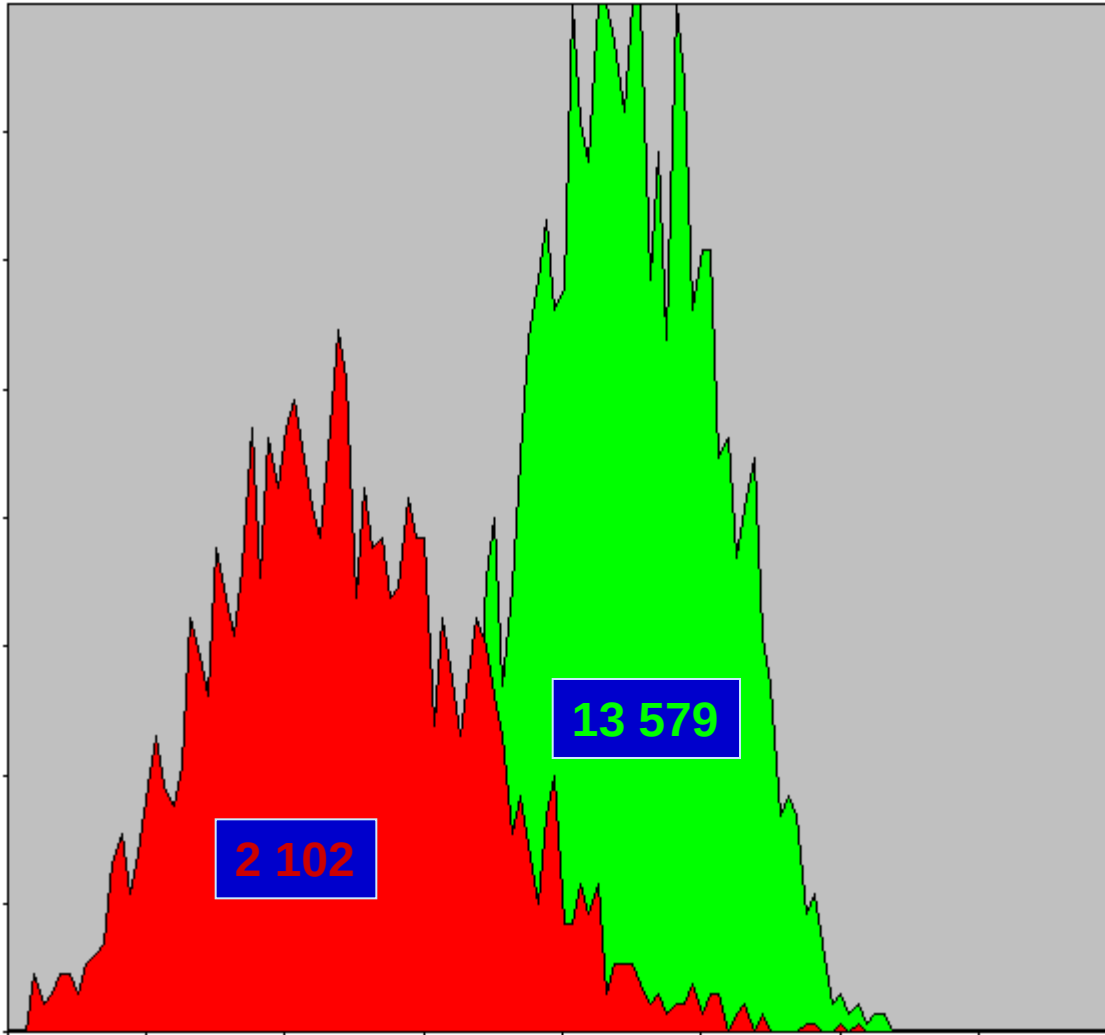
EXPRESSION de la P-Sélectine à l'état basal nombre de sites antigéniques par plaquette



- ┌ **Histogramme 1:**
patient normal
183 sites/plaquette
- ┌ **Histogramme 2:**
patient pathologique
254 sites/plaquette
- ┌ Profils identiques

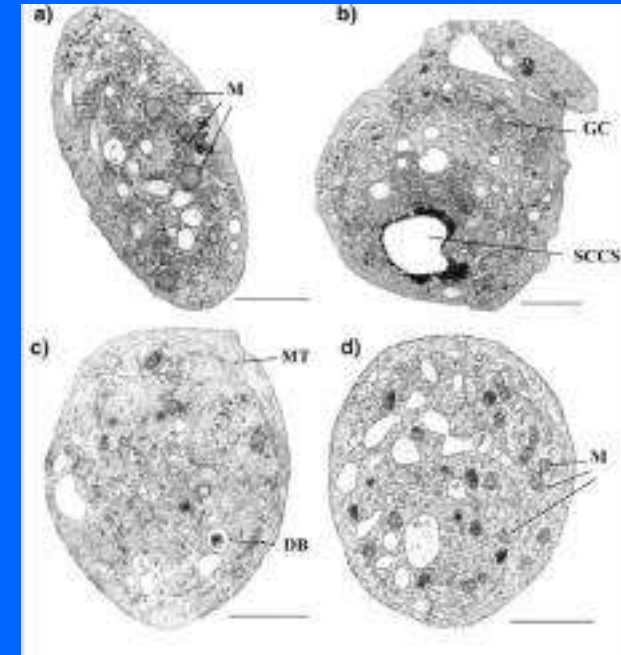
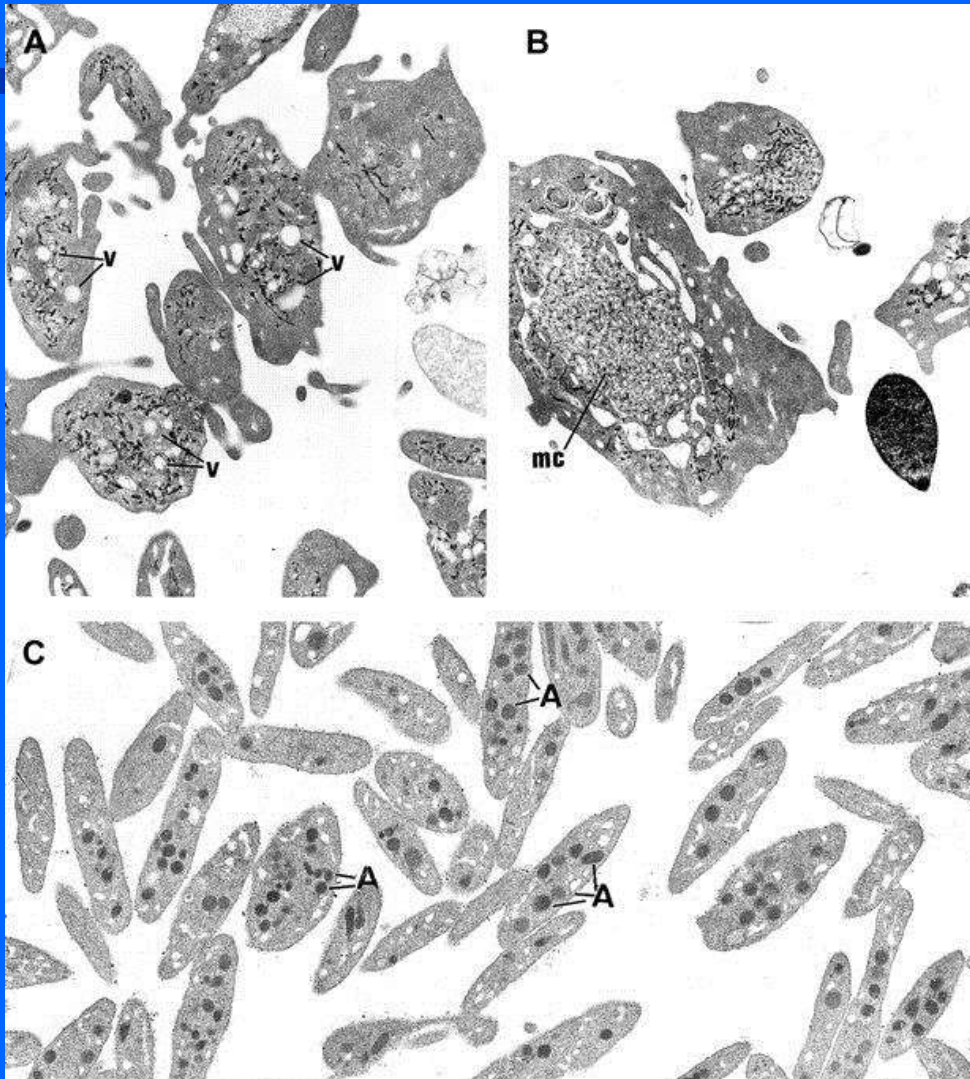
EXPRESSION de la P-Sélectine après activation par la thrombine – TRAP

nombre de sites antigéniques par plaquette



- ┌ **Histogramme 1:**
patient normal
13 579 sites/plaquette
- ┌ **Histogramme 2:**
patient pathologique
2 102 sites/plaquette
- ┌ Profils différents:
Pas d'activation par la thrombine

Les plaquettes SPG



- ✓ Absence de granules α
- ✓ Autres granules présents
- ✓ Nombreuses vacuoles
- ✓ Dysmorphiques

Drouin et al Blood. 2001; 98:1382-91.

Nurden & Nurden. Blood Reviews. 2007; 21:21-36

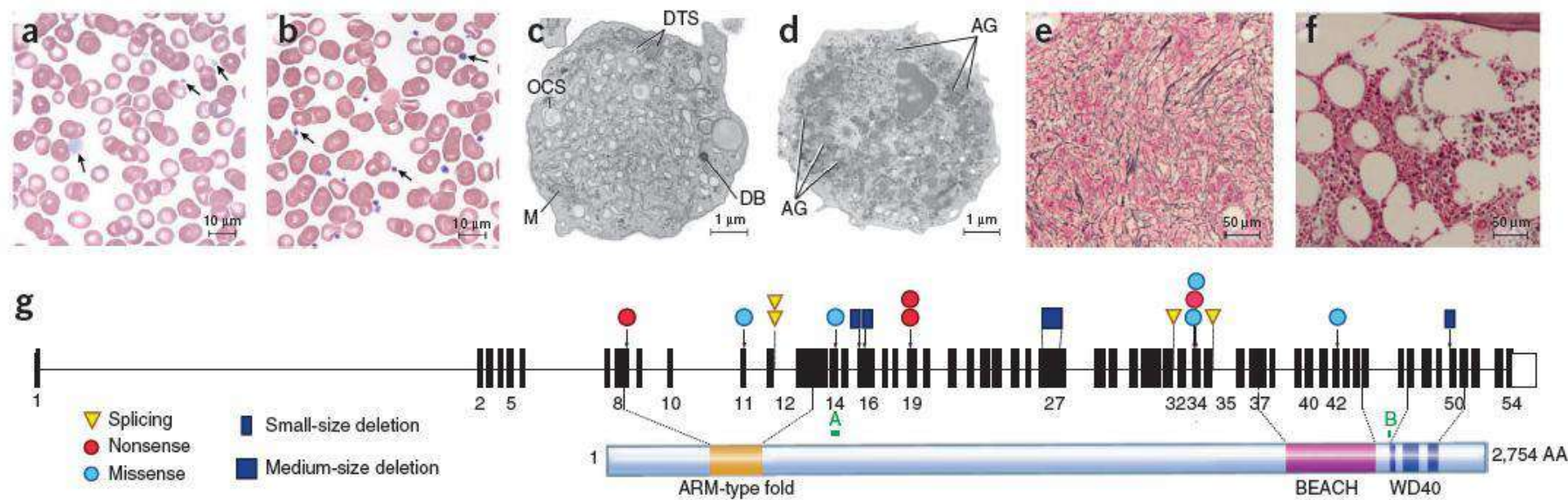


Figure 1 Cellular studies of GPS. (a) Light microscopy of a peripheral blood smear of the patient from family GPS-14 showing pale gray platelets (arrows), some larger than normal. (b) Normal, darkly stained platelets (arrows). (c) Transmission electron microscopy of thin sections of a platelet from GPS-13 showing the absence of α -granules and abundant channels of the open canalicular system (OCS). DTS, dense tubule system; DB, dense body; M, mitochondrion. (d) Normal platelet with α -granules (AG). (e) Reticulin staining of bone marrow of the patient from family GPS-4 showing myelofibrosis (black strands). (f) Normal bone marrow without fibrosis. Scale bars, 10 μm (a,b), 1 μm (c,d) and 50 μm (e,f); magnification $\times 200$. (g) Schematic representation of *NBEAL2* with mutations indicated. The NBEAL2-001 isoform is depicted with its BEACH, WD40 and ARM-type fold domains. Small green bars labeled A and B represent two NBEAL2 peptide fragments identified by mass spectrometry. A: WGSPTSLEGELGAVAFHEALQATALR; B: AFFAEVSDGVPLVLALVPHR.

THROMBOPENIE LIEE A L'X (mutation de GATA1)

- Avec dysérythropoïèse et HbF élevé

Première description

NICHOLS KE (*Nat. Genet. 2000*)

- Puis

FRESON K (*Blood 2001*)

WHITE J (*Platelets 2007*)

TUBMAN (*Blood 2007*)?

- En ME plaquettes

Hypogranulaires

Grande taille

Images spécifiques?

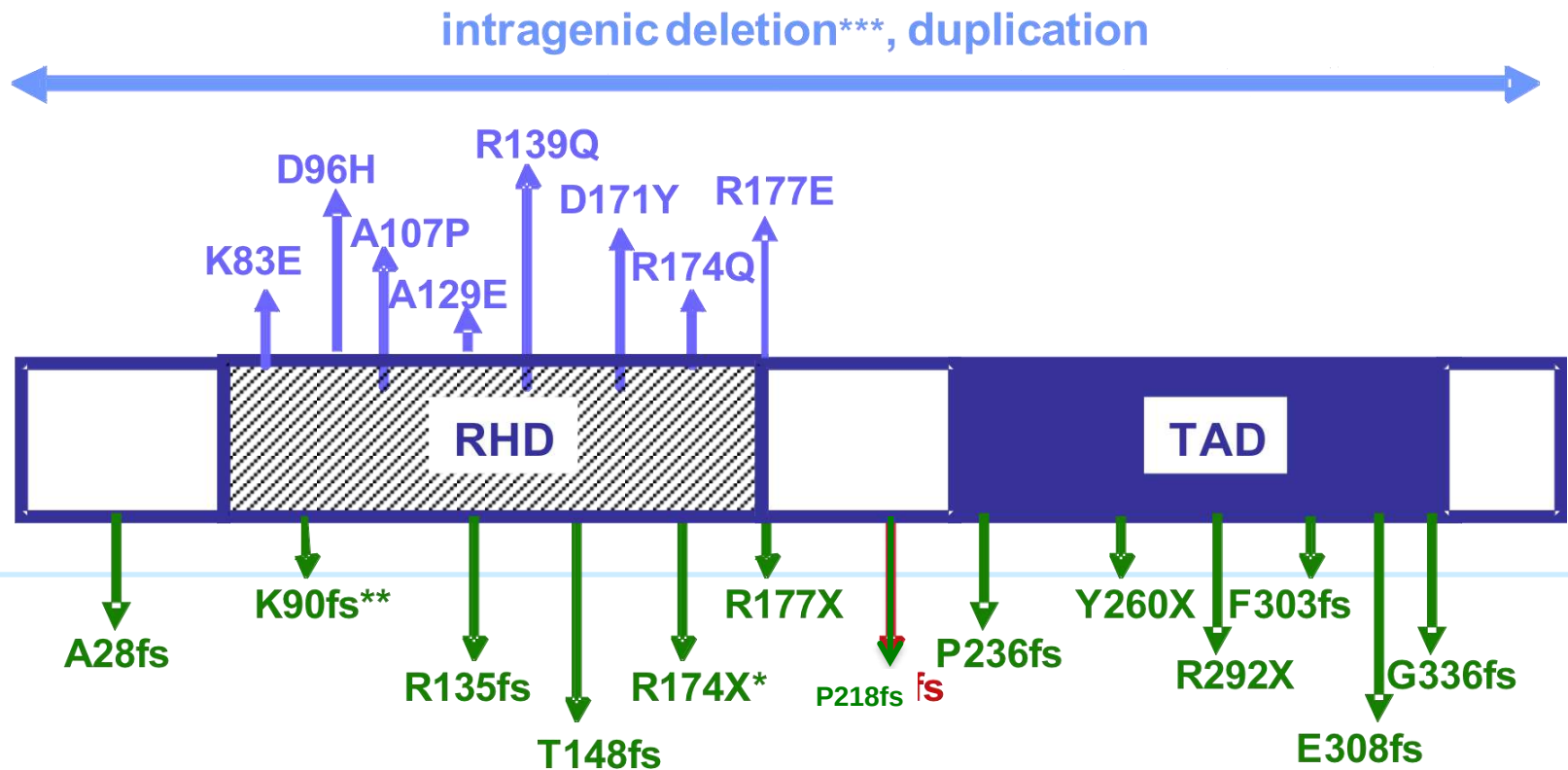
PLAQUETTES DE TAILLE NORMALE

- Amégacaryocytose congénitale (CAMT)
- Thrombopénie et prédisposition familiale aux leucémies (AML1)
- THC2 :
 - . anomalies ankyrine D26 (ANKD26)
 - . thrombopénie MASTL
- THC4 : anomalies cytochrome C

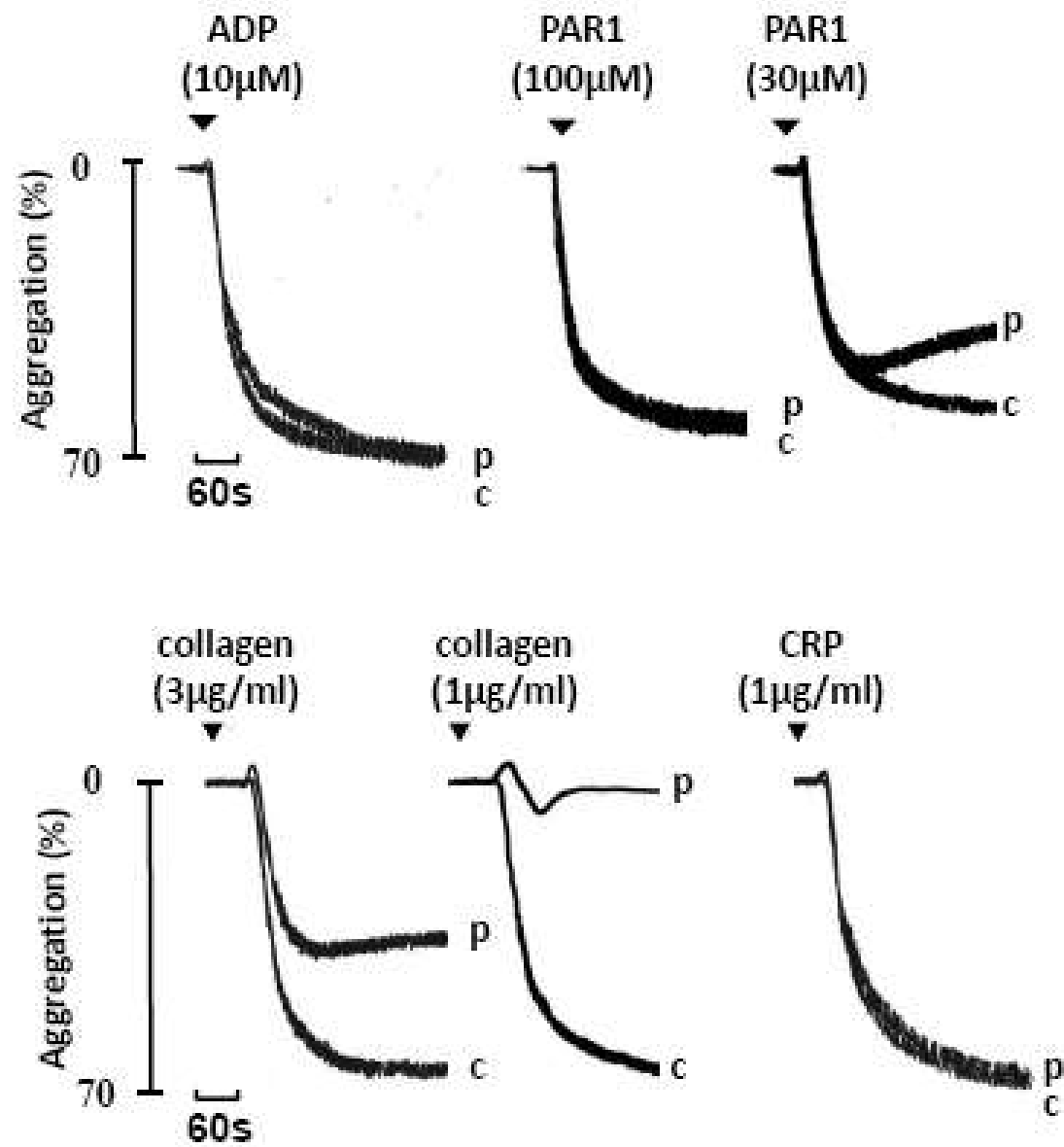
CARACTERISTIQUES SPECIFIQUES DES THROMBOPENIES LIEES A DES MUTATIONS DE RUNX 1/AML1

- Thrombopénie modérée le plus souvent
- Signes cliniques hémorragiques : secondaires liées à la présence d'anomalies fonctionnelles plaquettaires évocatrices d'un pool vide delta, aspirine like ou autres?
- Signes cliniques syndromiques : cas avec délétions

Mutations germinales de RUNX1



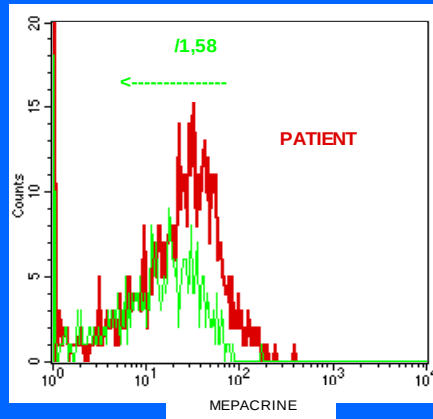
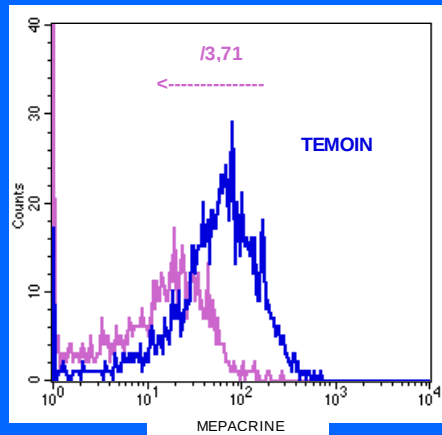
A



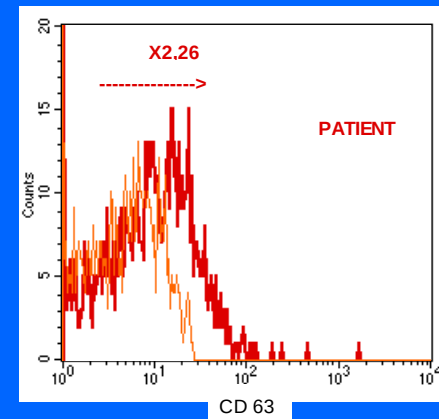
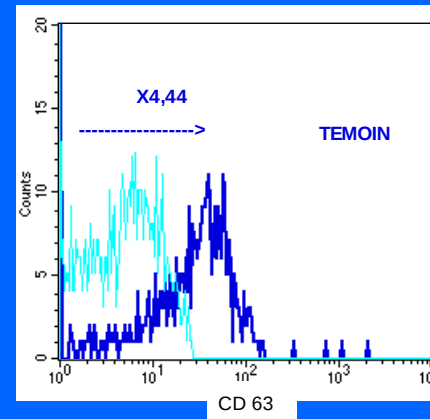
Exploration des granules denses

Étude de la sécrétion de mépacrine

Étude de l'expression membranaire de CD63

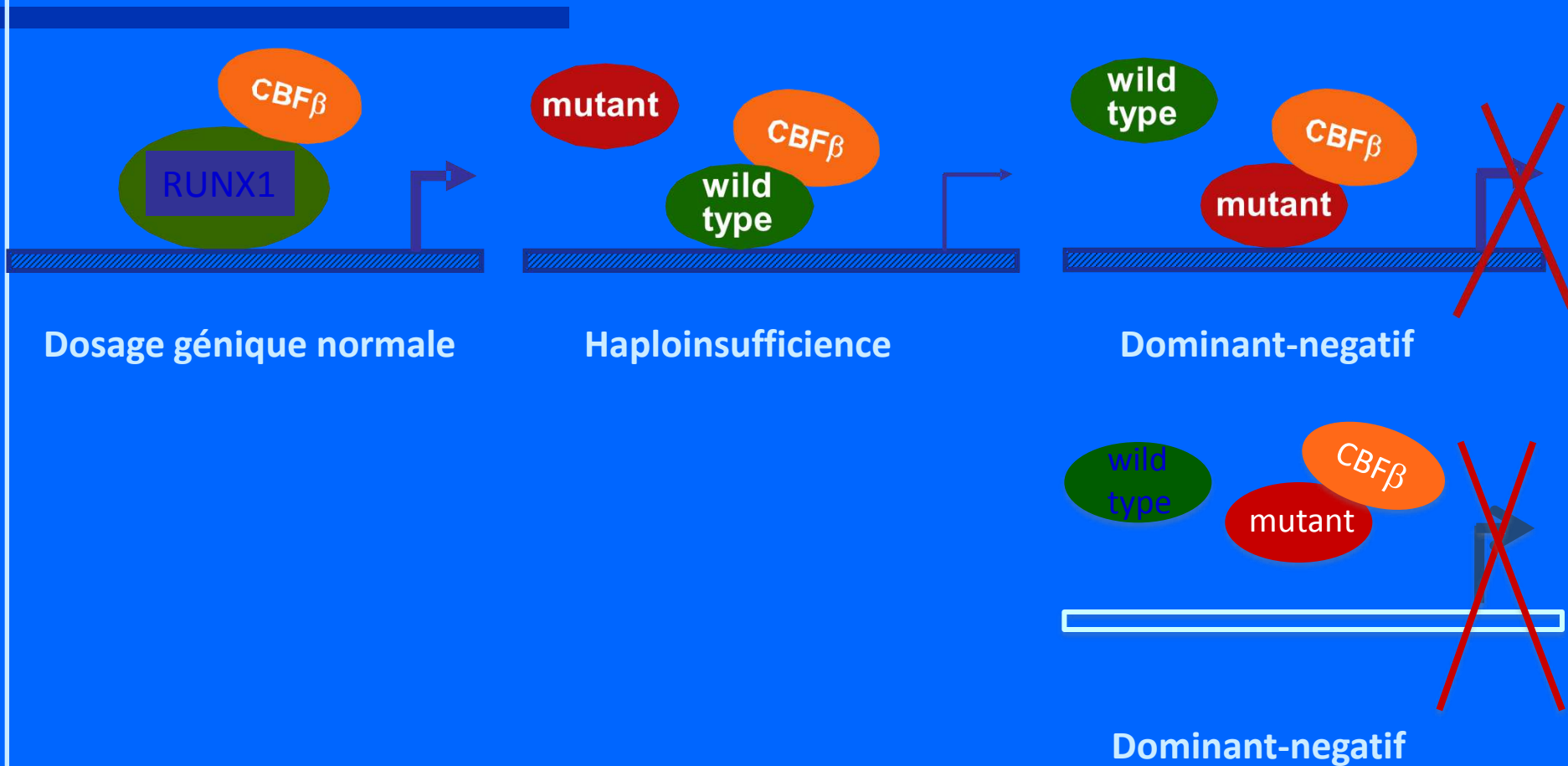


Sécrétion de mépacrine



Expression membranaire de CD63

Mécanismes de la physiopathologie



CARACTERISTIQUES SPECIFIQUES DE LA THROMBOPENIE TCH2 (ANKRD26)

- **Thrombopénie plus sévère**
- **Peu de signes cliniques hémorragiques**
- **Fonction plaquettaire normale**
- **Non inclus dans un tableau syndromique**

Platelet flow cytometry

33 patients tested: only GPIa deficient

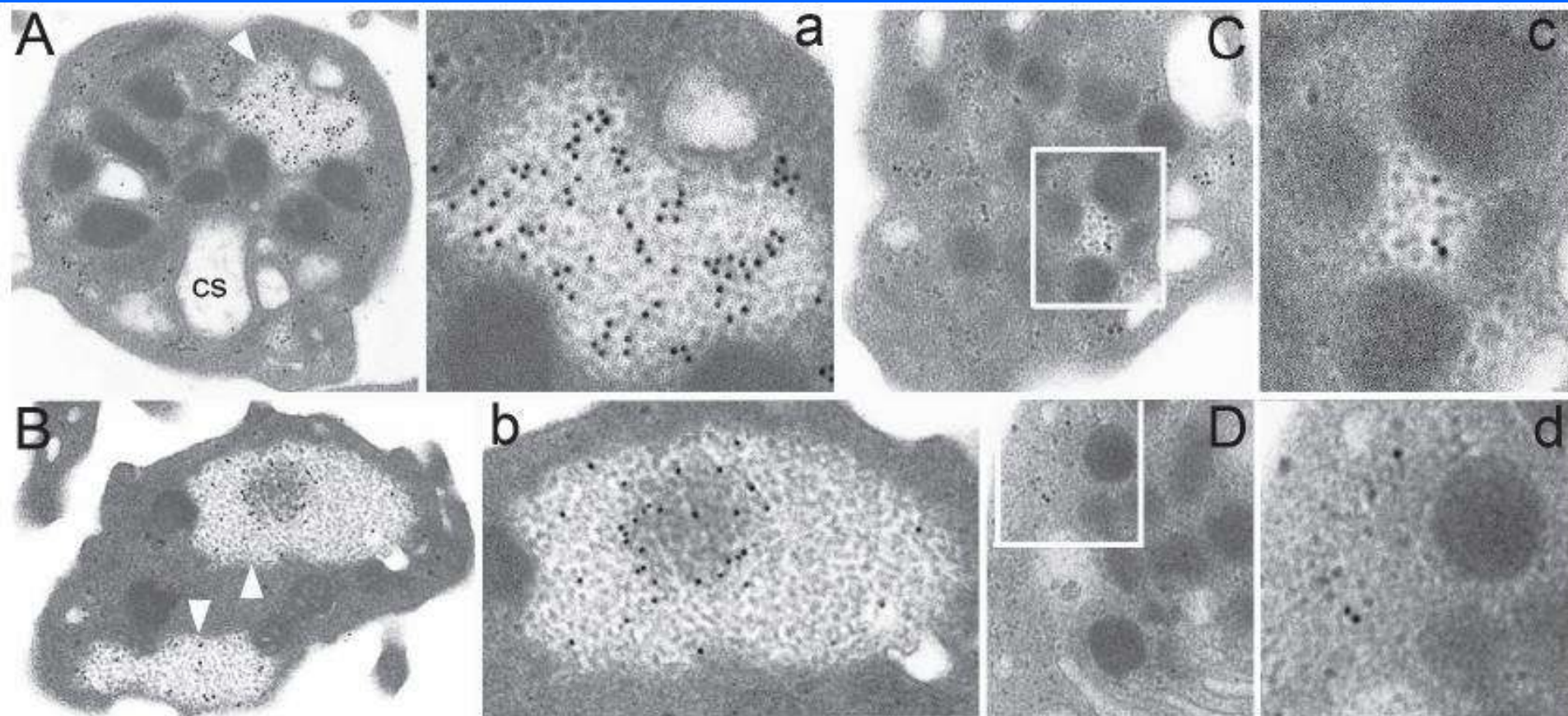
Platelet aggregation: normal in response to collagen, ADP, ristocetin.

Increased number of Marrow Mks and features of dysmegakaryopoiesis: small Mks hypolobulated and micro Mks.

High TPO levels.

ANOMALIES EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE

- **Présence de particules cytoplasmiques**
- **Augmentation de leur taille et de leur nombre**
- **Réactivité avec les protéines du protéasome**
- **Décrites dans d'autres pathologies**
- **Localisation au niveau des plaquettes et des mégacaryocytes des patients**



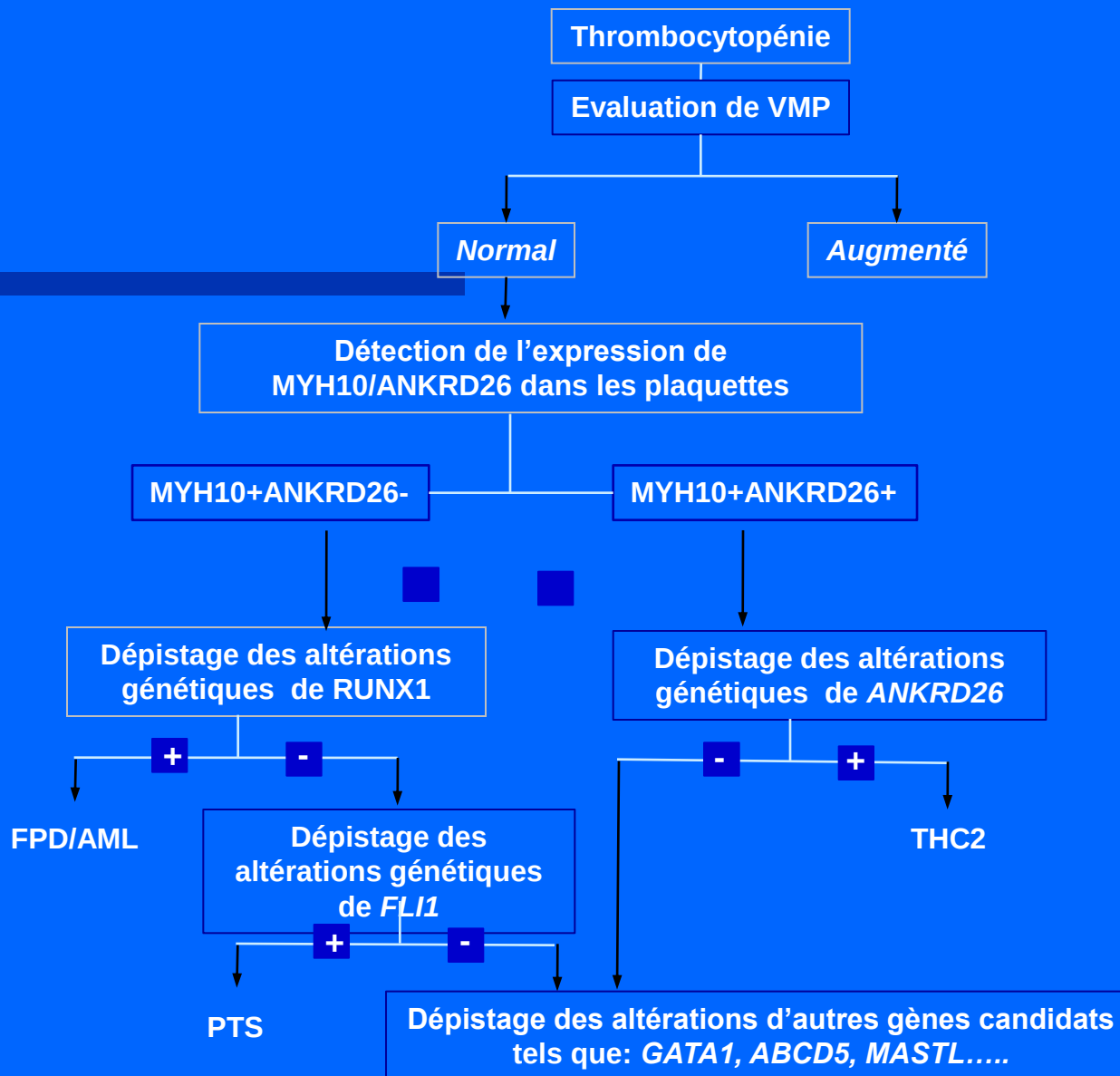
Diagnostic de thrombopénies familiales: FPD/AML (mutation de RUNX1) THC2 (mutation de 5'UTR de l'ANKRD26)

FPD/AML (Familial platelet disorder with predisposition to myeloid leukemia)

- Transmission autosomale dominante
- Thrombopénie modérée
- Volume plaquettaire normal
- Prédisposition aux leucémies
- Défaut de fonctions plaquettaires

THC2 (Thrombocytopenia 2)

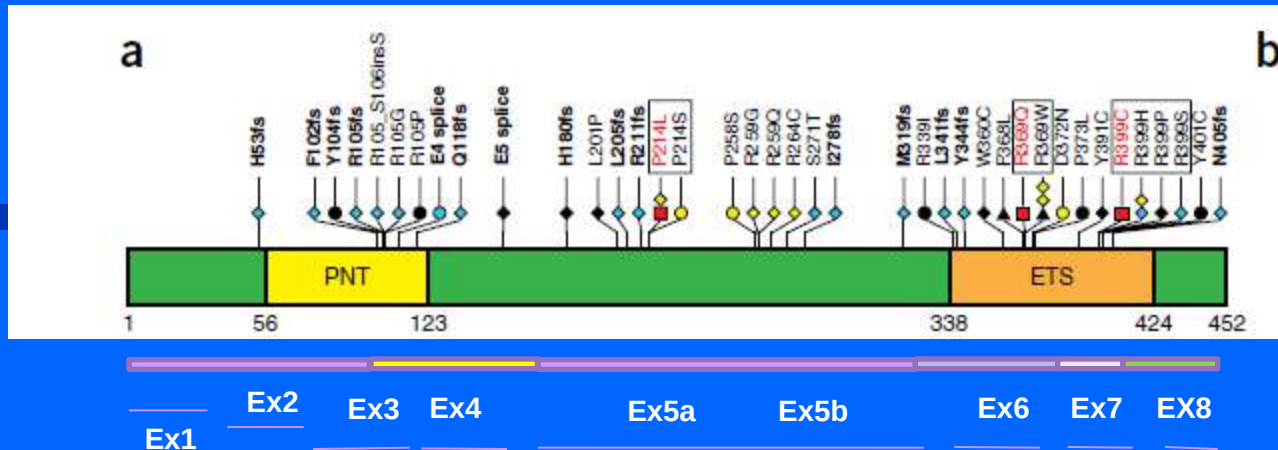
- Transmission autosomale dominante
- Thrombopénie modérée
- Volume plaquettaire normal
- Prédisposition aux leucémies
- Agrégation plaquettaire normale
mais diminution de a-granules



Germline *ETV6* mutations in familial thrombocytopenia and hematologic malignancy

Michael Y Zhang¹, Jane E Churpek^{2,3}, Siobán B Keel⁴, Tom Walsh^{5,6}, Ming K Lee^{5,6}, Keith R Loeb^{1,7}, Suleyman Gulsuner^{5,6}, Colin C Pritchard⁸, Marilyn Sanchez-Bonilla¹, Jeffrey J Delrow⁹, Ryan S Basom⁹, Melissa Forouhar¹⁰, Boglarka Gyurkocza¹, Bradford S Schwartz^{11,12}, Barbara Neistadt^{2,3}, Rafael Marquez^{2,3}, Christopher J Mariani^{2,3}, Scott A Coats¹, Inga Hofmann¹³⁻¹⁵, R Coleman Lindsley^{16,17}, David A Williams¹³⁻¹⁵, Janis L Abkowitz⁴, Marshall S Horwitz⁷, Mary-Claire King^{5,6}, Lucy A Godley^{2,3} & Akiko Shimamura^{1,18,19}

Received 20 August 2014; accepted 4 December 2014; published online 12 January 2015; doi:10.1038/ng.3177



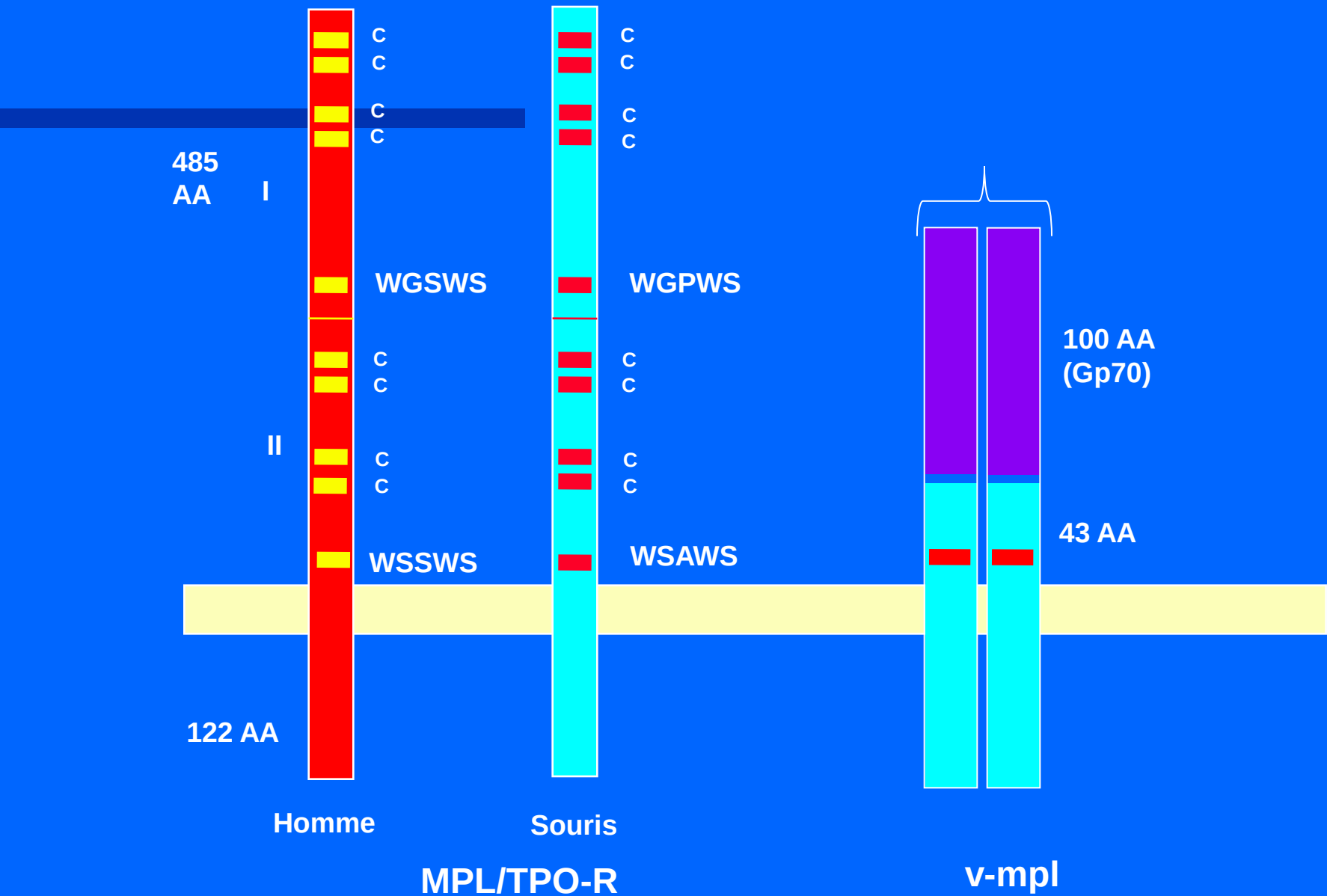
Analyse des mutations associées aux
thrombopénie de l'enfant: gDNA et 8 PCR pour
un total de 1450 nucléotides (1,5 Kb)

CONGENITAL AMEGACARYOCYTIC THROMBOCYTOPENIA

MAIN CRITERES FOR DIAGNOSIS

- ┌ Severe thrombocytopenia from birth
- ┌ Reduced or absent MKs in bone marrow : in the course hypocellular
- ┌ Normal platelet size
- ┌ Exclusion of acquired thrombopenia: immune , infections
- ┌ Exclusion of other inherited thrombopenia
- ┌ Exclusion of other pathologies : Fanconi anemia
- ┌ No skeletal abnormalities
- ┌ High elevated TPO serum levels
- ┌ MPL mutations

MPL: un récepteur orphelin



CLINICAL COURSE

- ┌ **Type 1 mutation** : premature codon stop or frameshift.
 - ┌ Absence of residual receptor.
 - ┌ Rapid progression to trilineage failure (mean onset: 2 BM years)
- ┌ **Type 2** : splicing defects or amino acid substitution
 - ┌ residual receptor for function
 - ┌ delayed onset of BM failure (mean onset : 5 years)

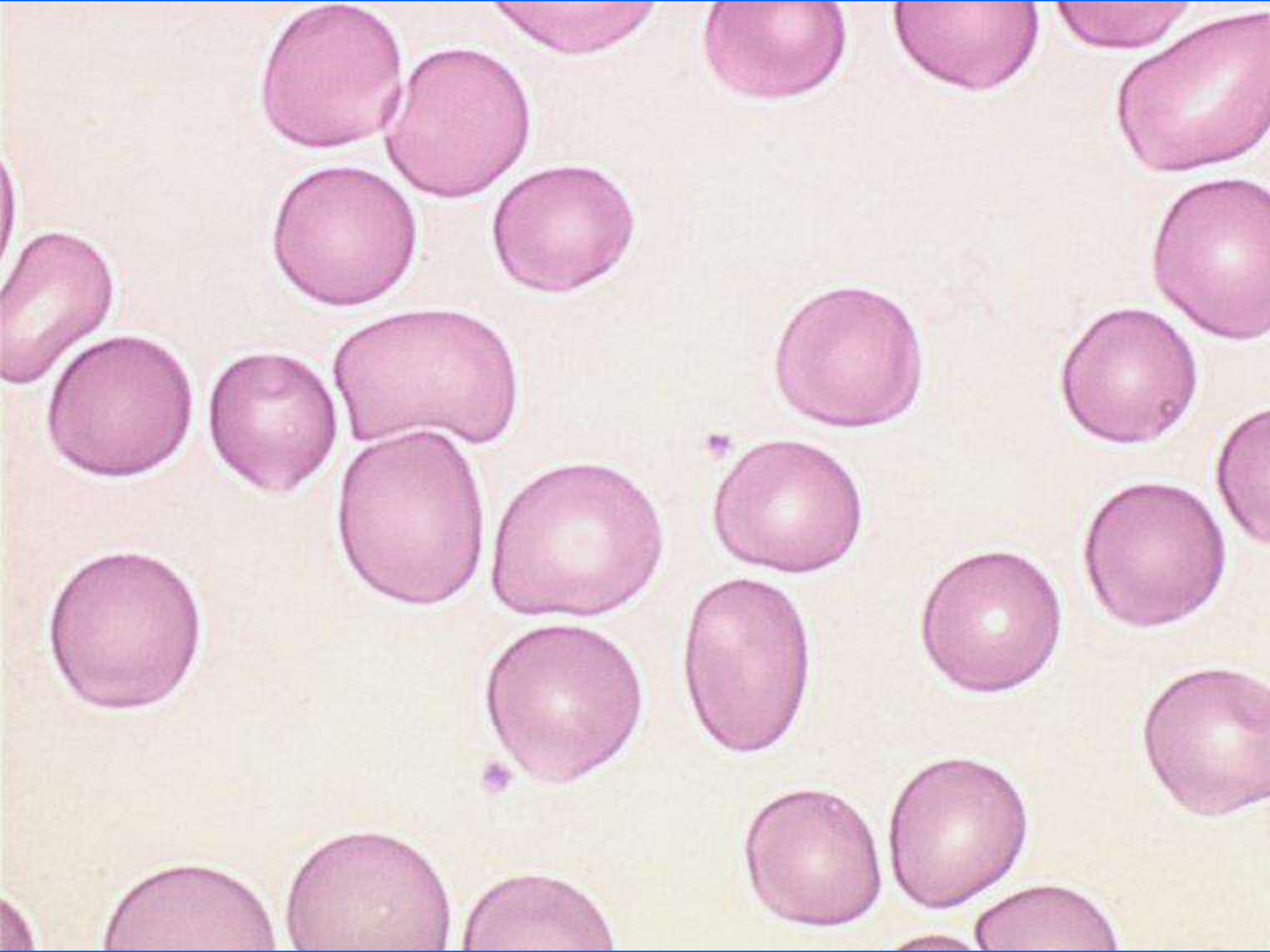
THROMBOPENIES SYNDROMIQUES

- MYH9 syndrome
- Syndrome d'Hermansky Pudlak
- TAR syndrome
- Chediak Higashi
- Syndrome velo cardial
- Filaminopathies
- Wiskott Aldrich syndrome

PATHOLOGIES SECRETOIRES

SYNDROME DE WISKOTT-ALDRICH

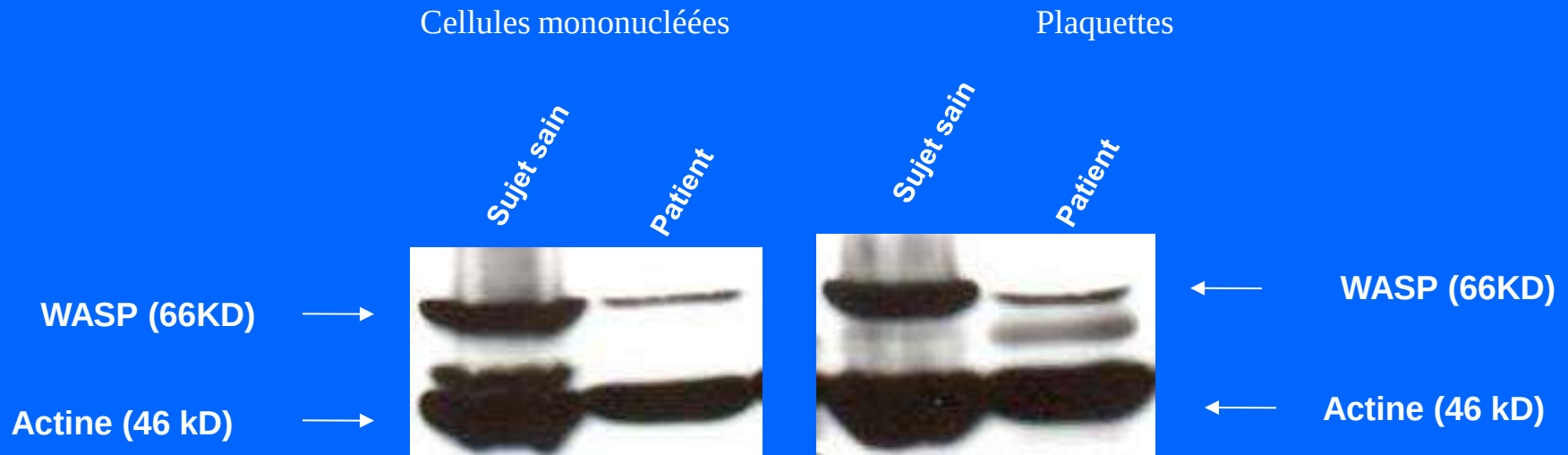
- Transmission autosomale récessive, liée au sexe
- Caractérisé par :
 - Eczéma extensif
 - Infections récurrentes sévères dues à un déficit profond de l'immunité cellulaire (Lymphocytes T et B)
 - Thrombopénie très marquée (petites plaquettes)
 - Pronostic clinique très sévère : hémorragies, infections, transformation vers un lymphome
 - Taille plaquettaire est très diminuée (1/3 de la taille normale)
 - Diminution du nombre des granules denses.



Patient 020W

Patient suspecté de syndrome de Wiskott Aldrich

Analyse des échantillons de sang périphérique soumis le 5 juillet 2005



Diminution de la protéine WASP dans les plaquettes et cellules mononuclées du patient par rapport à un sujet sain. Diminution estimée de 75 % dans les MNC et dans les plaquettes.

Sabine Charrier Ph.D. Groupe Cellules Souches – Généthon

19 Août 2005

PATHOLOGIES SECRETOIRES

SYNDROME DE HERMANSKY-PUDLAK

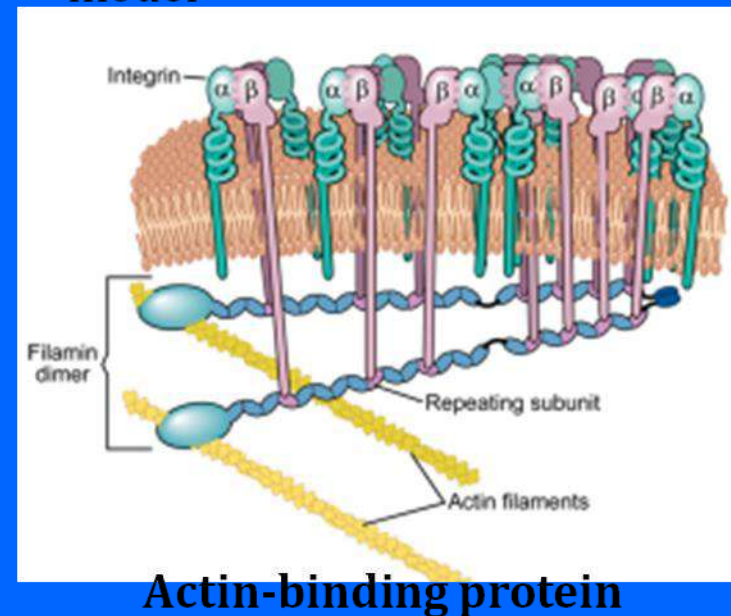
- Anomalies des granules denses
Transmission autosomale dominante
- Caractérisé par :
 - Albinisme oculocutané
 - Accumulation d'un pigment ceroid-like dans les macrophages
 - Prolongation du temps de saignement avec tendance hémorragique

Filamin A, encoded by the *FLNA* gene located on chromosome Xq28

is a cytoskeletal protein present in numerous tissues

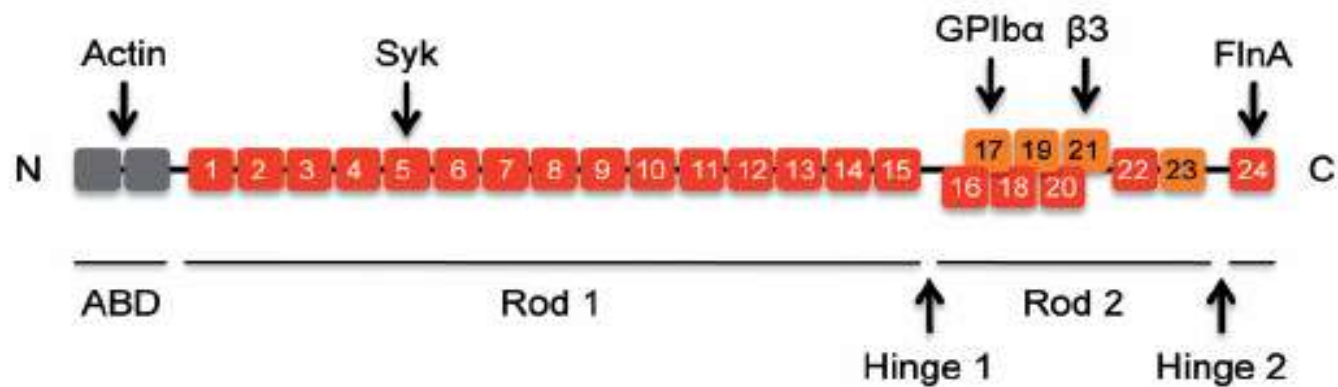
- ❖ Forms an actin-filamin network
- ❖ Links this structure to cellular membranes by binding to transmembrane receptors (GPIb α , integrins) or ion channels
- ❖ Interacts with a multiplicity of proteins

model

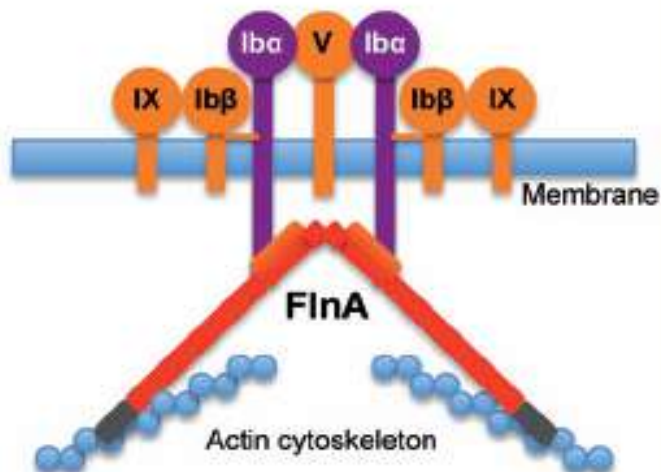


Ithychanda et al, JBC 2009

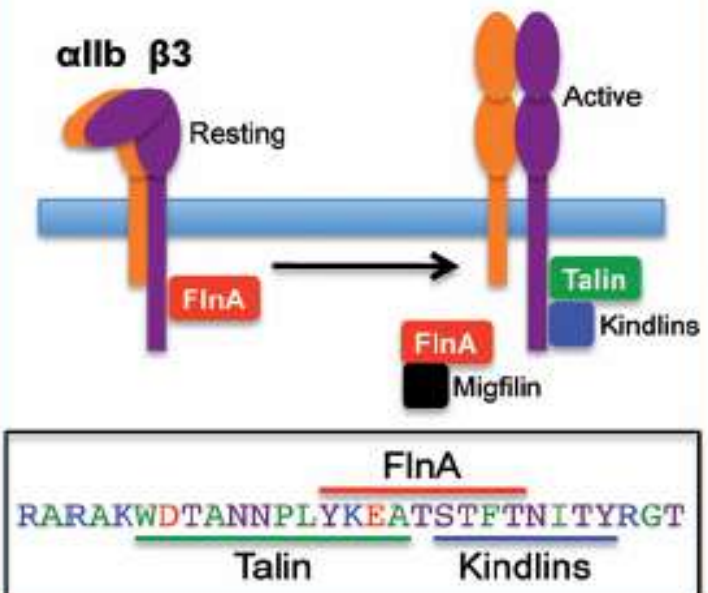
(A) FlnA structure



(D) The GPIIb-IX-V complex



(E) The integrin α IIb β 3



**TABLE 1 : CLINICAL AND LABORATORY PARAMETERS
OF THE FLNa PATIENTS ENROLLED
IN THE STUDY AND THEIR MUTATIONS**

PATIENT (P)	SYNDROME	MUTATION	PLATELET (X 1000/ μ L)	BLEEDING SYNDROME
P1	PVNH	c.4573_4insA,p.Tyr1525X	80	Excessive/easy bruising tendency Menometrorrhagia Impaired wound healing
P2	PVNH	Deletion exons 31-32 to 48	238	Excessive/easy bruising tendency Mjenometrorrhagia Impaired wound healing
P3	Isolated thrombocytopenia	p.Glu1803Lys	40-60	Petechial hemorrhages Mucocutaneous hemorrhages Menometrorrhagia Bleeding after surgery Impaired wound healing

PVNH : Periventricular nodular heterotopia

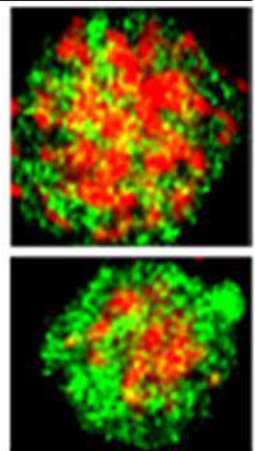
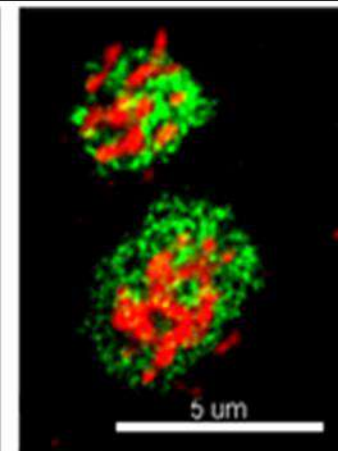
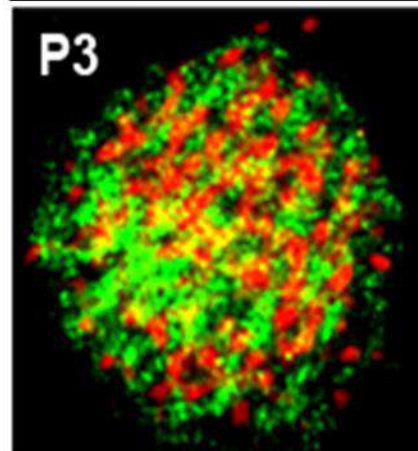
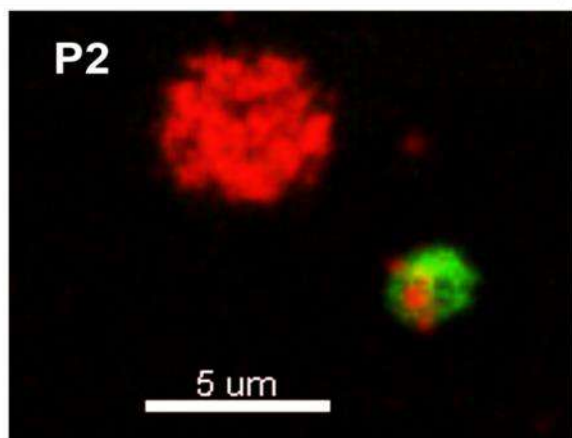
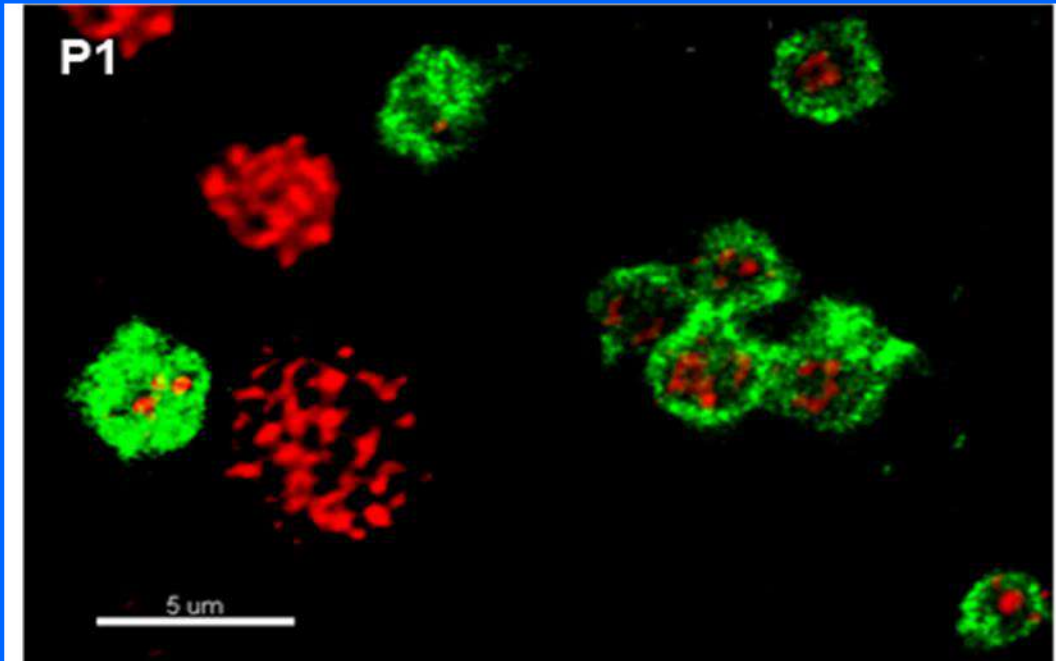
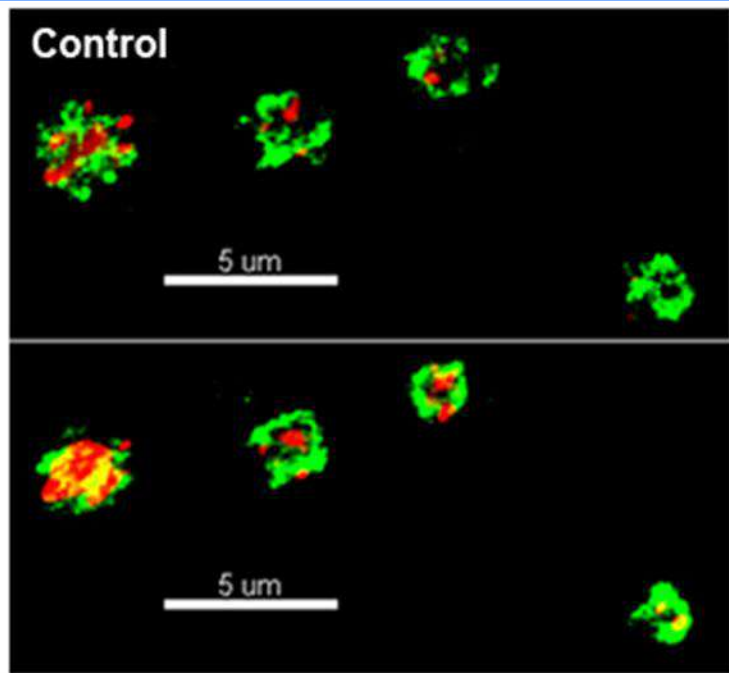
Red cell and leukocyte counts were normal for all three patients.

A population of platelets devoid in FlnA

P1: 20% $\pm$ 1

P2: 21 % $\pm$ 1

P3: 11 % $\pm$ 7



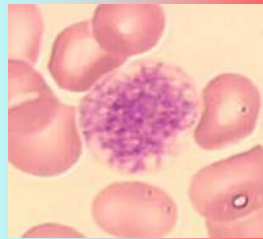
FlnA

VWF

Thrombocytopenia + large/giant platelets ⇒ bleeding +/-

Fechtner Syndrome (1985) :
+leuko. Inclusions, nephritis, deafness, cataract

**Sebastian Syndrome
(1990) :**
+ leuko. inclusions



Epstein Syndrome (1972):
+ nephritis, deafness

May-Hegglin Anomaly :
(1909; 1945)
+ leuko. inclusions

Alport-like syndrome (1986):
+ nephritis, deafness, cataract



Molecular basis : *MYH9* mutations
(Kelley 2000, Heath 2001, Seri 2002)

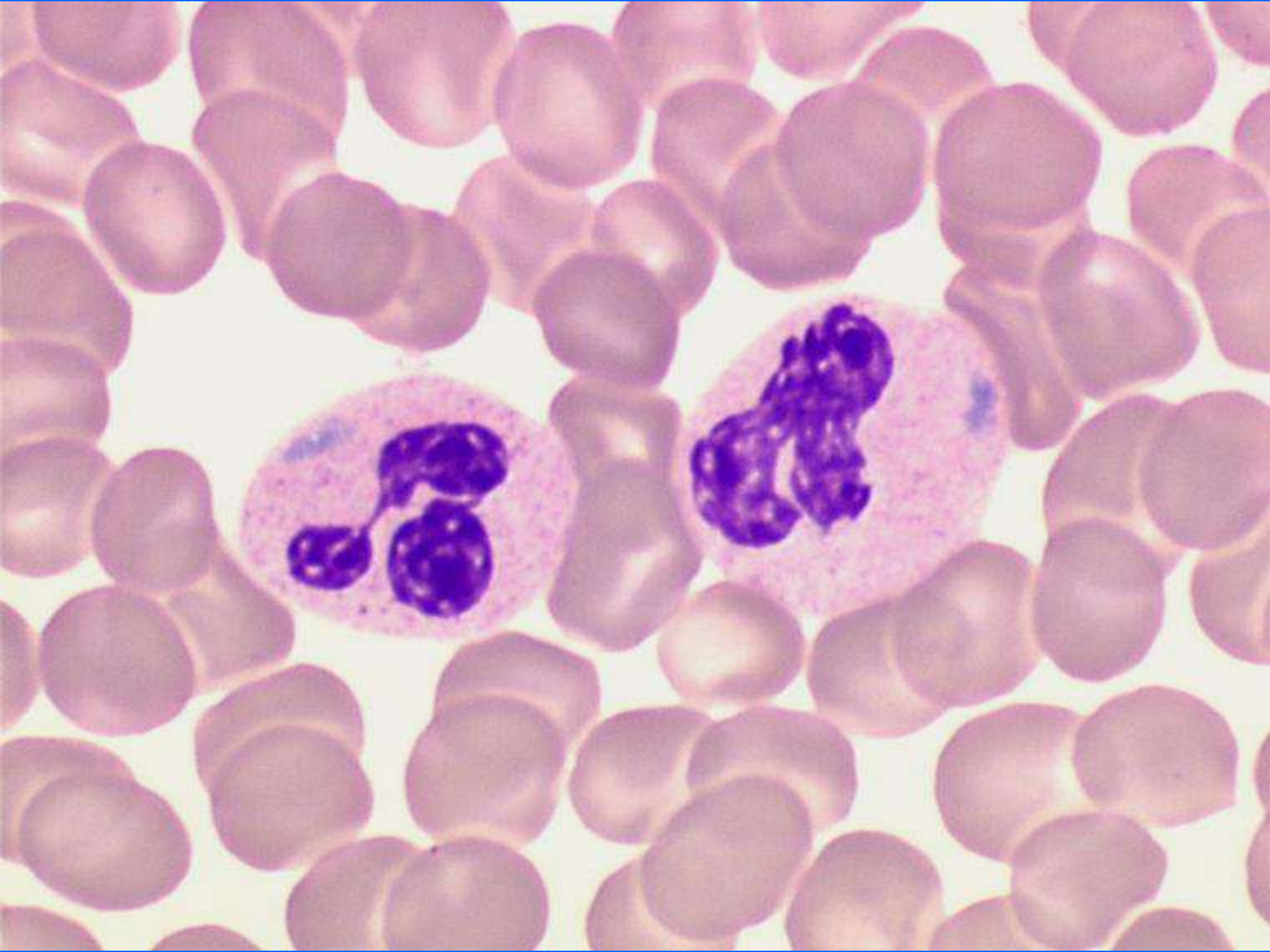
Syndrome MYH 9

Manifestations cliniques

	May Hegglin	Sebastien	Fetchner	Eptein	Alport Like
Macrothrombopénie	+	+	+	+	+
Corps de Dohle	+	+	+	-	-
Glomérulonéphrite	-	-	+	+	+
Surdité	-	-	+	+	+
Cataracte	-	-	+	-	+

Etude de liaison : association   une région du chromosome 22 22q11-13

G ne identifié : g ne MYH9 codant pour une chaine lourde d'une myosine non Musculaire
40 exons



Mutations *MYH9*

Répartition intra-leucocytaire de MYH-IIA

MHA

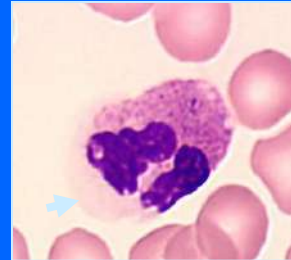
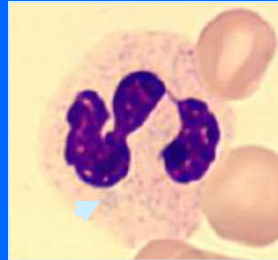
FTNS

FTNS

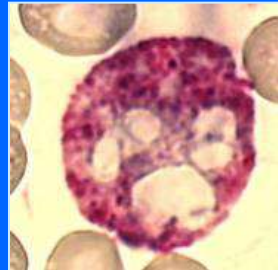
SBS→FTNS

MacroT.
isolée ?

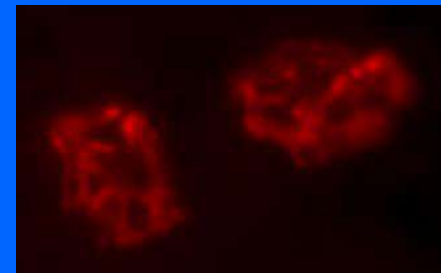
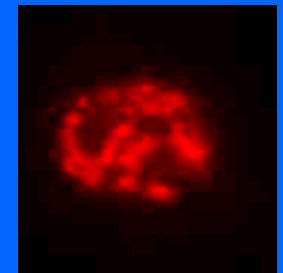
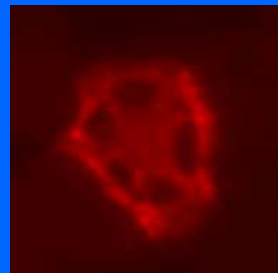
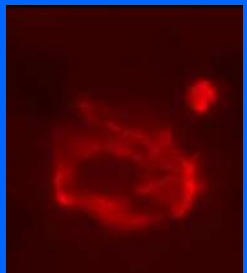
MGG



IC



IF



F1446L

R702C

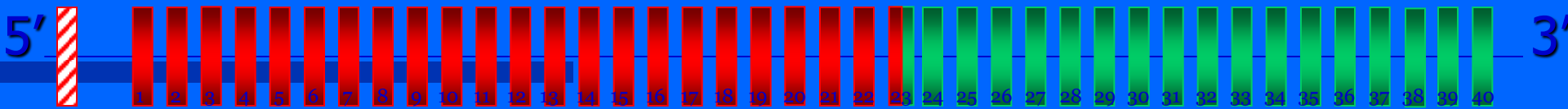
S96L

S96L

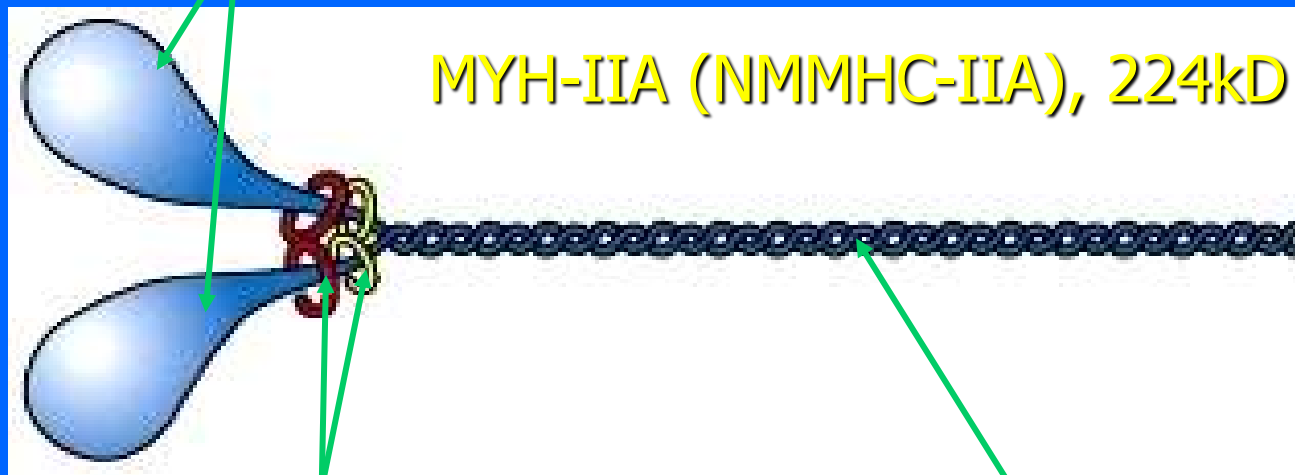
Schlegel et al, ISTH Sydney august 2005

MYH9, chr 22q12-13, 40 exons

Kunishima 1999, MHA/FTNS Consortium 2000, Kelley 2000, Heath 2001



Têtes globulaires chaînes lourdes : activité ATPase, liaison à l'actine



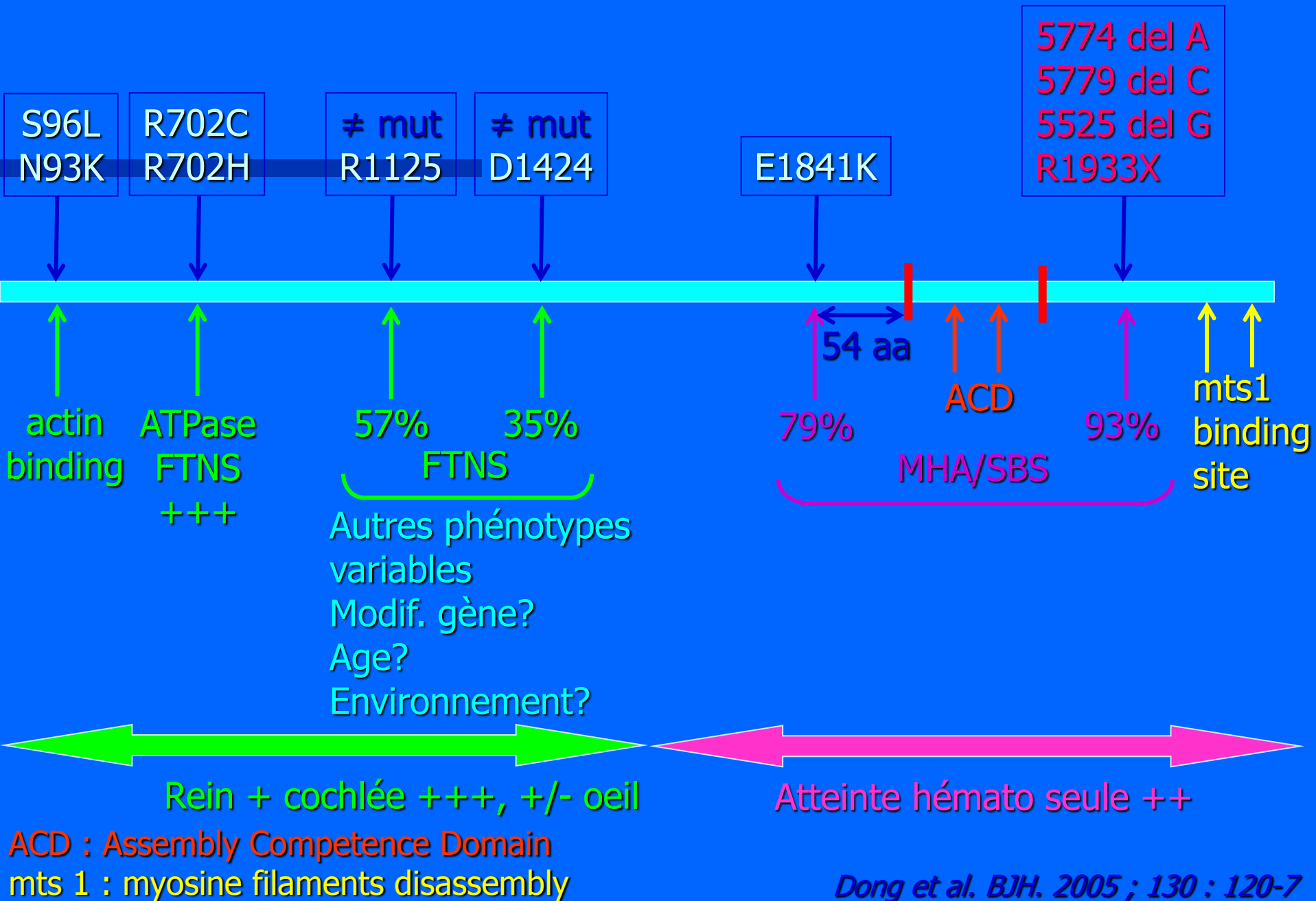
Chaînes légères :
2 paires

Partie hélicoïdale : région régulatrice

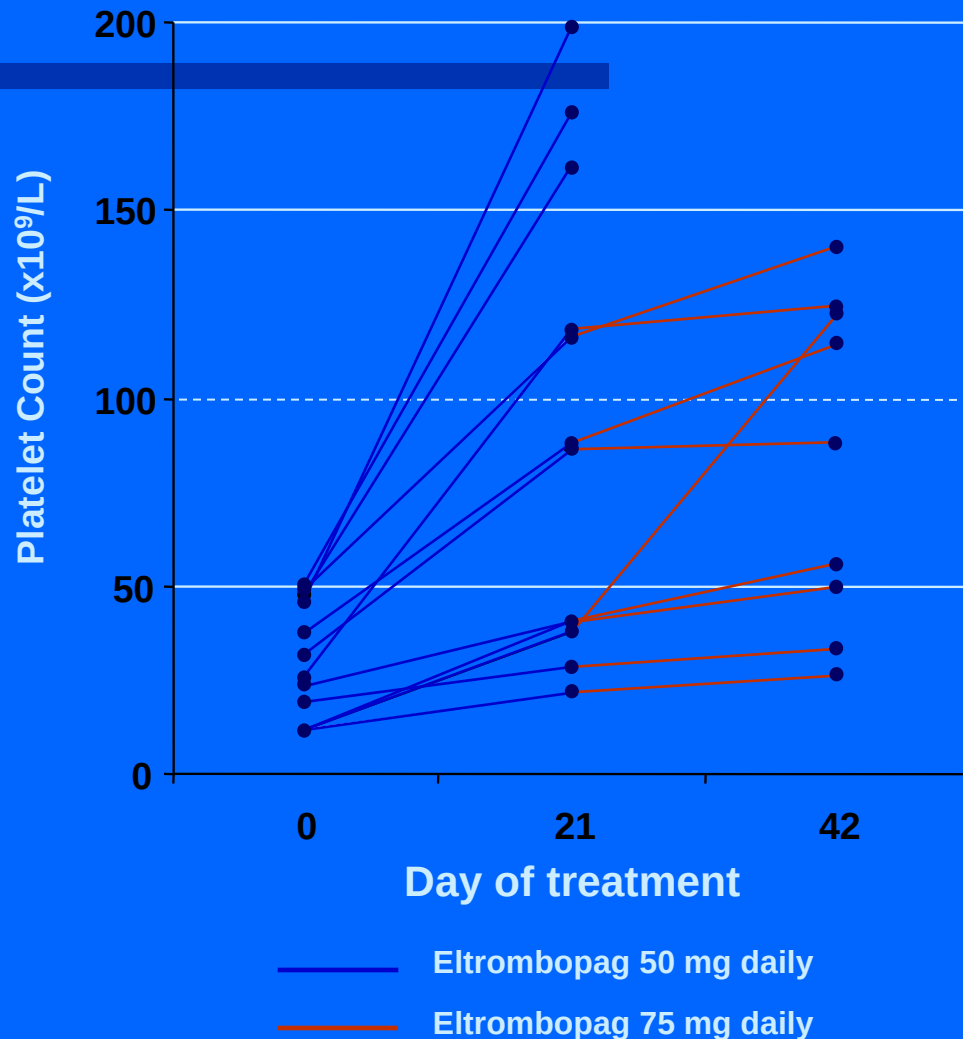
-  Exon A (dont le promoteur de *MYH9*)
-  Exons codant pour le domaine globulaire
-  Exons codant pour le domaine coiled-coil

MYH-IIA (NMMHC-IIA) : Chaîne lourde
de la myosine non musculaire-IIA

Relations génotype-phénotype?



AN EXPLORATORY PHASE II DOSE ESCALATION STUDY OF ELTROMBOPAG IN *MYH9*-RELATED DISEASE



- **Major response: n=8 (67%)**

n=5 3 weeks at 50 mg daily
n=3 +3 weeks at 75 mg daily

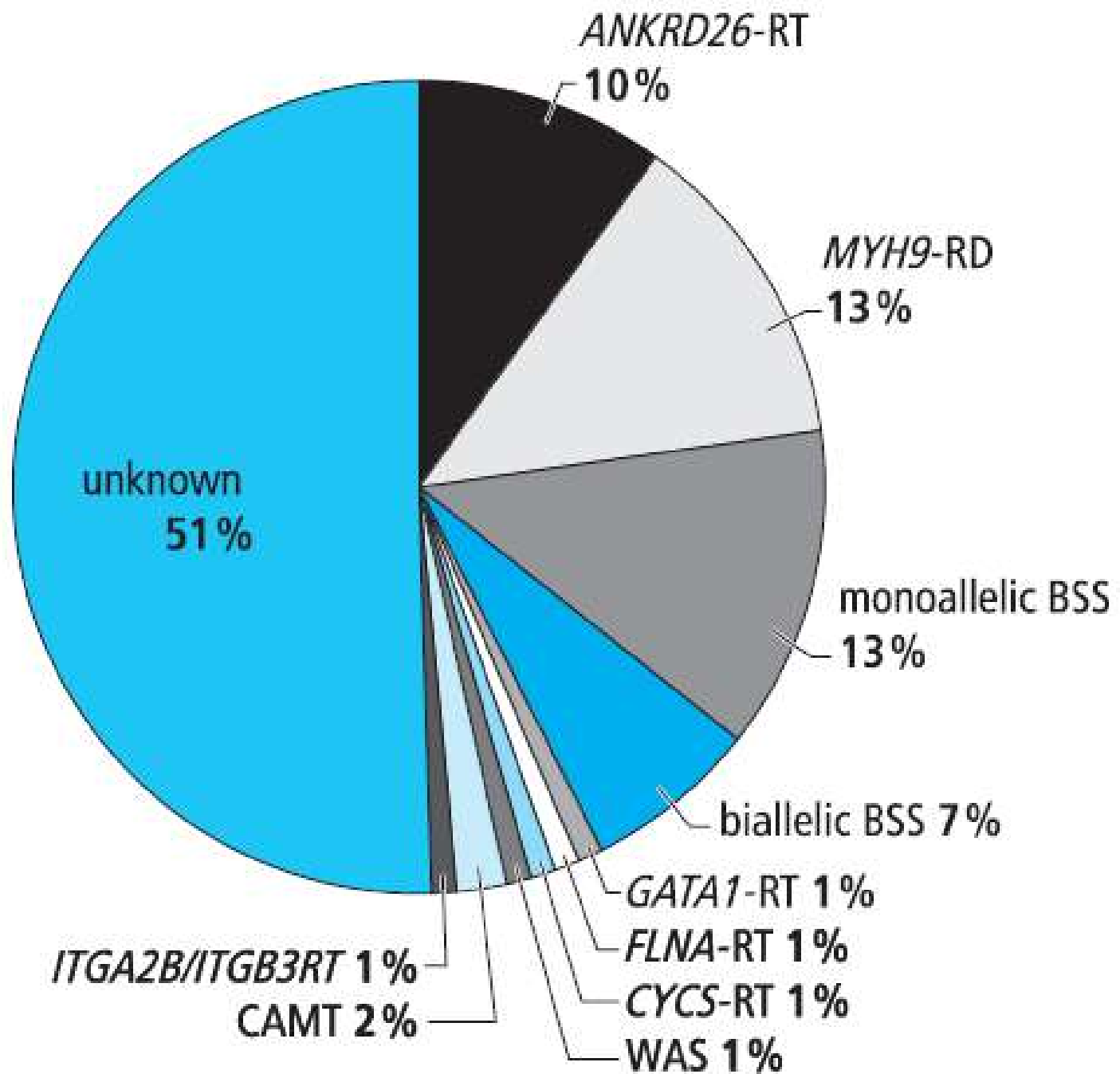
- **Minor response: n=3 (25%)**

n=1 3 weeks at 50 mg daily
n=2 +3 weeks at 75 mg daily

- **No response: n=1 (8%)**

EPIDEMIOLOGIE

- Prévalence reste inconnue : intérêt des registres nationaux : 2,7 pour 100 000?
- Répartition des pathologies différentes d'un pays à l'autre
exemple italien :
 - le désordre le plus fréquent est une forme de BSS, dominante, mutation Bolzano après vient le syndrome MYH9
- Prévalence sous estimée :
 - formes sévères souvent confondues avec d'autres désordres
 - formes modérées découvertes accidentellement



THROMBOPENIES CONSTITUTIONNELLES : Y PENSER SYSTEMATIQUEMENT

- même en l'absence d'ATCD familiaux
- même en cas de thrombopénie néonatale/de la grossesse transitoire dont on n'a pas retrouvé l'étiologie : pour éliminer pseudo VWD (VWD2B)
- Dans tous les cas de PTI avant de proposer une splénectomie/un traitement immunosuppresseur

THROMBOPENIES CONSTITUTIONNELLES : PRISE EN CHARGE

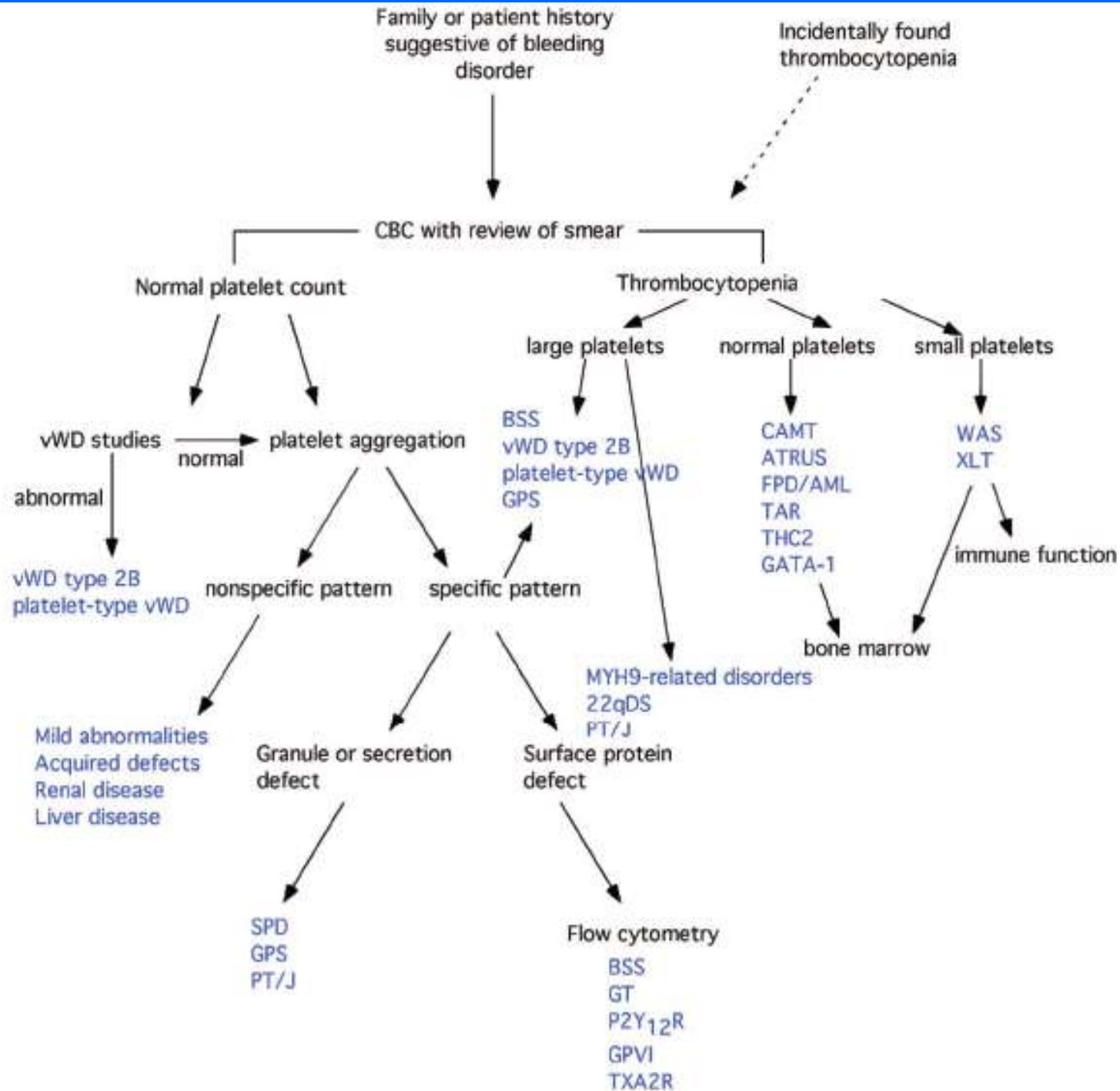
Les médecins doivent savoir évoquer ce diagnostic

Le diagnostic est établi avec l'aide du dispositif CRPP/CC

Données cliniques (syndromes)
Mode de transmission
Phénotype plaquettaire (morphologie, fonction)
Génotypage ciblé

←
Envisager HSCT

→
évaluer le risque de saignement



Différenciation mégacaryocytaire

CD34

CD41 (GpIIb/GpIIIa)

CD42 (GpV/GpIX/GpIb), PF4, vWF

GpVI

c-Myb

NF-E2

GATA-1, FOG-1, TAL-1, GABP α , GFI-1B, AML-1, FLI-1

Prolifération

Endomitose

Maturation

BFU-MK

CFU-MK

PMKB

Mégacaryoblaste

proMK

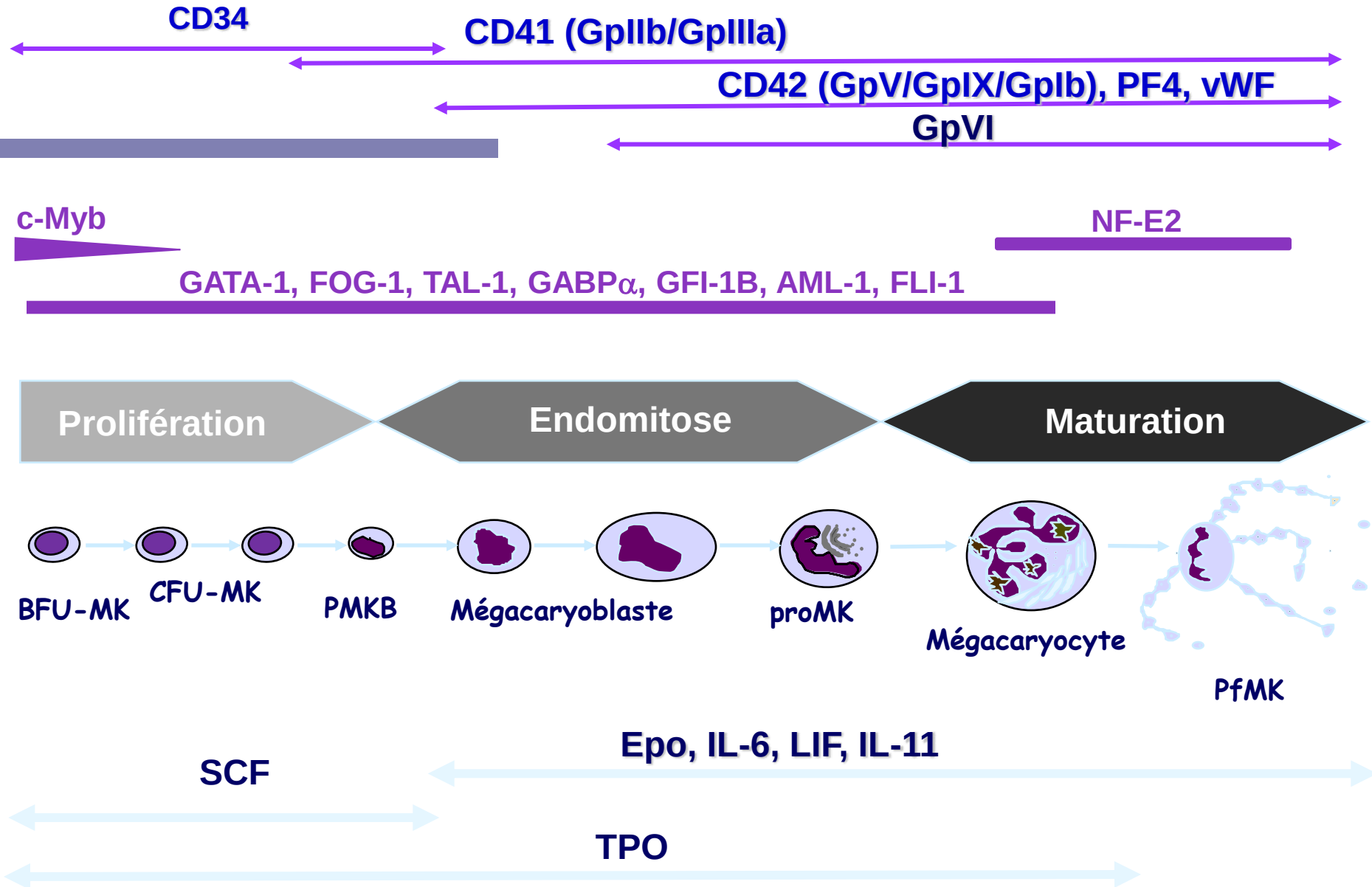
Mégacaryocyte

PfMK

SCF

Epo, IL-6, LIF, IL-11

TPO



THROMBOPENIES CONSTITUTIONNELLES

ANOMALIES EXTRA - HEMATOLOGIQUES

- TAR	del 1q21/RBM8/Y14	
- Amégacaryocytose congénitale et synostose radio-cubitale	HOXA11	7p14-15
- Jacobsen/Paris-Trousseau DiGeorge/cardio-vélo-facial	FL11 GPIBB	Del 11q23-24 Del 22q11-2
- Wiskott-Aldrich/XLT	WASP	
- Fechtner/Epstein	MYH9	

PATHOLOGIES SECRETOIRES

DEFICIT EN GRANULES DENSES (SYNDROME DU POOL VIDE δ)

- Transmission autosomale dominante (Caen et al, 1968 ; Weiss et al, 1979)
- 20% des cas de thrombopathies constitutionnelles
- Diminution du nombre de granules denses
Taux des constituants des granules denses très diminué : sérotonine, ADP (à l'état basal et après stimulation par divers inducteurs).

PATHOLOGIES SECRETOIRES

DEFICIT FONCTIONNEL DE SECRETION DES GRANULES DENSES

- Beaucoup plus fréquent
- Le nombre de granules denses est normal
- Le contenu en sérotonine est normal
- Défaut de libération de sérotonine après certains inducteurs (ADP, collagène)

Anomalie sur une des voies d'activation plaquettaire ? (G protéines → Phospholipases → protéine kinase → protéine impliquées dans les Phénomènes de sécrétion....?)

AUTOSOMAL DOMINANT FORM DUE TO MUTATION IN ANKRD26

CLINICAL DATA (Noris Blood 2011)

78 affected patients from 21 families

Spontaneous bleeding were usually absent or mild
36/78 patients had a bleeding score of 0, 17(1),17(2).

Surgery in most cases without platelet support
3/36 with bleeding

13 pregnancies: only 3 cases with bleeding

LINKED TO LEUKEMIA

8 patients from 5 families : AML or UAML,MDS

1 patient with LMC, 1 patient with LLC

ANKDR26 belongs to POTE family proteins

Upregulated in several cancers: is regulated by the tumor

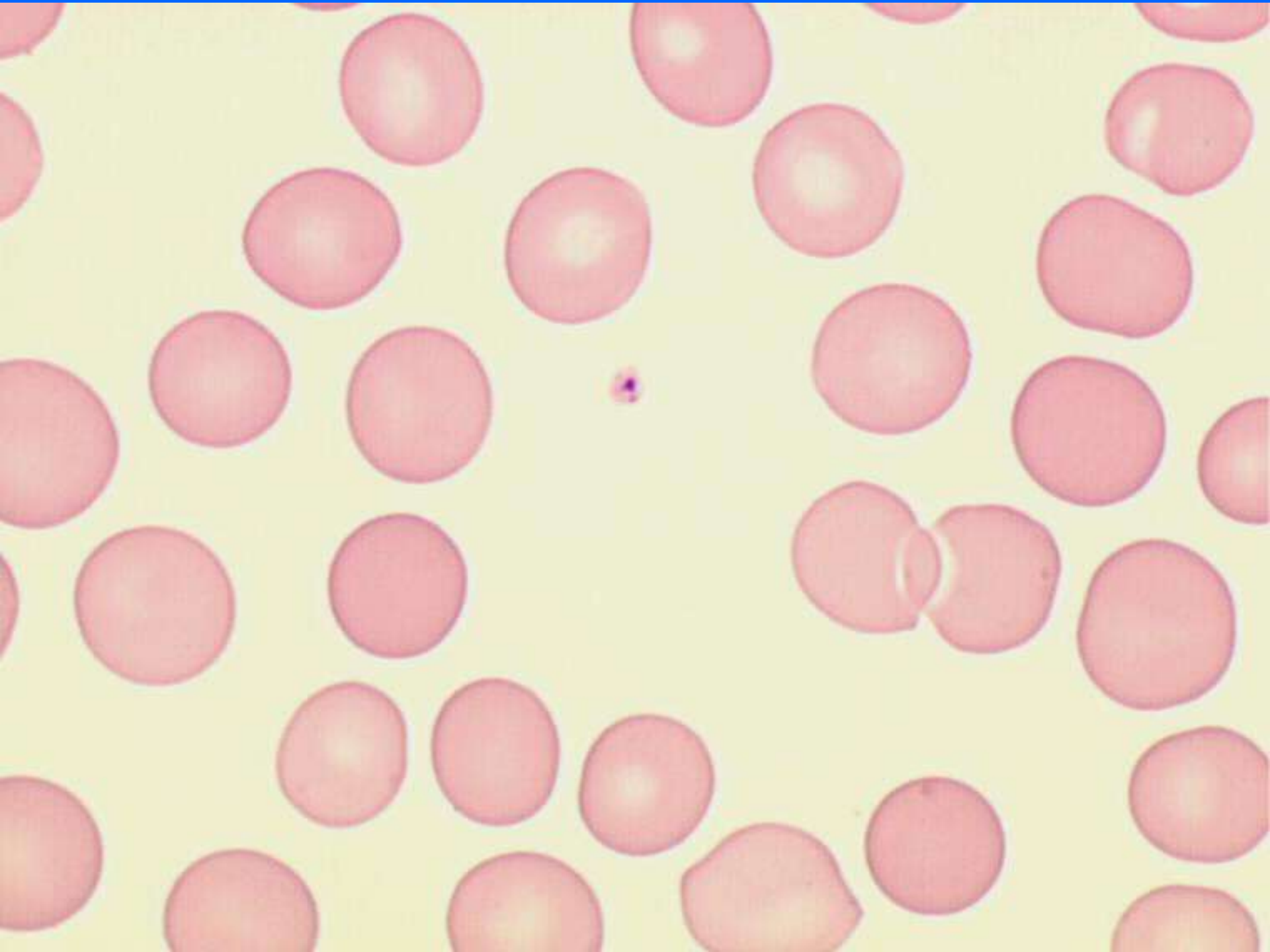
supresor RARES

ARC SYNDROME

- Autosomal récessif
- Manifestations cliniques diverses :
 - arthrogrypose
 - malformations cérébrales, cardiaques
 - ictère cholestatique
 - atteinte rénale : tubulopathie
- Tous les patients ne sont pas thrombopéniques
- Absence d'agrégation à l'ADP, au collagène
- Absence d'expression de la P sélectine après activation au TRAP
- Granules α totalement absents en ME
- Protéine VPS33B : interagit avec des protéines impliquées dans la fusion des membranes vésiculaires des granules.

THROMBOPENIE « PARIS-TROUSSEAU » ET SYNDROME DE JACOBSEN

- Nouveau-né à terme de parents non consanguins
- Léger retard staturo-pondéral et dysmorphie modérée-pondéral et dysmorphie modérée (front large, face plate, fentes palpébrales étroites, micrognathisme)
- Thrombopénie(102 G/L)
- VPM augmenté (12,9 fL)



MACROTHROMBOCYTOPENIES CONSTITUTIONNELLES DE TRANSMISSION AD

Macrocytaires sans gigantisme

PT/Jacobsen

Syndrome VCF

Non-syndromique porteur BS

vWD2B

plt-type

autres

GPS

gène

FLI1

GPIBB

GP1BA, GP1BB

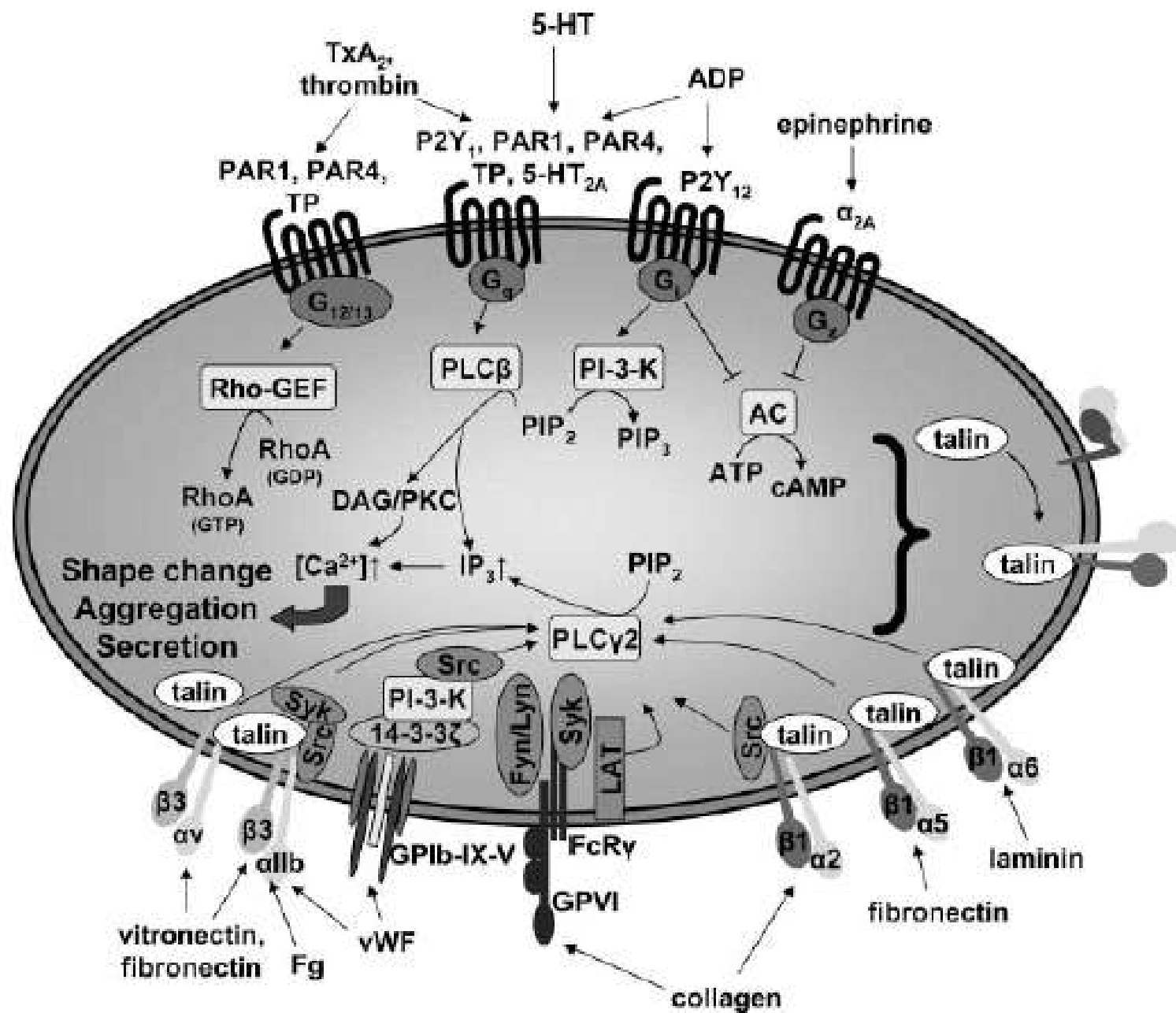
VWF

GP1BA

TUBB1

ITGB3

NBEAL



THROMBOPENIE CONFIRMEE ET SANS ELEMENT D'ORIENTATION DECISIF

- saignement (score)
- analyse soigneuse des plaquettes – hématologiste!
- éléments d'un syndrome?
- histoire reconstituée avec tous les hémogrammes antérieurs
- VIII-vWF
- ATCD familiaux avec hémogrammes