

PARTIE 10

Plaquettes

Tulasi Geevar

SUJETS ABORDÉS

- ✓ Numération plaquettaire
- ✓ Test de la fonction plaquettaire
- ✓ Test de la fonction plaquettaire par cytométrie en flux

Numération plaquettaire : le sang est mélangé à un diluant qui provoque l'hémolyse des globules rouges. Un hémocytomètre est rempli de liquide pour dilution et les plaquettes sont comptées au microscope, de préférence à l'aide d'un microscope à contraste de phase, si disponible.

Matériel et équipement :

- ✓ Hématimètre mince à fond plat (hémocytomètre à contraste de phase avec quadrillage de Neubauer)
- ✓ Microscope à contraste de phase muni d'un condenseur de phase à distance de travail élevée, si disponible ; sinon, un microscope optique ordinaire
- ✓ Pipette de 20 μ l
- ✓ Pipette graduée de 2 ml
- ✓ Tube de 12 \times 75 mm
- ✓ Agitateur mécanique

Réactif : liquide pour dilution : oxalate d'ammonium 1 % dans de l'eau distillée. Conserver au réfrigérateur et toujours filtrer juste avant utilisation.

Échantillon : si l'échantillon sanguin provient d'une piqûre au doigt, la ponction doit être propre et le sang doit s'écouler librement. Essuyer la première goutte de sang. Si l'échantillon provient de sang veineux, il doit être prélevé dans une seringue en plastique (ou en verre siliconé) sèche munie d'une aiguille courte de calibre 21 minimum. L'aiguille doit être retirée avant de mettre le sang dans un récipient en plastique contenant l'EDTA. Le sang et l'anticoagulant doivent être mélangés délicatement sans délai afin d'éviter la formation de mousse.

Méthode : pipeter 0,38 ml de liquide pour dilution dans un tube à essai. Remplir la pipette de 20 μ l jusqu'au repère et essuyer l'extérieur de la pipette. Expulser le contenu de la pipette dans le liquide pour dilution et nettoyer la pipette en tirant et expulsant le sang dans le tube à plusieurs reprises. Agiter pendant au moins 10 minutes à la main ou, de préférence, au moyen d'un agitateur mécanique. Remplir l'hémocytomètre, comme décrit ci-dessous. Placer la chambre dans une boîte de Pétri pendant 10 à 20 minutes pour permettre aux plaquettes de se déposer. Poser un morceau de coton ou de papier filtre humide au fond du récipient afin d'éviter l'évaporation. Au microscope, compter les plaquettes dans les grands carrés de 1 mm (= 0,1 μ l). Compter les plaquettes dans autant de carrés qu'il faut pour en compter au moins 100. Les plaquettes ont une apparence ronde ou ovale et leur structure granulaire interne et leur lustre violacé permettent de les distinguer des débris. Des images parasites des globules rouges qui ont été lysés par l'oxalate d'ammonium peuvent être aperçues en arrière-plan. Si le contraste de phase n'est pas disponible, un microscope optique ordinaire peut être utilisé, à condition que le condenseur soit baissé pour obtenir une lumière de faible intensité. Calculer le nombre de plaquettes par litre de sang selon la formule ci-dessous.

Hémocytomètre : la chambre de comptage de l'hémocytomètre, avec quadrillage Neubauer ou Neubauer amélioré, est construite de sorte que la distance entre la paroi inférieure du couvre-objet et la surface de la chambre soit de 0,1 mm. La surface de la chambre contient deux aires spécialement quadrillées avec les dimensions indiquées à la figure 21. L'aire de 1 mm² au centre comporte des frontières doubles ou triples. La partie centrale contient 25 carrés dans le quadrillage Neubauer amélioré et 16 carrés dans le quadrillage Neubauer. Chaque carré a une aire de 0,04 mm² (0,2 × 0,2 mm). Ces carrés sont, à leur tour, divisés en plus petits carrés mesurant chacun 0,0025 mm² (0,05 × 0,05 mm). Les quadrants à l'extérieur de la partie quadrillée sont chacun de 1 mm² et sont divisés en 16 carrés.

Calculs

La formule servant à calculer la numération cellulaire est la suivante :

$$\text{Numération (cellules/l)} = N \times D/A \times 10 \times 10^6$$

Où N = nombre total des cellules comptées

D = dilution

A = aire totale comptée (en mm²)

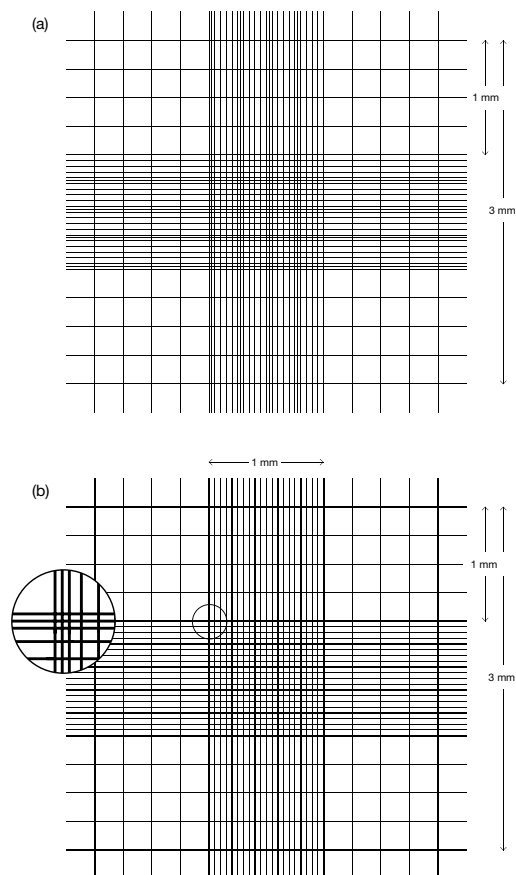
10 = facteur servant à calculer le volume en µl à partir de l'air (en mm²) et la profondeur de la chambre (0,1 mm)

10⁶ = facteur de conversion de numération/µl à numération/l

Sources d'erreur dans la numération cellulaire : lorsque du sang capillaire est utilisé, une goutte coulant librement doit être obtenue. Lorsque du sang anticoagulé est utilisé, le spécimen doit être mélangé avec soin en inversant le tube de sang au moins 20 fois avant d'en prélever un échantillon. Ne pas agiter le tube, car cela crée de la mousse, ce qui nuit à la précision du pipetage. Incliner le tube bien mélangé à un angle de 45° ou un peu plus et pipeter du rebord du tube, en suivant la même procédure que celle utilisée pour le sang capillaire. Les pipettes pour échantillons sanguins doivent être propres et sèches. La pipette doit être remplie rapidement et le sang prélevé de façon précise en utilisant un dispositif d'aspiration fixé à la pipette, la remplissant jusqu'au repère souhaité. Si la ligne est légèrement dépassée, l'excédent de sang peut être expulsé en touchant le bout de la pipette avec un morceau de papier filtre ou un mouchoir. Si la ligne est dépassée, une nouvelle pipette doit être utilisée. Aucune bulle d'air ne doit être présente dans la colonne de sang. Tout sang se trouvant sur l'extérieur de la pipette doit être essuyé (en prenant soin de ne pas extraire de sang du bout de la pipette) avant de l'introduire dans le liquide pour dilution. Une fois le contenu de la pipette versé dans le diluant, le liquide pour dilution doit ensuite être aspiré de façon régulière dans la pipette et ce à plusieurs reprises, afin d'assurer que tout le sang est expulsé dans le liquide. Le tube qui contient le sang dilué doit être agité doucement pendant au moins deux minutes à la main ou, de préférence, au moyen d'un agitateur mécanique. Une fois le tube agité, la chambre est remplie immédiatement au moyen d'une pipette Pasteur ou d'un tube capillaire. La chambre est remplie par capillarité, avec l'écoulement du liquide de la pipette ou du capillaire réglé de sorte qu'il remplisse la chambre de manière régulière et rapide. Elle doit être remplie complètement, mais le liquide ne doit pas déborder jusqu'aux cavités. Laisser les cellules se déposer dans l'aire de la numération pendant 10 à 20 minutes et procéder au dénombrement. La chambre de l'hémocytomètre et le couvre-objet doivent être propres et secs avant d'être utilisés. Des empreintes digitales ou un film huileux peuvent causer des erreurs importantes. Un nombre suffisant de cellules doit être compté pour réduire l'erreur due à la distribution aléatoire des cellules. En pratique, au moins 100 cellules doivent être comptées. En guise de vérification additionnelle concernant la distribution correcte des cellules dans la chambre, le nombre de cellules comptées dans chaque aire (p. ex. dans les grands carrés) ne devrait pas différer de plus de 10 %.

Contrôles : deux dilutions doivent être effectuées et la moyenne des deux dénombrements doit être calculée ; les deux dénombrements ne doivent pas différer de plus de 10 %.

Sources d'erreur dans la numération plaquettaire : le sang obtenu par ponction veineuse est préférable au sang capillaire, puisque les plaquettes adhèrent à la blessure et les dilutions successives obtenues d'une piqûre au doigt ne sont pas toujours reproductibles. Les erreurs générales du pipetage et de l'hémocytométrie sont décrites ci-dessus. De plus, une attention particulière doit être portée pour garantir la propreté irréprochable de la chambre de comptage, car des saletés et des débris peuvent être comptés comme des plaquettes. Laver la chambre à l'eau savonneuse, puis la rincer à l'eau distillée, la laisser sécher et l'essuyer avec un chiffon non pelucheux. S'assurer que le couvre-objet est propre avant de l'utiliser. La présence d'amas de plaquettes empêche des numérations fiables. Si l'échantillon contient des amas, un échantillon frais doit être prélevé. Le diluant à base d'oxalate d'ammonium doit être conservé au réfrigérateur et doit être jeté s'il y a des signes de contamination bactérienne. L'échantillon doit être soumis au comptage dans les trois heures suivant le prélèvement.



10.2 Test de la fonction plaquettaire

10.3 Rétraction du caillot

10.4 Measurement of Platelet Aggregation

Figure 21. Chambre de comptage de l'hémocytomètre (a) Neubauer et (b) Neubauer amélioré

Test de la fonction plaquettaire : le rôle principal des plaquettes est de contribuer à l'hémostase par la formation d'un bouchon plaquettaire au niveau des sites de lésion vasculaire. Lorsque le vaisseau sanguin est lésé et que les microfibrilles sous-endothéliales et les fibres de collagène sont exposées, les plaquettes se lient à la paroi du vaisseau, un processus appelé « adhésion plaquettaire ». En présence de forces de cisaillement élevées sur le site de lésion vasculaire, les plaquettes se lient indirectement aux vaisseaux à l'aide de multimères du FW de haut poids moléculaire. Le FW se lie au collagène exposé par l'intermédiaire de son domaine A3 et les plaquettes se lient au FW lié au collagène par l'intermédiaire de son récepteur GPIIb α . Les plaquettes peuvent en outre directement adhérer au collagène dans le sous-endothélium avec

les récepteurs glycoprotéine VI (GPVI) et intégrine $\alpha 2\beta 1$. Une fois que les plaquettes adhèrent à la paroi du vaisseau, elles subissent une série de changements : grâce à la réorganisation du cytosquelette plaquettaire, elles passent de petites structures en forme de disque à des sphères spiculées avec le développement des filopodes. Les phospholipides procoagulants anioniques, la phosphatidylsérine essentiellement, sont transloqués de l'autre côté de la membrane (« flip-flop ») à la surface externe des plaquettes, ce qui constitue une bonne plateforme pour la génération de thrombine. Les plaquettes libèrent le contenu des granules alpha (fibrinogène, FV, FW et facteurs de croissance entre autres) et des granules denses (ADP, ATP, calcium, sérotonine, etc.). Cela provoque une activation plaquettaire supplémentaire. La formation de thromboxane A_2 (TXA_2) se produit à partir de l'acide arachidonique via la phospholipase A2, la cyclo-oxygénase-1 (COX-1) et la TXA_2 synthase. Les agonistes plaquettaires (ADP, TXA_2 et thrombine) se lient à des récepteurs membranaires spécifiques et initient l'agrégation plaquettaire par activation du récepteur de l'intégrine, $\alpha 2\beta 3$ (GPIIb-IIIa), qui se lie au fibrinogène et/ou au FW pour former le bouchon plaquettaire. Les anomalies dans l'une de ces voies provoquant l'adhésion, l'activation, la dégranulation et l'agrégation plaquettaires peuvent provoquer une anomalie des plaquettes. Les dysfonctions plaquettaires comprennent à la fois des anomalies quantitatives (thrombocytopénie) ou qualitatives et peuvent être héréditaires ou acquises. Les symptômes hémorragiques sont principalement cutanéomuqueux, comme les ecchymoses, les saignements des gencives, la tendance aux ecchymoses, la ménorragie, l'hémorragie post-partum et les saignements gastro-intestinaux (méléna, hématoméso ou hématochézie). Ils peuvent être légers ou sévères en fonction de l'anomalie. Une liste des dysfonctions plaquettaires héréditaires avec les principales caractéristiques cliniques et biologiques qui y sont associées est présentée dans le tableau 33. La prévalence réelle des dysfonctions plaquettaires n'est pas connue. On pense qu'elles sont plus fréquentes qu'auparavant en raison du sous-diagnostic. Dans les régions du monde où la consanguinité est courante, les troubles autosomiques récessifs comme la thrombasthénie de Glanzmann et le syndrome de Bernard-Soulier ont une prévalence plus élevée. Alors que le diagnostic de la thrombasthénie de Glanzmann et du syndrome de Bernard-Soulier est relativement aisé en raison du motif typique de l'agrégométrie, le diagnostic de la plupart des autres dysfonctions plaquettaires héréditaires est lourd et nécessite des tests complexes. En cas de suspicion de dysfonctions plaquettaires héréditaires, il est important de recueillir des antécédents cliniques détaillés, y compris les antécédents personnels et familiaux. Le recours à un BAT validé comme celui de l'ISTH est fortement encouragé. Les antécédents doivent par ailleurs inclure les antécédents médicamenteux, la prise alimentaire récente pouvant éventuellement interférer avec la fonction plaquettaire et la présence d'autres caractéristiques (p. ex. eczéma, infections récurrentes, cas familiaux de myélodysplasie, LAM) et de caractéristiques syndromiques potentielles (perte auditive, malformations cardiaques, dysmorphisme facial ou osseux, albinisme, etc.) pouvant contribuer au diagnostic. Il convient que les examens de laboratoire préliminaires comprennent la numération formule sanguine, dont la numération plaquettaire, l'examen d'un film sanguin pour rechercher la morphologie des plaquettes et d'autres caractéristiques des cellules sanguines (voir ci-dessous), la détermination du temps de saignement (décrit à la section 11), les bilans d'hémostase secondaire (TP et TCA) et le dosage du fibrinogène pour exclure d'autres troubles de la coagulation. Il est recommandé d'effectuer des tests de dépistage de la mW (c'est-à-dire activité et antigène du FW) soit simultanément, soit avant un bilan plus approfondi des dysfonctions plaquettaires. Une mW, une mW de type 2B et une mW de type plaquettaire peuvent en outre être présentes avec une macrothrombocytopénie et doivent aussi être envisagées chez les patients dont le nombre de plaquettes est faible. Un autre test simple pouvant donner une indication sur la présence d'une anomalie de la fonction plaquettaire est la méthode de rétraction du caillot, décrite ci-dessous.

Rétraction du caillot : la rétraction du caillot dans le sang total coagulé peut donner une indication du nombre et de la fonction des plaquettes. Lorsque le caillot se rétracte, le sérum est exprimé et le degré de rétraction du caillot peut être mesuré.

Méthode : prélever 1 ml de sang dans un tube à essai en verre (75 × 10 mm) et le placer à 37 °C. Examiner le tube visuellement jusqu'à ce qu'un caillot solide soit présent. Laisser reposer à 37 °C pendant une heure supplémentaire. Mesurer la distance de la base du tube au ménisque. Retirer délicatement le caillot avec un bâtonnet mince en bois (p. ex. un cure-dents), en laissant s'écouler dans le tube le sérum présent dans

le caillot. Mesurer la distance de la base du tube au ménisque du sérum. Diviser la hauteur du ménisque du sérum par la hauteur totale initiale et multiplier par 100 pour obtenir un pourcentage.

Interprétation : normalement, plus de 40 % du sérum est retrouvé. Une diminution de l'extrusion du sérum est observée dans certaines déficiences plaquettaires, notamment dans la thrombasthénie de Glanzmann. Elle peut également être anormale dans les cas de thrombocytopénie sévère, de syndrome de Wiskott-Aldrich et de syndrome de Stormorken.

Remarques : les tubes et le cure-dents en bois doivent absolument être propres afin d'éviter que le caillot n'adhère au tube. Le caillot doit être retiré avec précaution et en douceur pour éviter de le presser et d'augmenter ainsi la libération de sérum.

Numération plaquettaire, morphologie et examen du frottis de sang périphérique : le test initial pour une suspicion de dysfonction plaquettaire doit inclure une numération formule sanguine ainsi qu'une évaluation du frottis de sang périphérique. Cela aide à détecter les anomalies du nombre, de la taille et de la morphologie des plaquettes, ce qui peut fournir des indices importants pour les analyses biologiques ultérieures. La numération plaquettaire peut être effectuée selon une méthode microscopique manuelle, par comptage automatisé dans des analyseurs d'hématologie et par marquage immunologique basé sur la cytométrie en flux. La numération plaquettaire doit être estimée sur le frottis périphérique pour confirmer la numération plaquettaire, en particulier en cas de macrothrombocytopénie ou d'anisocytose plaquettaire. Dans un frottis bien préparé et coloré, le nombre moyen de plaquettes est compté dans 10 champs à immersion dans l'huile (100×). Cette valeur doit être multipliée par 15 000 pour déterminer le nombre de plaquettes/μl. Il est important de vérifier le frottis pour évaluer les amas plaquettaires, ainsi que la taille, la morphologie et la granularité des plaquettes. Il convient d'exclure la pseudo-thrombocytopénie due à l'aggrégation plaquettaire dépendante de l'EDTA et au satellitisme (rosettes leucoplaquettaires). Il est important de garder à l'esprit que des amas plaquettaires peuvent également être observés dans la mW de type plaquettaire ou de type 2B et ne doivent pas être confondus avec des amas induits par l'EDTA. Dans la mW de type plaquettaire, le frottis peut aussi présenter de grosses plaquettes. Des plaquettes de taille anormale sont souvent caractéristiques de dysfonctions plaquettaires héréditaires (avec ou sans anomalie plaquettaire) comme indiqué ci-après :

- Petites plaquettes : syndrome de Wiskott-Aldrich, thrombocytopénie liée au chromosome X, déficit en ADAP
- Grosses plaquettes ou plaquettes géantes : syndrome de Bernard-Soulier (géantes), syndrome MYH9 (géantes), syndrome des plaquettes grises et syndromes de déficit en granules alpha, mW de type plaquettaire, thrombocytopénie liée à ITGA2B/ITGB3 (variante GT), filaminopathie, thrombocytopénie liée à SLFN14, anomalies de GATA1, syndrome vélocardiofacial
- Plaquettes normales : toutes les dysfonctions restantes

Le volume plaquettaire moyen (VPM) est un paramètre facilement disponible sur les analyseurs d'hématologie de numération plaquettaire reposant sur l'impédance et fournit une estimation de la taille des plaquettes. Les laboratoires doivent établir leurs propres plages de référence, car le VPM peut varier d'un instrument à l'autre. Il est facile de passer à côté des petites plaquettes dans la microscopie optique et un VPM réduit pourrait être un premier indice d'un éventuel syndrome de Wiskott-Aldrich. Divers facteurs peuvent affecter la mesure du VPM et interférer avec la numération plaquettaire basée sur l'impédance, comme les anomalies des globules rouges et des plaquettes. La présence de globules rouges microcytaires et fragmentés peut surestimer le nombre de plaquettes, tandis qu'il est possible de passer à côté de plaquettes grosses et/ou géantes, ce qui entraîne une sous-estimation de leur nombre. Dans ces scénarios, la numération plaquettaire et le VPM ne seront pas fiables. Il est très utile d'examiner simultanément l'histogramme plaquettaire qui peut identifier les anomalies de la taille des plaquettes et les éventuelles interférences/contamination. Dans la macrothrombocytopénie, la numération plaquettaire optique ou fluorescente donne une numération plus proche de la vérité. De grosses plaquettes pâles avec un cytoplasme gris bleuté avec absence ou nombre nettement réduit de granules azurophiles peuvent être

observées dans le syndrome des plaquettes grises en raison d'un déficit en granules alpha. Le syndrome de Paris-Trousseau présente des plaquettes grosses à géantes, certaines d'entre elles montrant des granules alpha agglomérés/fusionnés formant un gros granule aggloméré. L'anisocytose plaquettaire (c'est-à-dire la variation de la taille des plaquettes) et l'anisogranularité (soit la variation de leur granularité) avec la présence de plaquettes vides et pâles est une caractéristique classique de la dysfonction plaquettaire acquise avec éosinophilie (APDE). Cette dysfonction est une diathèse hémorragique transitoire associée à l'éosinophilie, se manifestant fréquemment chez les enfants d'Asie du Sud-Est, qui se résout lors du traitement de l'éosinophilie. Des anomalies morphologiques peuvent également être observées dans d'autres cellules sanguines. Présence d'inclusions de type corps de Döhle dans les neutrophiles dans le syndrome MYH9, de granules cytoplasmiques géants positifs à la peroxydase dans les neutrophiles et/ou d'autres leucocytes dans le syndrome de Chediak-Higashi, de corps de Howell-Jolly dans le syndrome de Stormorken et de dysérythropoïèse dans les mutations GATA-1.

Test de l'agrégation plaquettaire par transmission lumineuse : l'agrégométrie optique (LTA) est la norme pour les tests de la fonction plaquettaire. Elle a été décrite pour la première fois de manière indépendante par O'Brien et Born dans les années 1960. Le principe repose sur les variations de la densité optique du plasma riche en plaquettes (PRP) à mesure que les plaquettes sont activées et forment des agrégats. Le PRP, par rapport au PPP, est trouble en raison des plaquettes en suspension. Après l'ajout d'agonistes au PRP, les plaquettes forment des agrégats et se déposent, clarifiant ainsi le plasma et laissant passer plus de lumière. La variation de la transmission lumineuse est mesurée dans le temps par un agrégomètre et représentée sous forme de graphique. En comparant le schéma d'agrégation par rapport à chaque agoniste, il est possible d'émettre des hypothèses et de diagnostiquer le type de dysfonction plaquettaire. Ont été publiées un certain nombre d'excellentes revues et lignes directrices pour le test de la fonction plaquettaire et le diagnostic des dysfonctions plaquettaires héréditaires.

Précautions à prendre avant d'explorer l'agrégation plaquettaire (variables pré-analytiques) : il convient de collecter les échantillons de sang pour la LTA après une courte période de repos. Les sujets doivent s'abstenir de fumer pendant au moins 30 minutes et de prendre de la caféine au moins deux heures avant l'examen. Il y a lieu de consigner tous les médicaments, y compris les médicaments naturels/à base de plantes pris au cours des 10 derniers jours. Pour une liste des médicaments susceptibles d'interférer avec la fonction plaquettaire, voir les lignes directrices de la *British Society for Haematology* référencées ci-dessous. Les médicaments connus pour inhiber la fonction plaquettaire de manière réversible (AINS notamment) doivent être arrêtés au moins trois jours avant le prélèvement. Les médicaments connus pour inhiber la fonction plaquettaire de manière irréversible (aspirine, thiénoxydines, etc.) doivent être arrêtés au moins 10 jours avant le prélèvement, à moins que leur effet ne soit spécifiquement étudié. Les patients doivent idéalement être à jeun (une nuit de préférence). En l'absence de jeûne, éviter de prélever des échantillons après un repas riche en graisses. De nombreux autres composants alimentaires « normaux », notamment l'alcool, les oignons, l'ail, le poivre et le gingembre, peuvent également inhiber l'agrégation plaquettaire. Cela doit être pris en compte lors de l'évaluation des résultats. Le sang doit être prélevé avec un temps de pose du garrot minimal ou nul à l'aide d'une aiguille de calibre 21 au moins dans un anticoagulant tamponné au citrate de sodium 109 mM ou 129 mM. Les trois ou quatre premiers millilitres de sang prélevés doivent être jetés ou utilisés pour des tests autres que la LTA (p. ex. TP/TCA). Lorsque le prélèvement est difficile, les tubes insuffisamment remplis ne peuvent être utilisés que pour exclure les anomalies sévères de la fonction plaquettaire, tels que la thrombasthénie de Glanzmann ou le syndrome de Bernard-Soulier.

Préparation du plasma riche et pauvre en plaquettes : les échantillons de sang doivent être laissés au « repos » à température ambiante pendant au moins 15 minutes avant la centrifugation. La réfrigération des plaquettes pouvant provoquer une activation, les échantillons doivent toujours être maintenus à température ambiante. Le PRP est préparé par centrifugation à 200 g pendant 10 minutes à température ambiante (~21 °C), sans frein. En présence de très grosses plaquettes, dans le syndrome de Bernard-Soulier notamment, le PRP doit être préparé par sédimentation sanguine pendant 30 minutes. Le PRP est

soigneusement décanté, en évitant toute contamination par des globules rouges ou la couche leucocytaire (l'agrégation sera réduite en présence de l'un ou l'autre), dans un tube en polypropylène bouché maintenu en position verticale à 20-25 °C. Le PPP doit être préparé par centrifugation du sang total ou des tubes de sang dont le PRP a été retiré, à température ambiante à 1500 g pendant 15 minutes. Les échantillons grossièrement hémolysés doivent être rejetés. Si l'échantillon est lipémique, l'indiquer dans le rapport final. Il est nécessaire de vérifier la numération plaquettaire du PRP. Les résultats des examens de LTA pourraient être inexacts lorsque la numération plaquettaire de l'échantillon de PRP est inférieure à $150 \times 10^9/l$. Les échantillons à faible numération plaquettaire doivent être interprétés avec prudence, mais peuvent être analysés pour exclure les dysfonctions plaquettaires sévères, comme la thrombasthénie de Glanzmann, le syndrome de Bernard Soulier, la mW de type 2B et la mW de type plaquettaire. La numération plaquettaire des échantillons de PRP NE doit PAS être ajustée à une valeur normalisée avec le PPP autologue. La numération plaquettaire du PRP d'échantillons provenant de sujets ayant une numération plaquettaire normale ($200-600 \times 10^9/l$) n'affecte pas les résultats des examens de LTA. L'ajustement de la numération plaquettaire dans le PRP à l'aide du PPP autologue dans cette plage peut inhiber la réactivité plaquettaire. C'est probablement dû au fait que le PPP peut contenir des substances libérées par les plaquettes lors du traumatisme supplémentaire de la centrifugation à vitesse supérieure utilisée dans la préparation du PPP. L'incertitude demeure quant à la meilleure pratique à suivre lorsque la numération plaquettaire dans le PRP dépasse $600 \times 10^9/l$. Pour les numérations excessivement élevées ($> 1000 \times 10^9/l$), il peut être bénéfique d'ajuster la numération plaquettaire à un niveau plus approprié avec le PPP du patient.

Agents agrégants ou agonistes : il existe deux types d'agonistes, les agonistes faibles et les agonistes forts. Les agonistes faibles (par exemple l'ADP et l'épinéphrine) aux concentrations critiques montrent une vague d'agrégation primaire initiale due à l'effet directement induit par les agonistes, suivie d'une vague d'agrégation secondaire provoquée par la libération de granules plaquettaires et la synthèse de TXA_2 . Les agonistes forts (thrombine, collagène, TXA_2 , etc.) en revanche ne montrent qu'une seule courbe sans distinction entre l'agrégation primaire et secondaire, car ces agonistes induisent directement l'agrégation plaquettaire, la synthèse de TXA_2 et la libération des granules. Sont illustrées à la figure 22 les différentes phases de l'agrégation plaquettaire, qui ne se manifestent qu'avec les agonistes faibles.

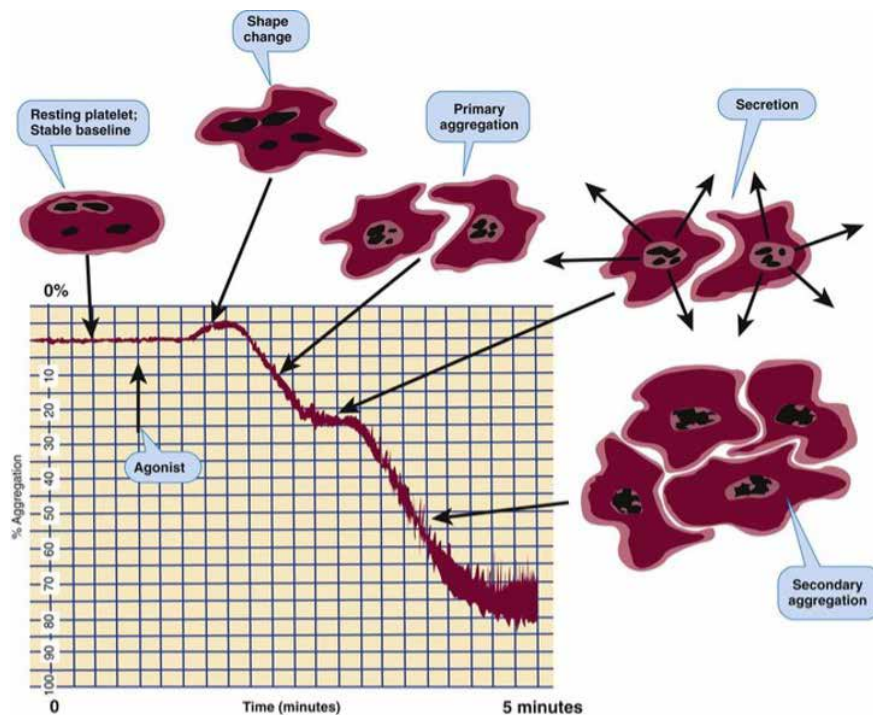


Figure 22. Image d'après *Rodak's Hematology: Clinical Principles and Applications*, 5^e édition

Tableau 33. Récapitulatif des agonistes recommandés ainsi que des concentrations pouvant être utilisées comme panel initial et panel étendu (d'après les lignes directrices de l'ISTH)

Agoniste	Panel initial et concentration	Panel étendu et concentration
ADP*	2 μ M	5 μ M, 10 μ M
Épinéphrine*	5 μ M	10 μ M
Collagène (HORM ou type 1 fibrillaire)	2 μ g/ml	
Acide arachidonique	1 mM	
Ristocétine (faible dose)	0,5-0,7 mg/ml	
Ristocétine (dose élevée)	1,2-1,5 mg/ml	
Peptide activant le récepteur de la thrombine (TRAP)*, PAR1	-	10 μ M
Thromboxane A2 mimétique U46619	-	1 μ M

* Il convient d'utiliser des concentrations plus élevées si des résultats anormaux sont observés avec la concentration initiale.

Adénosine-5-diphosphate (ADP) : une solution mère de 1 mM/l de sel disodique est préparée dans du TSO et stockée en petites quantités à -40 °C. Elle est stable pendant au moins trois mois. Une fois décongelée, la solution doit être utilisée dans les trois heures ou jetée. À des fins d'utilisation, d'autres dilutions sont préparées dans le TSO. Le schéma de réponse à l'ADP dépend de sa concentration finale. À 2 μ mol/l, des vagues primaires et secondaires clairement définies peuvent être observées : la première représente l'effet direct induit par les agonistes et la seconde est due à la libération d'ADP endogène et à la génération de TXA₂, qui agrège les plaquettes. En dessous de 2 μ mol/l, progressivement, de moins en moins de sujets normaux présentent une réponse secondaire, et généralement la vague primaire s'inverse à mesure de la dégradation enzymatique de l'ADP. Au-delà de 3 μ mol/l, la phase primaire est habituellement si intense que la distinction d'avec la phase secondaire est masquée. L'ADP induit un changement de forme des plaquettes qui passent d'un disque à une sphère spiculée. Cela provoque initialement une légère hausse de la densité optique de la suspension plaquettaire, ce qui ne peut être observé que si l'agrégation primaire est altérée.

Adrénaline (épinéphrine) : une solution mère de 1 mM/l de sel de bitartrate est préparée dans le TSO. Elle doit être stockée et utilisée comme pour l'ADP. Avec l'adrénaline, les concentrations utilisées et les schémas de réponse sont similaires à ceux de l'ADP. Cependant, en l'absence de vague secondaire, la vague primaire ne s'inverse pas et n'est jamais si intense que la vague secondaire se trouve masquée.

Collagène : une suspension très stable de fibrilles de collagène de tendon équin (1 mg/ml), (Hormon-Chemie, Munich, Allemagne) est largement utilisée. Un certain nombre d'autres réactifs conviennent également. Cette suspension est conservée à 4 °C et doit être bien mélangée avant d'être diluée dans la solution tampon qui l'accompagne dans l'emballage. Elle doit être utilisée à une concentration finale de 0,5-2,0 μ g/ml dans le PRP ; les suspensions diluées sont stables pendant une semaine à 4 °C. Il n'y a pas de première vague avec le collagène. La réponse est habituellement définie par le délai entre l'adjonction de l'agoniste et le début de l'agrégation (temps de latence) et par l'intensité de celle-ci. Une légère augmentation de la densité optique causée par le changement de forme précède l'agrégation. Du collagène provenant de plusieurs sources différentes est utilisé. Le type de collagène et l'espèce servant à la préparation (p. ex. équine ou bovine) peuvent avoir une influence importante sur les résultats obtenus. En effet, une gamme de concentrations variant selon un facteur > 100 est nécessaire selon l'origine du matériau. Il est donc important de choisir une source appropriée et d'établir pour ce réactif un intervalle de référence local qui doit être réévalué s'il y a un changement de réactif. Voir Jennings *et al.* (2008) pour une revue de la littérature.

Ristocétine : à une concentration finale de ristocétine de 1 mg/ml dans le PRP, la première et la deuxième vague peuvent généralement être observées de manière distincte, mais à une concentration supérieure, l'effet est si intense que les deux vagues convergent. La première vague est une mesure de la quantité de facteur Willebrand présent dans le plasma, tandis que la seconde vague est due à la libération de substances endogènes.

Acide arachidonique : l'arachidonate de sodium (pureté de 99 %) est dissous dans le TSO à une concentration de 10 mM/l. De petites aliquotes sont placées dans des flacons en verre foncé remplis d'azote afin d'empêcher l'oxydation, puis bien bouchés et conservés à une température inférieure à -20 °C. L'agrégation est généralement monophasique et précédée par une courte phase de latence.

Réactifs : quelques exemples de concentrations et de dilutions de réactifs sont présentés ci-dessous.

Remarque : ces concentrations sont valables si une partie de réactif est ajoutée à neuf parties de PRP. Les dilutions peuvent être faites dans de l'eau distillée ou une solution saline, ou conformément aux instructions du fabricant.

✓ ADP (solution mère 1000 µM)

Préparer une dilution 1/10 = 100 µM (soit 0,1 ml solution 1000 µM + 0,9 ml TSO). Préparer à partir de celle-ci deux solutions de travail de concentrations différentes : 20 µM (soit 0,2 ml 100 µM + 0,8 ml TSO), concentration finale dans le PRP de 2-50 µM (soit 0,5 ml 100 µM + 0,5 ml TSO), concentration finale dans le PRP de 5 µM. Dans les cas où l'hyperagrégabilité est à tester, des concentrations plus faibles peuvent être nécessaires (p. ex. 10 µM, 5 µM).

- ✓ *Adrénaline (épinéphrine)* : diluer comme l'ADP pour obtenir une solution de travail de 50 µM. Cela donnera une concentration finale dans le PRP de 5 µM.
- ✓ *Collagène* : bien mélanger et diluer dans du TSO/autres diluants : 1/500 (soit 0,1 ml solution mère + 4,9 ml TSO) = 20 µg/ml, concentration finale dans le PRP de 2 µg/ml
- ✓ *Ristocétine* : celle-ci peut être utilisée avec deux concentrations différentes, selon les résultats obtenus : une dose normale de ristocétine à 15 mg/ml ou 12,5 mg/ml et une faible dose de ristocétine à 7,5 mg/ml ou 5 mg/ml. Cela donnera une concentration finale dans le PRP de 1,5 mg/ml ou 1,25 mg/ml, et une faible dose de ristocétine de 0,75 mg/ml ou 0,5 mg/ml respectivement selon la concentration utilisée.

Méthode/procédure : les examens de LTA doivent être terminés dans les quatre heures suivant le prélèvement sanguin. En raison de la réfractarité des plaquettes à l'agrégation après la centrifugation, les échantillons de PRP doivent être laissés à température ambiante pendant au moins 15 minutes avant le test. Le PRP doit être conservé dans des tubes pleins et bien bouchés jusqu'au moment du test. Avant de commencer, porter les réactifs/agonistes à température ambiante. Préparer des dilutions fraîches de réactifs si nécessaire. Mettre l'agrégomètre et l'ordinateur/enregistreur sous tension et attendre que la température de l'agrégomètre atteigne 37 °C. Régler la vitesse d'agitation sur 1000 tr/min, sauf indication contraire du fabricant de l'agrégomètre. Mettre 450 µl de PRP dans une cuvette en verre qui contient un bras magnétique pour agiter le mélange. Le nombre de cuvettes utilisées dépend du nombre d'agonistes à tester. Préchauffer les cuvettes de PRP dans les puits d'incubation entourant le bloc chauffant pendant deux à cinq minutes. Pipeter 500 µl de PPP dans une autre cuvette en verre sans bras de mélange et placer dans le puits de référence à blanc correspondant. Le PRP et le PPP autologue doivent être utilisés pour régler la transmission de la lumière à 0 % et à 100 % dans l'agrégomètre. Attendre une minute avant d'ajouter l'agoniste. Pipeter 50 µl d'agoniste au fond de la cuvette de PRP sans produire de bulles. Le volume d'agoniste ajouté pour la LTA doit être reproductible et ne doit jamais dépasser 10 % du volume total de l'échantillon. Un échantillon témoin connu doit être analysé parallèlement à l'échantillon du patient. Il convient de surveiller l'agrégation plaquettaire pendant au moins trois minutes après l'ajout

d'un agoniste, et jusqu'à 10 minutes pour les agonistes qui n'atteignent pas l'agrégation maximale d'ici trois à cinq minutes. Répéter la procédure pour chaque agoniste.

Remarques : si une réponse anormale est observée avec le panel initial d'agonistes, un panel étendu supplémentaire (tableau 35) peut être ajouté avec la libération d'ATP par lumi-agrégométrie (voir ci-dessous). Des concentrations plus élevées d'agonistes (par exemple ADP, épinéphrine) doivent être utilisées si une réponse anormale est observée à la concentration initiale. Si aucune réponse d'agrégation n'est observée avec l'acide arachidonique, ajouter l'agoniste, analogue du récepteur du TXA₂ (TRA), U46619. Dans les anomalies de la synthèse du TXA₂ (déficit en COX/TXA₂ synthase) ou sous l'effet de l'aspirine, une réponse normale est observée avec le TRA. En cas d'anomalie du récepteur du TXA₂, des réponses anormales sont observées à la fois avec l'acide arachidonique et le TRA. Une réponse anormale isolée avec l'épinéphrine est observable chez certains sujets sains. Ce peut toutefois être la seule caractéristique du syndrome plaquettaire du Québec dans la LTA. Lors de l'étude de l'agrégation plaquettaire dans le cadre d'une évaluation d'hyperagrégabilité, l'ADP et l'adrénaline sont utilisées à des concentrations plus faibles pour obtenir une courbe dose-réponse. Les concentrations utilisées sont : 2 µM, 1 µM, 0,5 µM et 0,1 µM (concentration finale dans le PRP). Une agrégation spontanée est également réalisée avant de tester les agonistes restants. Une hyperagrégation des plaquettes avec 0,5 mg/ml de ristocétine indique une éventuelle mW de type 2B ou une mW de type plaquettaire. Rechercher une éventuelle agrégation spontanée en surveillant le PRP dans les mêmes conditions d'agitation sur l'agrégomètre, sans ajouter d'agoniste pour stimuler l'agrégation. Réaliser des études de mélange pour différencier les deux sous-types. Cela peut être fait selon deux méthodes. Procédure de base : mélanger des volumes égaux de plasma du patient et des plaquettes normales (soit 225 µl de PPP du patient + 225 µl de PRP de contrôle). Ce mélange est ensuite dosé avec de la ristocétine à 0,5 mg/ml. En cas d'agglutination, cela suggère une mW de type 2B. Une absence d'agglutination peut être due à une mW de type plaquettaire. Il est important de noter qu'une absence de réponse peut également être due à la dilution supplémentaire du PRP.

Procédure alternative : laver les plaquettes du patient et de contrôle à trois reprises avec du PBS-EDTA dans des tubes à centrifugation de 15 ml (faible vitesse de centrifugation pour un culot plaquettaire). Remettre délicatement en suspension les plaquettes du patient dans le plasma normal et les plaquettes normales dans le plasma du patient. Ajuster la numération plaquettaire à 400 × 10⁶ de culot plaquettaire. (À noter que le PBS-EDTA est préparé en ajoutant de l'EDTA disodique 9 mM au PBS et en ajustant le pH à 7,0. Le PBS utilisé contient du NaCl 135 mM, du KCl 2,6 mM, du Na₂HPO₄ 8 mM et du KH₂PO₄ 1,5 mM, avec un pH de 7,4.) Procéder à un nouveau test avec de la ristocétine à 0,5 mg/ml. Les réactions doivent correspondre à l'un des modèles ci-dessous.

Tableau 34. Interprétation de la mW de type 2B et de la mW de type plaquettaire

Tube 1	Plaquettes du patient lavées + PPP té-moin	Pas d'agglutination	Agglutination
Tube 2	Plaquettes lavées témoin + PPP du pa-tient	Agglutination	Pas d'agglutination
	INTERPRÉTATION	mW de type 2B	mW de type plaquettaire

Les lignes directrices de 2021 sur la mW sont en faveur du recours à des tests génétiques ciblés pour le diagnostic de la mW de type 2B et de type plaquettaire. Cela peut toutefois ne pas être possible pour de nombreux laboratoires en raison de contraintes de coûts. L'étude de mélange RIPA est maintenue comme l'un des tests de l'algorithme de diagnostic selon l'ISTH.

Interprétation et communication des résultats : le tracé de l'agrégation plaquettaire doit être évalué en fonction de la présence d'un changement de forme, de la durée de la phase de latence (certains agonistes comme le collagène peuvent avoir une phase de latence plus longue), de l'agrégation maximale (méthode la plus pratique et la plus couramment utilisée pour communiquer les résultats), de la pente de l'agrégation (indique le taux d'agrégation), de l'examen visuel des tracés de l'agrégation (c'est-à-dire la désagrégation, la présence d'une vague secondaire, particulièrement distincte pour l'épinéphrine et les

faibles doses d'ADP). La désagrégation avec l'ADP est particulièrement frappante dans les anomalies de P2Y12 héréditaires. Du PRP préparé de la même manière issu d'une personne donneuse normale saine doit être traité et analysé en même temps que celui du patient comme moyen de vérification des réactifs. Cela est particulièrement important en cas de résultats anormaux chez les patients, car certains agonistes sont labiles, en particulier une fois dilués aux concentrations de travail. Les laboratoires cliniques doivent établir des intervalles de référence appropriés pour la concentration de chaque agoniste. Les résultats des sujets normaux sains testés en même temps que les patients peuvent être utilisés pour établir des plages de référence. Il convient de faire preuve d'une grande prudence lors de l'interprétation des schémas d'agrégation plaquettaire. Un certain nombre de facteurs techniques peuvent influencer les résultats. Garder à l'esprit qu'il existe des différences importantes entre l'agrégation déterminée par la néphélométrie et celle qui intervient dans le corps. Néanmoins, il est possible d'obtenir des informations diagnostiques utiles, et quelques exemples de schémas d'agrégation sont présentés au tableau 35.

Tableau 35. Résultats de l'agrégation plaquettaire dans diverses dysfonctions

Dysfonction	ADP	Collagène	Ristocétine 1,25 mg/ml	Ristocétine 0,5 mg/ml	Acide arachido- nique	Adrénaline
mW de type 1 et 2A	N	N	A/R**	A	N	N
mW de type 2B	N	N	N	H	N	N
Syndrome de Bernard-Soulier	N	N	A	A	N	N
Thrombasthénie de Glanz-mann	A	A	N	A	A	A
Maladie du pool vide	P/N	R/N	N	A	R/N	P/N
Anomalie de la cyclooxygénase*	R/N	R	N	A	R/A	R/N

N = normal ; A = absence ; R = réduction ; H = hausse (réponse accrue) ; P = vague primaire uniquement

* Ou effet de l'aspirine

** Peut être normal dans la mW de type 1 mineure

Examen plus approfondi de la fonction plaquettaire : si un schéma d'agrégation anormal est observé chez une personne, il est conseillé de répéter l'évaluation au moins une fois de plus pour vérifier la cohérence de l'anomalie. En présence d'une agrégation anormale, un examen plus approfondi peut être utile. Il s'agit notamment de la mesure de la teneur en nucléotides et de leur libération au cours de l'agrégation plaquettaire. La quantification des glycoprotéines membranaires peut être effectuée pour le diagnostic sans équivoque du syndrome de Bernard-Soulier et de la thrombasthénie de Glanzmann (voir ci-dessous).

Libération d'ATP par lumi-agrégométrie : la lumi-agrégométrie est la méthode la plus largement utilisée pour évaluer la fonction de libération des granules denses des plaquettes. Elle présente l'avantage de pouvoir mesurer en même temps l'agrégation plaquettaire par transmission lumineuse et la libération de l'ATP des granules denses. Elle repose sur le principe de la réaction luciférine-luciférase. Lorsque les plaquettes sont activées, les granules denses libèrent l'ATP et l'ADP qu'elles ont stockées. L'ATP libérée réagit avec la luciférine en présence de luciférase pour donner une luminescence qui peut être quantifiée, par rapport à un étalon d'ATP. La sécrétion d'ATP peut être défectueuse à la fois dans le déficit en granules denses et dans les anomalies de la sécrétion primaire. La distinction entre les deux entités nécessite des analyses supplémentaires, comme la mesure de la teneur totale en ATP-ADP par la bioluminescence, l'étude de la sécrétion de sérotonine marquée au carbone 14 (¹⁴C-5-HT), le test à la mépacrine par la cytométrie en flux (voir ci-dessous) ou l'évaluation des granules denses par microscopie électronique à transmission (MET) sur préparation d'échantillons entiers.

Tableau 36. Facteurs techniques influençant la fonction plaquettaire

Anticoagulant	1/10 ^e du volume de citrate trisodique.
Temps	Commencer les tests 30 minutes après la préparation du PRP. Effectuer les explorations dans les quatre heures suivant le prélèvement de sang.
Centrifugation	Doit être suffisante pour éliminer les globules rouges et blancs, mais pas les grosses plaquettes. Doit être effectuée à température ambiante, et non à 4 °C. Les grosses plaquettes peuvent être séparées par sédimentation.
Numération plaquettaire	Les numérations < 100 × 10 ⁹ /l provoquent des réponses lentes et faibles. Les numérations > 1000 × 10 ⁹ /l peuvent montrer une réponse moindre.
pH	Un pH < 7,7 inhibe l'agrégation. Un pH > 8,0 améliore l'agrégation.
Vitesse de mélange	Une vitesse < 800 tr/min montre une agrégation réduite. Une vitesse > 1200 tr/min brise les amas plaquettaires.
Hématocrite	> 55 % : progressivement moins d'agrégation, en particulier inhibition de la deuxième phase en raison de l'augmentation de la concentration de citrate.
Température	< 35 °C : diminution de l'agrégation avec des doses régulières de tous les agonistes, mais réponse accrue à de faibles doses d'ADP.
Lipémie	L'augmentation des chylomicrons entraîne une diminution de l'agrégation.
Cuvette sale	Peut provoquer une agrégation spontanée apparente.
Pas de bras de mélange	Pas de réponse à l'ajout d'agent agrégant.
Bulles d'air	Oscillations rapides et importantes du stylo avant l'agrégation. Également dues à une faible numération plaquettaire.

Différences entre les conditions *in vivo* et *in vitro* pour l'agrégation plaquettaire : avec les tests sanguins *in vitro*, le sang est anticoagulé, les globules rouges et blancs sont retirés, les composants vasculaires ne sont pas impliqués, la coagulation n'est pas impliquée, la population plaquettaire est sélectionnée, les produits d'activation et de libération des plaquettes sont conservés, les réactifs utilisés ne sont pas physiologiques dans leur composition et leur dose, les plaquettes sont instables hors du corps et les médicaments peuvent présenter des effets plus ou moins marqués qu'*in vivo*.

Test de la fonction plaquettaire par cytométrie en flux : la cytométrie en flux peut fournir des informations utiles pour le diagnostic et la classification des dysfonctions plaquettaires. Elle peut servir à l'analyse des récepteurs glycoprotéines, aux tests de la fonction plaquettaire après stimulation des agonistes, à la mesure de la fonction procoagulante des plaquettes (liaison à l'annexine V entre autres) et à l'évaluation de la teneur en granules alpha et denses. Elle présente essentiellement l'avantage de nécessiter de petits volumes d'échantillons, de pouvoir être pratiquée sur du sang total et de ne pas se limiter à la thrombocytopénie. Cela devient particulièrement utile chez les sujets pédiatriques et thrombocytopéniques.

Analyse des glycoprotéines de surface des plaquettes par cytométrie en flux : la thrombasthénie de Glanzmann, qui se caractérise par une $\alpha IIb\beta 3$ anormale ou absente, peut être détectée avec des anticorps monoclonaux GPIIb (CD41) ou CDIIIa (CD61) marqués par fluorescence, et le syndrome de Bernard-Soulier, caractérisé par une GP1b/V/IX anormale ou absente, peut être diagnostiqué à l'aide d'anticorps dirigés contre les anticorps GPIb (CD42b) ou GPIX (CD42a). De plus, d'autres dysfonctions plaquettaires héréditaires moins courantes affectant les récepteurs $\alpha 2\beta 1$ (CD49/CD29), GPIV (CD36) ou GPVI peuvent également être diagnostiqués à l'aide des anticorps respectifs. L'analyse des molécules de surface peut être effectuée jusqu'à 24 heures après le prélèvement. Le test d'activation plaquettaire par cytométrie en flux (PACT) permet de mesurer simultanément un large éventail de marqueurs d'activation de la fonction plaquettaire, permettant ainsi une analyse plus complète des différentes voies impliquées. Les plaquettes peuvent être identifiées à l'aide de leurs propriétés caractéristiques de diffusion frontale (*forward scatter*,

FSC) ou de diffusion latérale (*side scatter*, SSC) du faisceau incident et, de préférence, par l'ajout d'un récepteur glycoprotéine spécifique (par exemple CD41). Certains des marqueurs d'activation couramment utilisés sont : PAC-1 (anticorps monoclonal qui se lie spécifiquement à la forme de conformation activée de $\alpha\text{IIb}\beta 3$), CD62P ou P-sélectine (l'un des contenus des granules α , peut être utilisé comme marqueur de la libération de ces granules) et CD63 (peut être utilisé comme marqueur de la libération des granules δ). Le test peut être effectué à l'aide d'une combinaison d'agonistes pour cibler des voies différentes, telles que l'ADP, le TRAP et la convulxine. L'expression des marqueurs d'activation sur les plaquettes est mesurée (en MFI et/ou %) à l'inclusion (avant l'ajout de l'agoniste) et après la stimulation par l'agoniste. Une expression réduite après stimulation par l'agoniste suggère un défaut/anomalie de la voie spécifique. Il est important de simultanément analyser un échantillon témoin similaire à la LTA.

Liaison du FW induite par la ristocétine par cytométrie en flux : la fonction du récepteur GP1b/V/IX et du FW peut également être évaluée par cytométrie en flux en mesurant l'expression du FW sur les plaquettes après l'ajout de doses normales et faibles de ristocétine. Il est possible d'utiliser un anticorps monoclonal contre le FW. Les études de mélange avec le plasma du patient et le plasma témoin, et inversement, à de faibles doses de ristocétine peut différencier le type 2B et le type plaquettaire.

Dosage de l'absorption et de la libération de la mépacrine par cytométrie en flux : il peut aussi servir à évaluer les anomalies des granules δ . La mépacrine est un dérivé fluorescent de l'acridine qui se lie aux nucléotides de l'adénosine avec une grande affinité. Après son incubation avec les plaquettes à 37 °C pendant 30 minutes, elle est absorbée de manière sélective par les granules denses, ce qui peut être mesuré par l'augmentation de la fluorescence dans la cytométrie en flux. La fonction de libération peut par ailleurs être évaluée en mesurant la fluorescence de la mépacrine après une stimulation par l'agoniste (p. ex. convulxine ou TRAP). La fluorescence est mesurée à l'inclusion (plaquettes uniquement), après l'ajout de mépacrine (plaquettes + mépacrine) et après l'ajout d'agoniste (plaquettes + mépacrine + agoniste). Les ratios d'absorption et de libération peuvent être calculés. Une diminution de l'absorption et de la libération est observée en cas de déficit en granules denses, tandis qu'une absorption normale avec une libération réduite est observée en cas d'anomalies de sécrétion.

Activité procoagulante plaquettaire : lors de la stimulation simultanée des plaquettes avec la convulxine et la thrombine, un sous-ensemble de plaquettes exprime la phosphatidylsérine, une phospholipide anionique, à la surface des plaquettes activées. Il est possible d'évaluer cela à l'aide de l'annexine V ou de la lactadhérine marquée par fluorescence qui se lie à la phosphatidylsérine. La translocation des phospholipides procoagulants facilite l'assemblage des facteurs de coagulation pour la génération de thrombine à la surface des plaquettes. La cytométrie en flux permet de détecter une activité procoagulante altérée (syndrome de Scott) ou augmentée (syndrome de Stormoken) et ses syndromes associés.

Tableau 37a. Récapitulatif des dysfonctions plaquettaires héréditaires avec caractéristiques cliniques et biologiques

Dysfonction	Anomalie génétique	Numération plaquettaire et morphologie/ autres caractéristiques du PBS	LTA	Caractéristiques biologiques supplémentaires	Clinique supplémentaire (± caractéristiques syndromiques)
Défauts des récepteurs glycoprotéines					
Thrombasthénie de Glanz-mann	ITGA2B, ITGB3	Normal	Absence de réponse à tous les agonistes, à l'exception de l'agglutination à la ristocétine	La cytométrie en flux identifie un déficit en GPIIb/ GPIIIa.	Saignement autosomique récessif, sévère
Thrombocytopénie liée à ITGA2B/ ITGB3	ITGA2B, ITGB3	Macrothrombocytopénie avec anisocytose	Absence/ altération de la réponse à tous les agonistes, à l'exception de l'agglutination à la ristocétine	Réduction de l'expression de GPIIb/GPIIIa. Anomalie de l'expression de PAC1	Saignement autosomique dominant, léger à modéré
Syndrome de Bernard-Soulier	GP1BA, GP1BB, GP9	Macrothrombocytopénie	Absence de réponse d'agglutination à la ristocétine	La cytométrie en flux identifie le déficit en Gp1b/ IX/V.	Saignement autosomique récessif, modéré à sévère
Syndrome de Di-George/ vélocardiofacial/de délétion 22q11.2	del22q11.2	Numération plaquettaire normale/légèrement réduite avec de grosses plaquettes	Agrégation normale/variable (réponse réduite à la ristocétine dans ~30 % des cas)	Réduction de l'expression de GP1b/IX/V par cytométrie en flux	Fente palatine, malformations cardiaques, faciès anormal, troubles du développement, immunodéficience, saignements légers à importants
mW de type plaquettaire	Mutation gain de fonction dans GP1BA	Macrothrombocytopénie, amas de plaquettes	Agglutination accrue avec faible concentration de la ristocétine	Réduction des multimères du FW de HPM (réduction de l'activité du FW)	Saignement autosomique dominant, léger à modéré
Défauts des récepteurs du collagène	GP6 ND	Normal	Réponse d'agrégation réduite isolée au collagène	Déficit en GPVI ou en $\alpha 2\beta 1$ par cytométrie en flux	Saignement autosomique récessif, léger

Tableau 37b. Récapitulatif des dysfonctions plaquettaires héréditaires avec caractéristiques cliniques et biologiques

Dysfonction	Anomalie génétique	Numération plaquettaire et morphologie/autres caractéristiques du PBS	LTA	Caractéristiques biologiques supplémentaires	Clinique supplémentaire (± caractéristiques syndromiques)
Anomalies des récepteurs couplés aux protéines G					
Défaut du récepteur TXA ² (TP)	TBXA2R	Normal	Agrégation anormale avec les analogues AA et TXA ₂ (U46619)		Diathèse hémorragique autosomique récessive, légère
Anomalie du récepteur ADP (P2Y12)	P2Y12	Normal	Réponse d'agrégation à l'ADP nettement altérée (vague primaire uniquement) ; une réponse réduite avec d'autres agonistes peut également être observée.	Diminution de l'expression des marqueurs d'activation sur stimulation par l'ADP	Saignement autosomique récessif, léger après un traumatisme/ une intervention chirurgicale
Anomalies des granules plaquettaires (isolées/syndromiques)					
Anomalies des granules α					
Syndrome des plaquettes grises	NBEAL2	Macrothrombocytopénie ; grosses plaquettes avec cytoplasme gris bleuté et absence de granules azurophiles	Anomalies légères et variables ; peut être normal	Absence/ diminution des granules α par microscopie électronique (ME) Expression moindre/absente de la P-sélectine par cytométrie en flux/ELISA	Saignement autosomique récessif, léger, myélofibrose progressive avec splénomégalie
Syndrome d'arthrogrypose - insuffisance rénale - cholestase (ARC)	VPS33B, VIPAS39	Grosses plaquettes grises	Anomalies légères et variables ; peut être normal	Absence/ diminution des granules α par ME P-sélectine réduite chez certains et normale chez d'autres	Contractures de flexion, hypotonie, jaunisse cholestatique, acidose tubulaire rénale, retard de croissance staturo-pondérale, ichtyose, infection, diathèse hémorragique légère
Syndrome de Paris-Trousseau/ Jacobsen	del11q23, dont FL1	Grosses plaquettes, peu avec des granules α fusionnés	Variable	Granules α géants fusionnés en ME, dysmégacaryopoïèse	Diathèse hémorragique légère, retard de développement, malformations cardiaques, anomalies craniofaciales

Tableau 37c. Récapitulatif des dysfonctions plaquettaires héréditaires avec caractéristiques cliniques et biologiques

Dysfonction	Anomalie génétique	Numération plaquettaire et morphologie/autres caractéristiques du PBS	LTA	Caractéristiques biolo-giques supplémentaires	Clinique supplémentaire (± caractéristiques syndro-miques)
Défauts des granules denses					
Déficit isolé en granules denses/maladie du pool vide		Normal	Variable. May be decreased to several agonists: ADP, collagen and epinephrine, or normal	Diminution de la libération d'ATP par lumi-agrégométrie Réduction de l'ADP plaquettaire et augmentation du rapport ATP/ADP Réduction/absence de granules denses par MET sur préparation d'échantillons entiers CD63 réduit et diminution de l'absorption et de la libération de mépacrine par cytométrie en flux	
Syndrome de Hermansky-Pudlak	HPS1, AP3B1 (HPS2), HPS3, HPS4, HPS5, HPS6, DNTBP1 (HPS7), BLOC1S3 (HPS8), et BLOC1S6 (HPS9)	Normal	Variable		Albinisme oculocutané, immunodéficiences, diathèse hémorragique légère, fibrose pulmonaire, colite granulomateuse et neutropénie
Thrombocytopénie liée à SLFN14	SLFN14	Macrothrombocytopénie	Variable		
Syndrome de Chediak-Higashi	LYST	Plaquettes gris pâle par microscopie optique	Variable		Albinisme oculocutané variable, infections récurrentes menaçant le pronostic vital, diathèse hémorragique légère
Dysfonctions combinées granules α/ granules δ	ND	Plaquettes gris pâle par microscopie optique	Variable	Absence/réduction des granules α et δ sur la MET, et autres caractéristiques observées dans les dysfonctions des granules α et denses	Diathèse hémorragique légère à modérée
Granule secretion defect or primary secretion defect	ND	Normal	Variable	Diminution de la libération d'ATP par lumi-agrégométrie ; absorption normale et libération moindre de la mépacrine par cytométrie en flux Réduction de l'expression de CD63 par cytométrie en flux ; granules α et denses normaux par ME	Diathèse hémorragique légère à modérée

Tableau 37d. Récapitulatif des dysfonctions plaquettaires héréditaires avec caractéristiques cliniques et biologiques

Dysfonction	Anomalie génétique	Numération plaquettaire et morphologie/autres caractéristiques du PBS	LTA	Caractéristiques biologiques supplémentaires	Clinique supplémentaire (± caractéristiques syndromiques)
Défauts des facteurs de transcription					
Thrombopénie familiale avec prédisposition à la leucémie aigüe myéloïde	RUNX1	Thrombocytopénie	Agrégation anormale en réponse à plusieurs agonistes	Sécrétion des granules δ défectueuse	Prédisposition au développement d'une SMD ou d'une LAM
Anomalie des granules δ liée à FLI1	FLI1	Thrombocytopénie	Moindre agrégation au collagène et au TRAP	Sécrétion des granules δ défectueuse	
Anomalie de GATA1	GATA1	Macrothrombocytopénie	Moindre agrégation au collagène et à la ristocétine	Réduction de la teneur en granules α et de leur libération	
Anomalie liée à GF11B	GF11B	Macrothrombocytopénie, dysérythroïèse	Normal	Diminution de la libération des granules α	Autosomique dominant
Anomalies de la protéine de transduction du signal					
Anomalie de la phospholipase cytosolique A2/ déficit en cyclo-oxygénase/déficit en TXA ₂ synthase	PLA2G4A/ND/TBXAS1	Normal	Absence de réponse avec AA et réponse normale avec TXA ₂		
Anomalie Ca/DAG-GEFI	RASGRP2	Normal	Réponse nettement réduite/absente à l'ADP, à l'épinéphrine, réponse réduite/normale au collagène, au TRAP et à la ristocétine	Expression de GPIIb/ GPIIIa normale Anomalie de l'expression de PAC1	Saignement autosomique récessif, sévère
Déficit en adhésion leucocytaire-III	FERMT3	Leucocytose	Structure semblable à GT	Expression de GPIIb/ GPIIIa normale Anomalie de l'expression de PAC1	Infection bactérienne autosomique récessive, sévère, mauvaise cicatrisation des plaies, saignement sévère

Tableau 37e. Récapitulatif des dysfonctions plaquettaires héréditaires avec caractéristiques cliniques et biologiques

Dysfonction	Anomalie génétique	Numération plaquettaire et morphologie/autres caractéristiques du PBS	LTA	Caractéristiques biologiques supplémentaires	Clinique supplémentaire (± caractéristiques syndromiques)
Défauts des protéines du cytosquelette					
Syndrome de Wiskott-Aldrich (WAS)/ thrombocytopénie liée au chromosome X	WAS	Microthrombocytopénie		Diminution des sous-ensembles de lymphocytes T, fonction des cellules tueuses naturelles, diminution des granules α et δ par MET	WAS : transmission liée au chromosome X ; eczéma, déficit immunitaire, tumeurs malignes et auto-immunité
Syndrome MYH9 (anciennement connu sous le nom de syndromes de Sebastian, May-Hegglin, Fechtner et Epstein)	MYH9	Macrothrombocytopénie, inclusion de type corps de Döhle dans les neutrophiles	Normal		Autosomal dominant; variable association with sensorineural hearing loss, cataracts, and nephritis
Déficit en ADAP	FYB	Microthrombocytopénie		Expression accrue de P-sélectine et de PAC-1, mais altération de l'expression lors de l'activation	
Anomalies des phospholipides membranaires					
Syndrome de Scott	TMEM16F	Normal	Normal	Réduction de la liaison à l'annexine par cytométrie en flux	Autosomique récessif
Syndrome de Stormorken	STIM1, ORAI1	Anémie (corps de Howell-Jolly)	Normal	Liaison à l'annexine V améliorée et expression de PAC-1 défectueuse	Dysmorphisme facial, ichtyose, myopathie
Augmentation de l'activité fibrinolytique plaquettaire					
Syndrome plaquettaire du Québec	PLAU (duplication)	Thrombocytopénie variable	Réponse anormale à l'épinéphrine	Excès d'activateur plasminogène de l'urokinase plaquettaire provoquant la protéolyse des protéines des granules α et une fibrinolyse	Saignement autosomique dominant, à apparition tardive après une intervention chirurgicale/un traumatisme, pas de réponse aux antifibrinolytiques mais une réponse aux antifibrinolytiques

Références

- Bolton-Maggs PH, Chalmers EA, Collins PW, Harrison P, Kitchen S, Liesner RJ et al. A review of inherited platelet disorders with guidelines for their management on behalf of the UKHCDO. *Br J Haematol* 2006; 135(5): 603-633.
- Bourguignon A, Tasneem S, Hayward CP. Screening and diagnosis of inherited platelet disorders. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2022; 59(6): 405-444.
- The British Society for Haematology Haemostasis and Thrombosis Task Force. Guidelines on platelet function testing. *J Clin Pathol* 1988; 41(12): 1322-1330.
- Cai H, Mullier F, Frotscher B, Briquel ME, Toussaint M, Massin F, Lecompte T, Latger-Cannard V. Usefulness of flow cytometric mepacrine uptake/release combined with CD63 assay in diagnosis of patients with suspected platelet dense granule disorder. *Semin Thromb Hemost* 2016; 42(3): 282-291.
- Cattaneo M, Cerletti C, Harrison P, Hayward CP, Kenny D, Nugent D 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.
- Cattaneo M, Hayward CP, Moffat KA, Pugliano MT, Liu Y, Michelson AD. 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* 2009; 7(6): 1029.
- 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.
- Chanarin I (ed). *Laboratory Haematology: An Account of Laboratory Techniques*. Edinburgh: Churchill Livingstone; 1989.
- Dave RG, Geevar T, Chellaiya GK, Mammen JJ, Vijayan R, Samuel A, Gowri M, Nair SC. Stability and utility of flow cytometric platelet activation tests: A modality to bridge the gap between diagnostic demand and supply. *Platelets* 2022; 33(7): 1043-1051.
- Franchini M, Montagnana M, Lippi G. Clinical, laboratory and therapeutic aspects of platelet-type von Willebrand disease. *Int J Lab Hematol* 2008; 30(2): 91-94.
- Frontroth JP, Favaloro EJ. Ristocetin-induced platelet aggregation (RIPA) and RIPA mixing studies. *Methods Mol Biol* 2017; 1646: 473-494.
- Gomez K, Anderson J, Baker P, Biss T, Jennings I, Lowe G, Platton S. Clinical and laboratory diagnosis of heritable platelet disorders in adults and children: A British Society for Haematology guideline. *Br J Haematol* 2021; 195(1): 46-72.
- Gresele P. Diagnosis of inherited platelet function disorders: Guidance from the SSC of the ISTH. *J Thromb Haemost* 2015; 13(2): 314-322.
- Gresele P, Bury L, Mezzasoma AM, Falcinelli E. Platelet function assays in diagnosis: An update. *Expert Rev Hematol* 2019; 12(1): 29-46.
- Gresele P, Falcinelli E, Bury L. Laboratory diagnosis of clinically relevant platelet function disorders. *Int J Lab Hematol* 2018; 40 Suppl 1: 34-45.
- Jennings I, Woods TA, Kitchen S, Walker ID. Platelet function testing: practice among UK National External Quality Assessment Scheme for Blood Coagulation participants, 2006. *J Clin Pathol* 2008; 61(8): 950-954.
- Le Blanc J, Mullier F, Vayne C, Lordkipanidzé M. Advances in platelet function testing-light transmission aggregometry and beyond. *J Clin Med* 2020; 9(8): 2636.
- Linnemann B, Schwonberg J, Mani H, Prochnow S, Lindhoff-Last E. Standardization of light transmittance aggregometry for monitoring antiplatelet therapy: An adjustment for platelet count is not necessary. *J Thromb Haemost* 2008; 6(4): 677-683.
- Rand ML, Reddy EC, Israels SJ. Laboratory diagnosis of inherited platelet function disorders. *Transfus Apher Sci* 2018; 57(4): 485-493.
- van Asten I, Schutgens REG, Baaij M, Zandstra J, Roest M, Pasterkamp G, Huisman A, Korporaal SJA, Urbanus RT. Validation of flow cytometric analysis of platelet function in patients with a suspected platelet function defect. *J Thromb Haemost* 2018; 16(4): 689-698.