

10-12
MAI
2023



Palais des Congrès

SAINT-MALO

Le Grand Large

Masterclass

Quel futur pour l'étude des fonctions plaquettaires dans nos laboratoires de diagnostic et de recherche ?



Dominique Lasne

Biologiste, PH

Hôpital Necker, Paris

INSERM U1176, Le Kremlin-Bicêtre



Alexandre Kauskot

CRCN INSERM

INSERM U1176, Le Kremlin-Bicêtre

Université Paris Saclay



Dominique Baruch

DR émérite

Labo BMBI

UTC, Compiègne

Liens d'intérêt

- Dominique Lasne : pas de liens d'intérêt en rapport avec le sujet
- Alexandre Kauskot : pas de liens d'intérêt en rapport avec le sujet
- Dominique Baruch : pas de liens d'intérêt en rapport avec le sujet

Diagnostic/recherche : des problématiques communes

Labo de diagnostic



Labo de recherche



Objectifs

Diagnostic des thrombopathies

Etude de mécanismes des fonctions plaquettaires (fondamentale, pharmacologie ...)

Origine des plaquettes

Plaquettes de patients

Plaquettes de sujets sains, souris & patients

Matrice

PRP
Sang total

Plaquettes lavées
PRP

Méthodes

Agrégométrie optique
Cytométrie en flux
Biochimie, Granules, MET, NGS....

Difficultés

Suivi des performance de la méthode,
problématique des témoins, valeurs de références

Etude des fonctions plaquettaires dans les laboratoires de diagnostic

Dominique Lasne

Etude des fonctions plaquettaires dans les laboratoires de diagnostic

- Principales indications :
 - Diagnostic des thrombopathies constitutionnelles
 - Surveillance des traitements antiplaquettaires (non recommandé en routine)

Un gold standard qui fête ses 70 ans !

1963

- Etude des fonctions plaquettaires par agrégométrie optique en plasma riche en plaquettes « *Gold Standard* »

J Physiol. (1963), 168, pp. 178–195
With 14 text-figures
Printed in Great Britain

THE AGGREGATION OF BLOOD PLATELETS

BY G. V. R. BORN AND M. J. CROSS

*From the Department of Pharmacology, Royal College of Surgeons of
England, Lincoln's Inn Fields, London, W.C. 2*

This paper describes a method by which the aggregation of platelets may be followed quantitatively,

Evolutions depuis 1963

- « Semi-automatisation » avec des analyseurs dédiés / diminution des volumes de prélèvements
- Certains réactifs marqués CE
- Etudes et enquêtes de pratiques qui révèlent une grande variabilité **intra et inter-laboratoire**

*Nancy S. Nicholson et al. 1998; Am Heart J.
Moffat KA, et al. 2005; Thomb. Haemost.
Hayward CP, Moffat KA. 2012; Am J Hematol.*

Propositions/recommandations pour harmoniser les pratiques par divers organismes et sociétés savantes

H58-A

ISBN 1-56238-683-2

ISSN 0273-3099

Volume 28 Number 31

Platelet Function Testing by Aggregometry; Approved Guideline

Douglas J. Christie, PhD, FAHA, Chairholder *et al.*

Development of North American Consensus Guidelines for Medical Laboratories That Perform and Interpret Platelet Function Testing Using Light Transmission Aggregometry

Catherine P.M. Hayward, MD, PhD,¹⁻³ Karen A. Moffat, ART, FCSMLS(D),¹⁻³ Anne Raby, ART,⁴ Sara Israels, MD,^{1,5} Elizabeth Plumhoff, MLS(ASCP),^{1,6} Greg Flynn, MD, FRCPC,⁴ and James L. Zehnder, MD^{1,7} *Am J Clin Pathol* 2010;134:955-963

Guidelines for the laboratory investigation of heritable disorders of platelet function

Paul Harrison,¹ Ian Mackie,² Andrew Mumford,³ Carol Briggs,⁴ Ri Liesner,⁵ Mark Winter,⁶ Sam Machin² and British Committee for Standards in Haematology
British Journal of Haematology, 2011; 155, 30–44

Recommendations for the standardization of light transmission aggregometry: a consensus of the working party from the platelet physiology subcommittee of SSC/ISTH

M. CATTANEO,* C. CERLETTI,† P. HARRISON,‡ C. P. M. HAYWARD,§ D. KENNY,¶ D. NUGENT,** P. NURDEN,†† A. K. RAO,‡‡ A. H. SCHMAIER,§§ S. P. WATSON,¶¶ F. LUSSANA,* M. T. PUGLIANO* and A. D. MICHELSON*** *J.Throm.Haemost.* 2013; 11:183-9

Diagnosis of inherited platelet function disorders: guidance from the SSC of the ISTH *J Thromb Haemost* 2015; 13: 314–22.

P. GRESELE, FOR THE SUBCOMMITTEE ON PLATELET PHYSIOLOGY¹
Division of Internal and Cardiovascular Medicine, Department of Medicine, University of Perugia, Perugia, Italy

Correspondence

Quality assurance and tests of platelet function
Jennings I *et al.* *Br J of Haematol*, 2018, 181, 537–566



- Etude PAPS (Alessi et al.) : Multi-center evaluation of light transmission platelet aggregation reagents: Communication from the ISTH SSC Subcommittee on Platelet Physiology (*en révision, J. Thromb. Haemost.*)



- Agrégométrie optique pour l'exploration des fonctions plaquettaires : synthèse des recommandations et propositions pour l'accréditation des examens (en cours)
→ 28 propositions consensuelles pour l'harmonisation des pratiques en France

Rédaction : A. Stepanian, S. Voisin, D.Lasne et le groupe qualité du GFHT

Relecture : MC Alessi, A. Bauters, A. Dericquebourg, M. Fiore, M Fouassier, MF Hurtaud, T Lecompte, E de Maistre, Fr Mullier, P Nguyen, C Poupard, C Vayne.

Vote des propositions : tous les membres du GFHT concernés

28 propositions consensuelles pour l'harmonisation des pratiques en France

1/ Approche globale, maîtrise des risques et habilitation du personnel

Données quantitatives et/ou qualitative

Analyse de risque

Formation et habilitation des techniciens et biologistes

2/ Conditions pré-analytiques

Revue de prescription, interférences médicamenteuses

Prélèvement, transport, conservation

Préparation et stabilité du plasma riche en plaquettes

3/ Les critères de qualité en agrégométrie optique

Calibration des canaux de mesure / contrôle de la matrice

Pas de contrôles de qualité interne : minimiser le recours aux témoins car législation contraignante (L.1221-4 et L.1221-3 CSP)

28 propositions consensuelles pour l'harmonisation des pratiques en France

4/ Etude des performances

Utilisation de « fond de tube »

Qualification de l'agrégomètre

Comparaison entre 2 équipements

Interférences : rejet des prélèvements hémolysés

Gestion des lots de réactifs

5/ post-analytique

- Expression des résultats : analyse quantitative ou qualitative

- Valeurs de référence : au minimum échantillons provenant de 20 « témoins sains » pour vérifier les valeurs de référence et prélevés dans le respect de la réglementation

- Interprétation des résultats contextualisée

28 propositions consensuelles pour l'harmonisation des pratiques en France

Soumises au vote en Février/Mars 2023.

Les propositions sont retenues si elles remportent l'adhésion des votants (plus de 70% d'avis favorables et moins de 20% d'avis défavorables. Les autres propositions seront révisées.

Une seule proposition rejetée concernant **la concentration du PRP (< 600 G/L)** reformulée et resoumise au vote

Trois autres propositions retenues mais avec commentaires pertinents ont aussi été nuancées/reformulées (frein de la centrifugeuse, définition du témoin sain, contrôle de la matrice)

Argumentaire complémentaire sur le CV à 15%

Document à paraître en Juin 2023

Problèmes non résolus de l'agrégométrie optique

- Absence de contrôle de qualité interne (CIQ) et externe (EEQ)
- Recours aux « témoins » contraignant (conformité avec les articles L.1221-4 et L.1221-3 CSP)
- Mauvaise sensibilité à certaines thrombopathies
- Non recommandé chez l'enfant de moins de 1 an
- Positionnement par rapport aux méthodes en sang total, à la cytométrie en flux, plaquettes lavées ?

Etude des fonctions plaquettaires dans les laboratoires de recherche

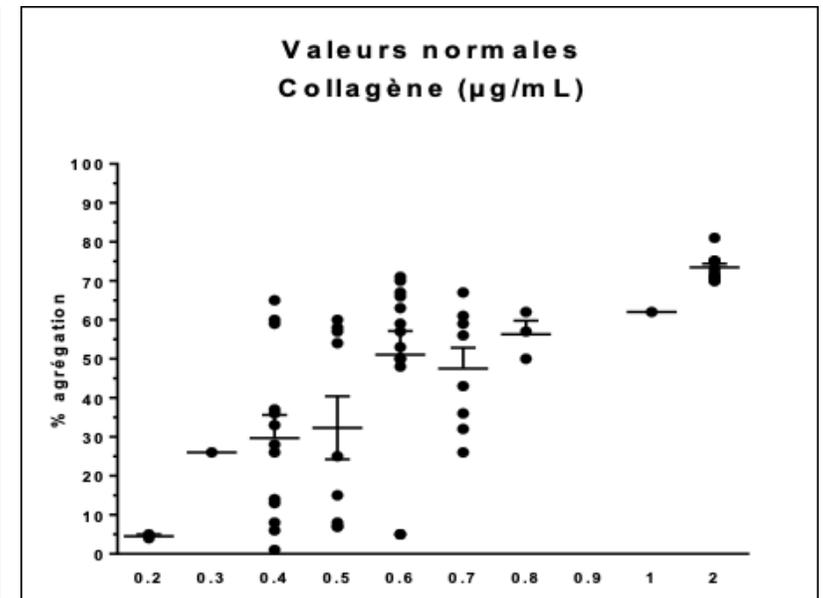
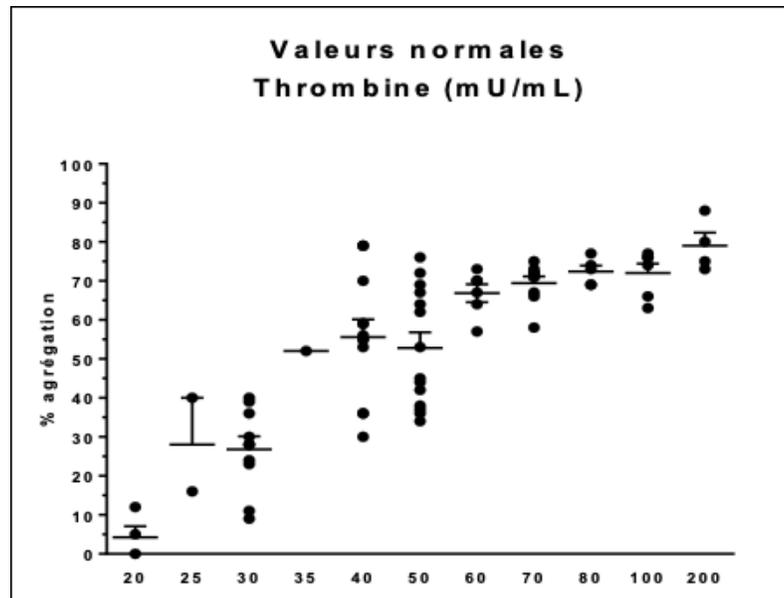
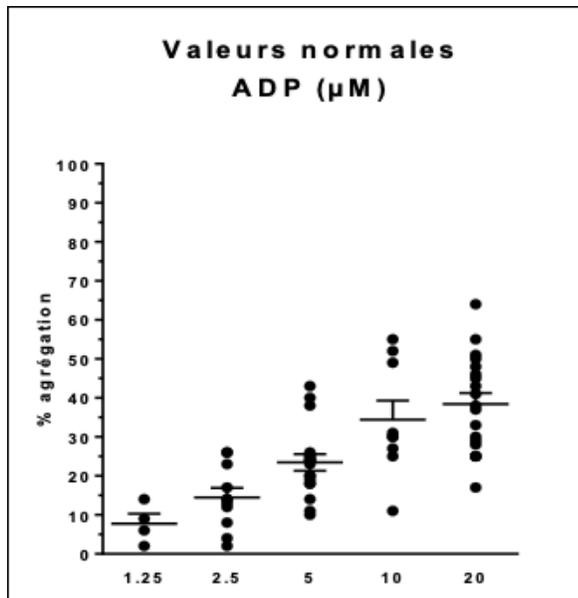
Alexandre Kauskot

Labo de recherche : les objectifs

- Quels sont les objectifs dans les laboratoires de recherche ?
 - Etude de mécanismes : signalisation, récepteurs...
 - Etude de molécules, inhibiteurs...
 - Etude translationnelle : plaquettes patients
- Matrice : plaquettes lavées
Tyrode-HEPES

La variabilité des réponses en plaquettes lavées

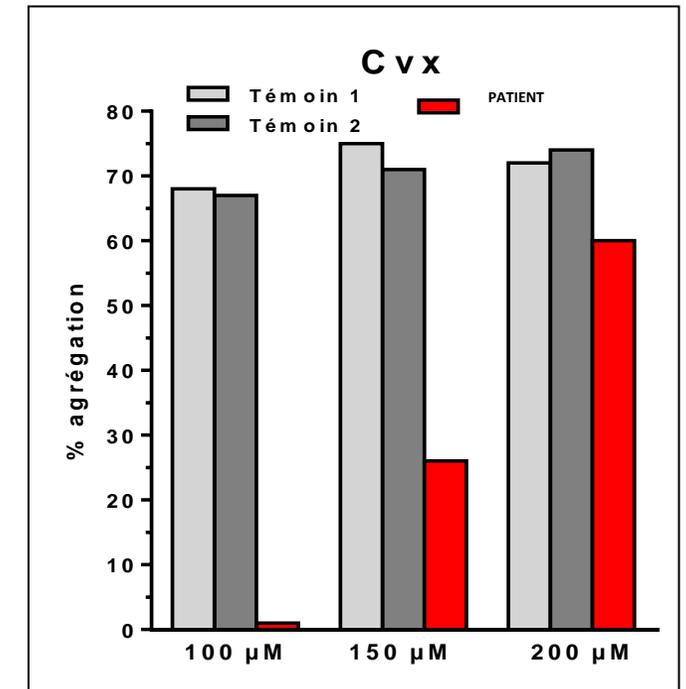
Absence de valeurs de référence (variabilité en agrégation plaquettes lavées)



La variabilité des réponses en plaquettes lavées

Pour interpréter aux faibles concentrations :

- Gamme d'agonistes large en concentrations (doses faibles **les plus variables** mais les plus intéressantes dans les thrombopathies « mild », polymorphismes...)



La variabilité des réponses en plaquettes lavées

- Protocole de préparation de plaquettes lavées **non standardisé par les comités** (Nationaux et internationaux)
- Préparation de tampons faits maison + diversité de référence des réactifs (Tyrode-Hepes, Tampon de lavage, apyrase, PGE1....)
- Température, frein de la centrifugeuse, délai entre le prélèvement et l'analyse....
- Désensibilisation des plaquettes (P2Y12) = donneur/prélèvement/préparation : sur l'ensemble de la chaîne = réponse plaquettaire variable

**Faut-il réfléchir à un protocole standardisé national ? International ?
(réactifs, distributeurs, etc...)**

Comment contourner « au mieux » ces obstacles ?

Expérience au sein de l'U1176 :

- 2 ou 3 témoins le même jour + parents/famille si pertinent
- Mesure de la variabilité intra-individuelle du patient (si possible minimum 3 prélèvements différents = 3 consultations différentes)
- Confronter différentes techniques : agrégométrie / cytométrie / morphologie fluorescence et électronique, analyse biochimique (westernblot, IP, spectrométrie de masse) (mais coût, disponibilité, temps)

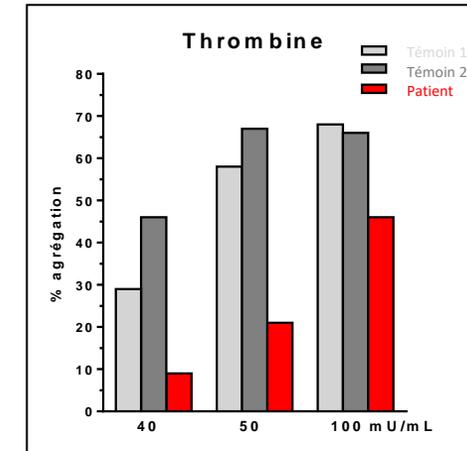
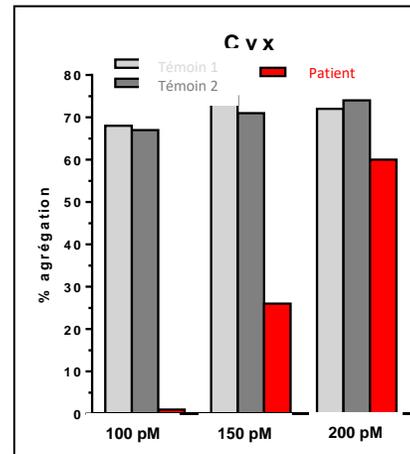
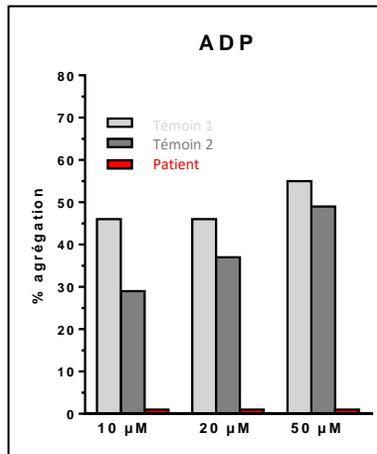
GP totale, intégrine activée PAC-1, sécrétion : p-sélectine/CD63 et sécrétion = relarguage ADP & sérétonine, phosphorylation, signalisation, glycosylation....

- Echange avec le laboratoire d'hémostase clinique

Confrontation agrégation/CMF PAC-1

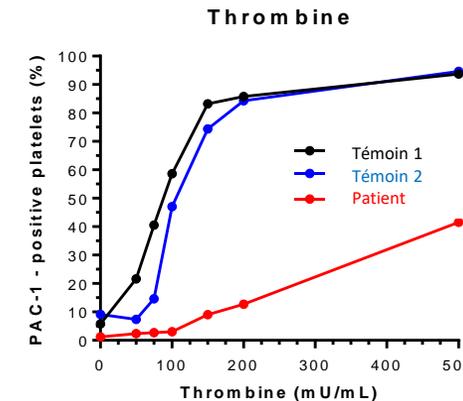
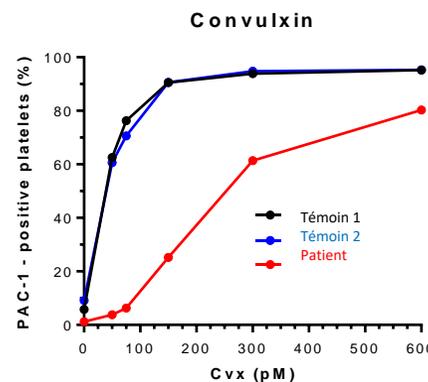
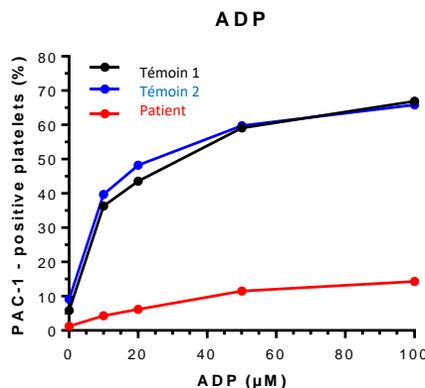
Exemple d'agrégations plaquettaires et Cytométrie (*anticorps PAC1*)

Agrégation



Interaction
 Plaquette-plaquette
 « agitation »

Activation
 (CMF)



Plaquette isolée
 « statique »

(non publiées, U1176)

Conclusion: Défaut d'agrégations plaquettaires corrélé avec un défaut d'activation de l'intégrine $\alpha IIb\beta 3$

Le contrôle de qualité idéal pour nos laboratoires

- Permettre le contrôle des réactifs et des analyseurs
- S'assurer de la reproductibilité intra et inter-opérateur (CV et incertitudes de mesure)
- Evaluer la variabilité intra et inter-laboratoires
- Comparer les équipements
- utiliser une matrice proche du milieu utilisé (Plasma, Tampon)
- Être stable
- Faible coût

Plaquettes produites in vitro : un contrôle de qualité est-il possible ?

Dominique Baruch

Plaquettes produites in vitro : un contrôle de qualité est-il possible ?

- De quel contrôle-qualité parle-t-on ?
- Quels sont les besoins des laboratoires d'hémostase ?
- Pourquoi les start-ups de production de plaquettes n'ont-elles pas développé de standard pour le diagnostic ?
- Pourquoi les industriels du diagnostic des fonctions plaquettaires ne cherchent-ils pas à utiliser des plaquettes produites in vitro ?

Plaquettes in vitro : quelques repères

- Plaquettes obtenues à partir de cultures de progéniteurs mégacaryocytaires
- Disponibles à la demande
- Produit standardisé
- Stérile
- Médicament biologique dans le domaine de la transfusion plaquettaire
- Applications au diagnostic
 - Standard des tests d'agrégation plaquettaire

Le contrôle de qualité idéal pour nos laboratoires

- Permettre le contrôle des réactifs et des analyseurs
- S'assurer de la reproductibilité intra et inter-opérateur (CV et incertitudes de mesure)
- Evaluer la variabilité intra et inter-laboratoire
- Comparaison des équipements
- Matrice proche du milieu utilisé (Plasma, Tampon)
- Stable
- ~~Faible coût~~

The world's first cultivated **platelets** grown from the cells of **a bone marrow**. Mind-blowing flavor, world-changing potential.

The world's first cultivated steaks, grown from the cells of a cow. Mind-blowing flavor, world-changing potential.

Quels sont les besoins des laboratoires d'hématologie ?

Réflexions sur l'utilisation de plaquettes PlatOD dans le diagnostic (fin 2019)

1) intérêt de plaquettes de référence pour le diagnostic

- A-t-on toujours besoin d'un standard de plaquettes ? **oui**
- Dans quelles situations ce standard présenterait-il un avantage indiscutable ? **tests fonctionnels plaquettaires et diagnostic de TIH**
- Parmi les avancées récentes, un tel standard a-t-il émergé ? **Non**

2) caractéristiques de plaquettes de référence

- Quel serait le comparateur : **plaquettes lavées ou PRP**
- Quantité par test **2 à 5*10⁷ 250 µL**
- Quel test **agrégométrie**

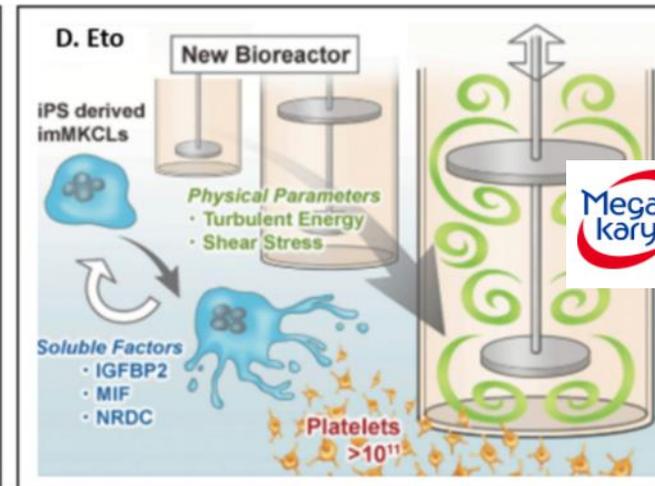
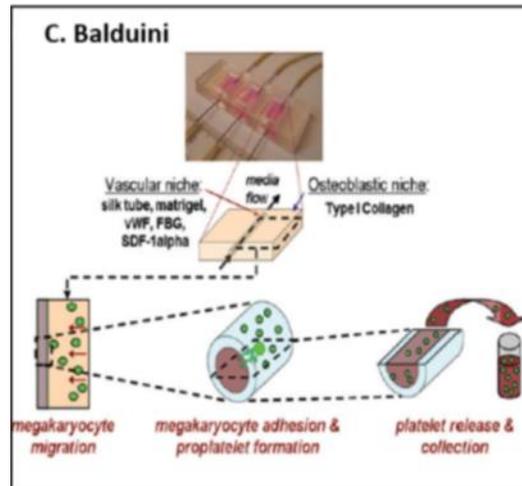
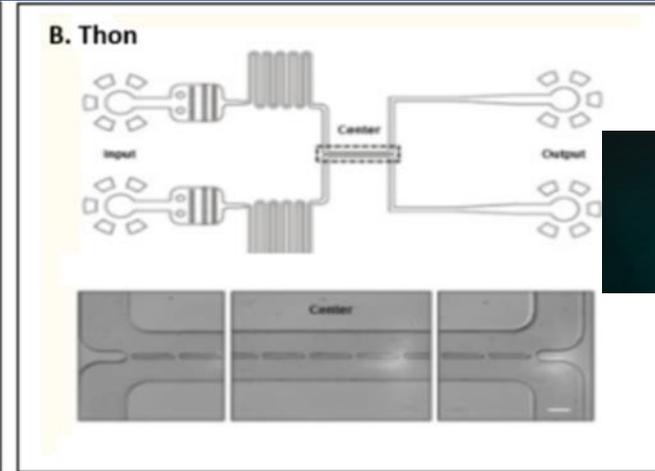
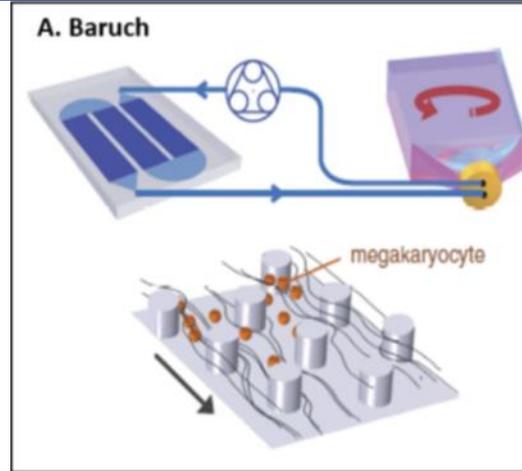
Start-ups développées pour la production de plaquettes

- Megakaryon corporation
- Platelet Biogenesis -> Platelet Bio -> Stellar Bio
- PlatOD->HemostOD

Industriels impliqués dans le diagnostic des fonctions plaquettaires

- Biocytex
- Chrono-log
- Stago
- Sysmex
-

Equipes de production plaquettaire in vitro



Pas de développement d'application au diagnostic en cours

Objectif

Application des cellules iPS à la production de plaquettes à visée thérapeutique

Essais cliniques

- Transfusion de plaquettes dérivées d'iPS **autologues** à une patiente thrombopénique. Etude de safety (dose escalation single-center open-label uncontrolled study jRCTa050190117) *Blood* 2022; 140 (22): 2398–2402
- Transfusion de plaquettes **allogéniques** à partir de cellules iPS HLA homozygotes. Etude de tolérance, safety et efficacité à des sujets thrombopéniques (jRCT2053210068)

iPS1 First-in-human clinical trial of iPSC-derived platelets as a phase 1 autologous transfusion study

Protocole

Doses de plaquettes injectées: $1 \cdot 10^{10}$, $3 \cdot 10^{10}$ et $1 \cdot 10^{11}$

Clone imMK amplifié 16 000 fois en 23 jours en présence de doxycycline

Production de plaquettes après arrêt dox en système de turbulence (VerMES)

Echelle de production **32 litres pour obtenir $10 \cdot 10^{11}$ plaquettes**

Caractérisation des plaquettes produites in vitro

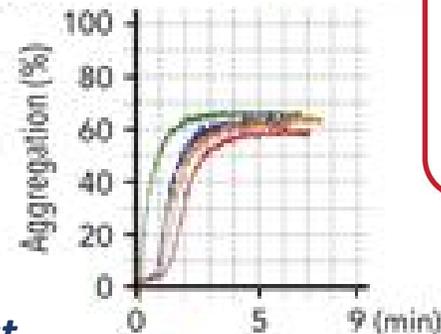
Tracé d'agrégation $3 \cdot 10^8$ plaquettes/mL

Blood (2022) 140 (22): 2398-2402

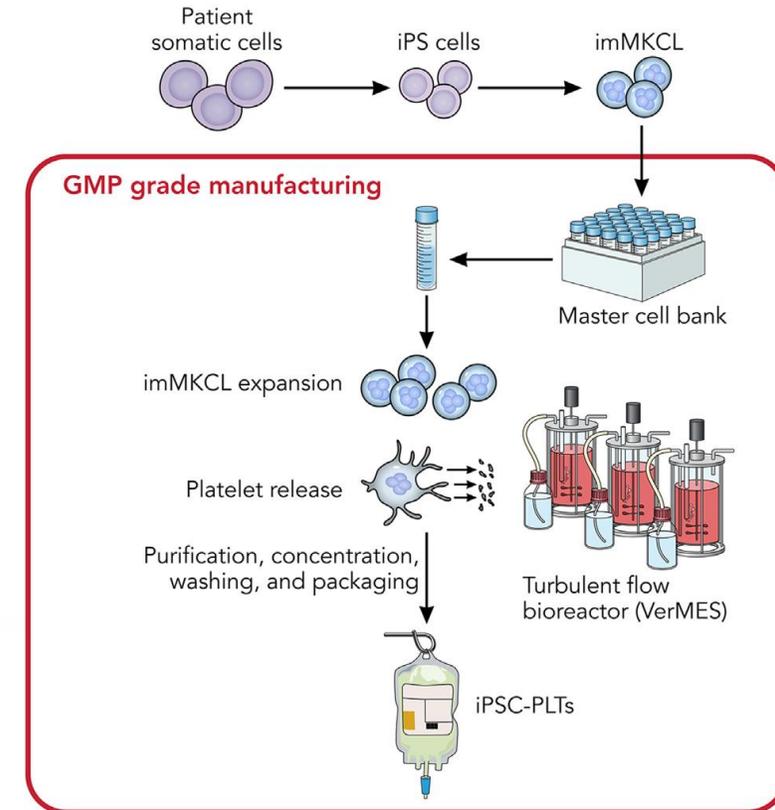
Blood Adv (2022) 6 (23): 6056–6069

Quantité/test

$9 \cdot 10^7$ PLT



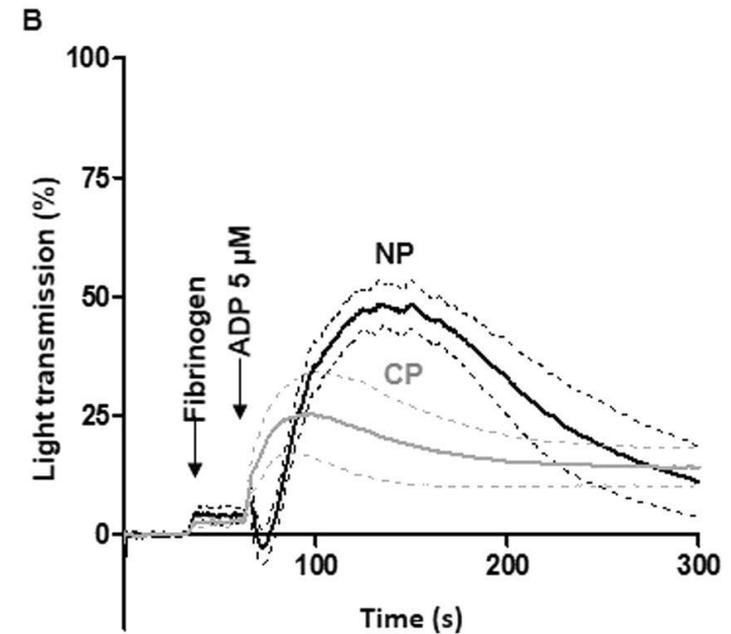
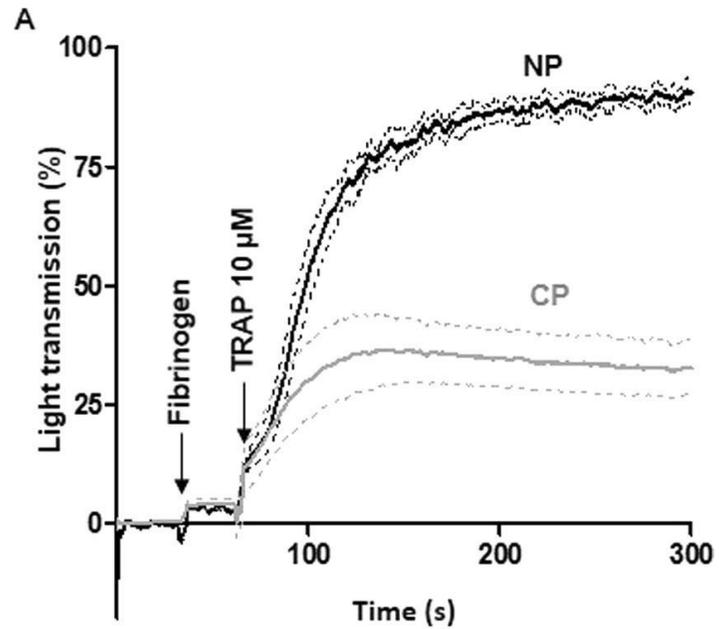
- ADP 50 µM
- Collagen 20 µg/mL
- Collagen 10 µg/mL
- Collagen 5 µg/mL



Agrégation des plaquettes produites in vitro

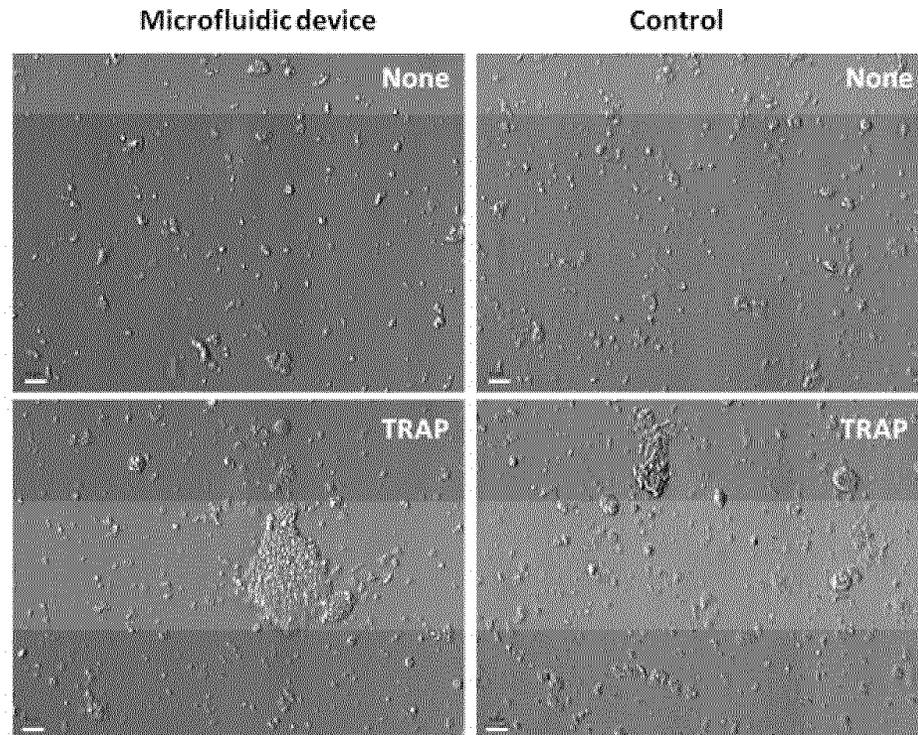
Tracé d'agrégation $1,5 \cdot 10^8$ plaquettes/mL

Do Sacramento & al. Sci Rep 2020

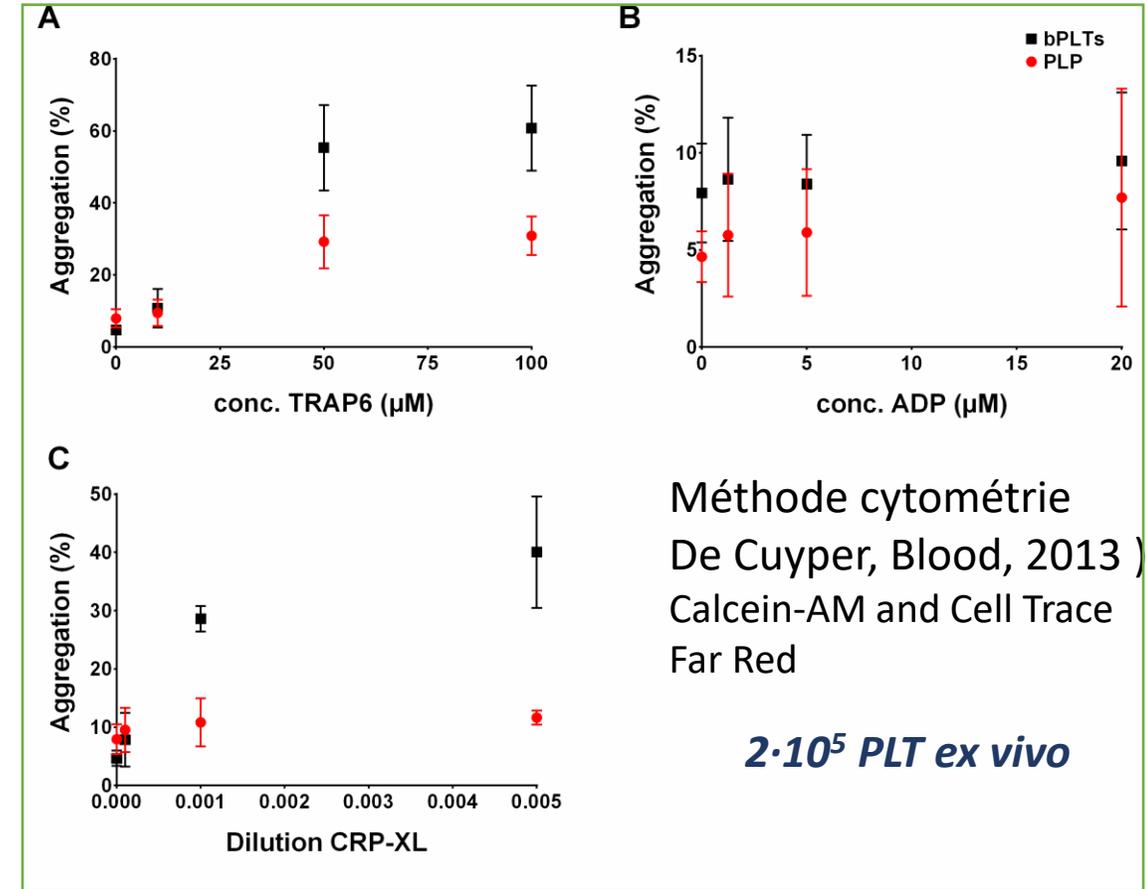


Agrégation des plaquettes produites in vitro

Agrégation $1,5 \cdot 10^7$ plaquettes/mL

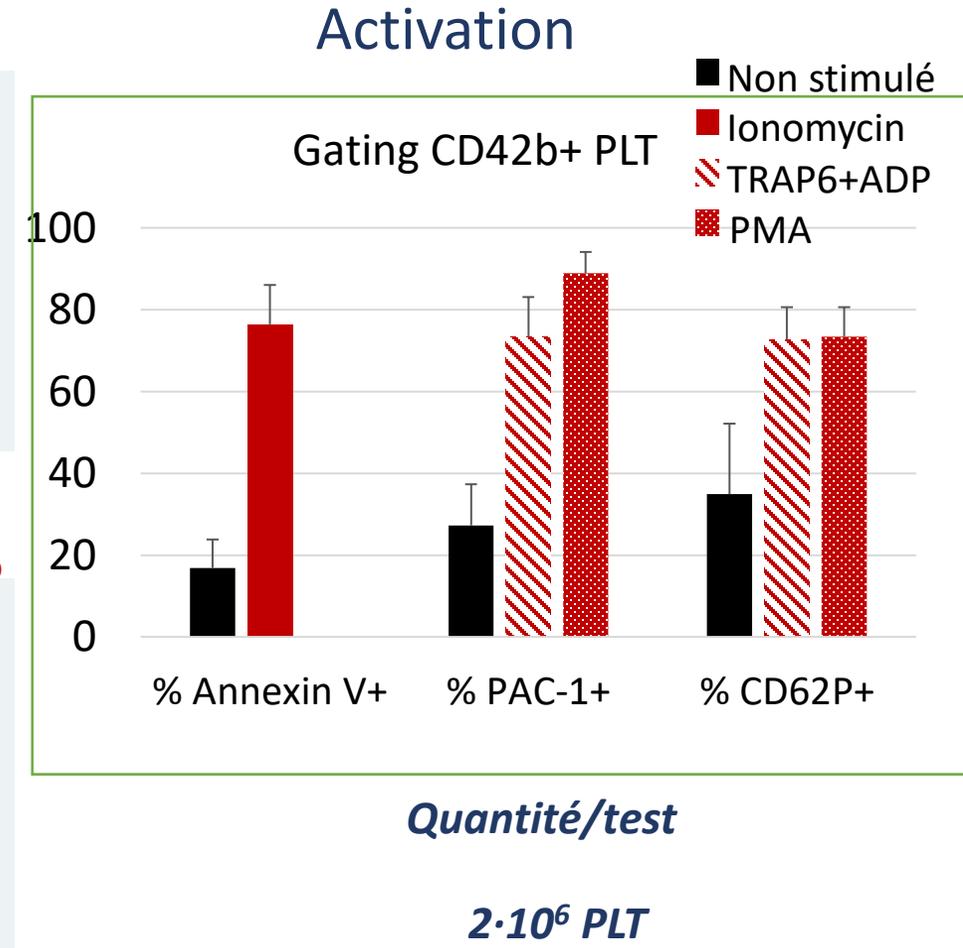
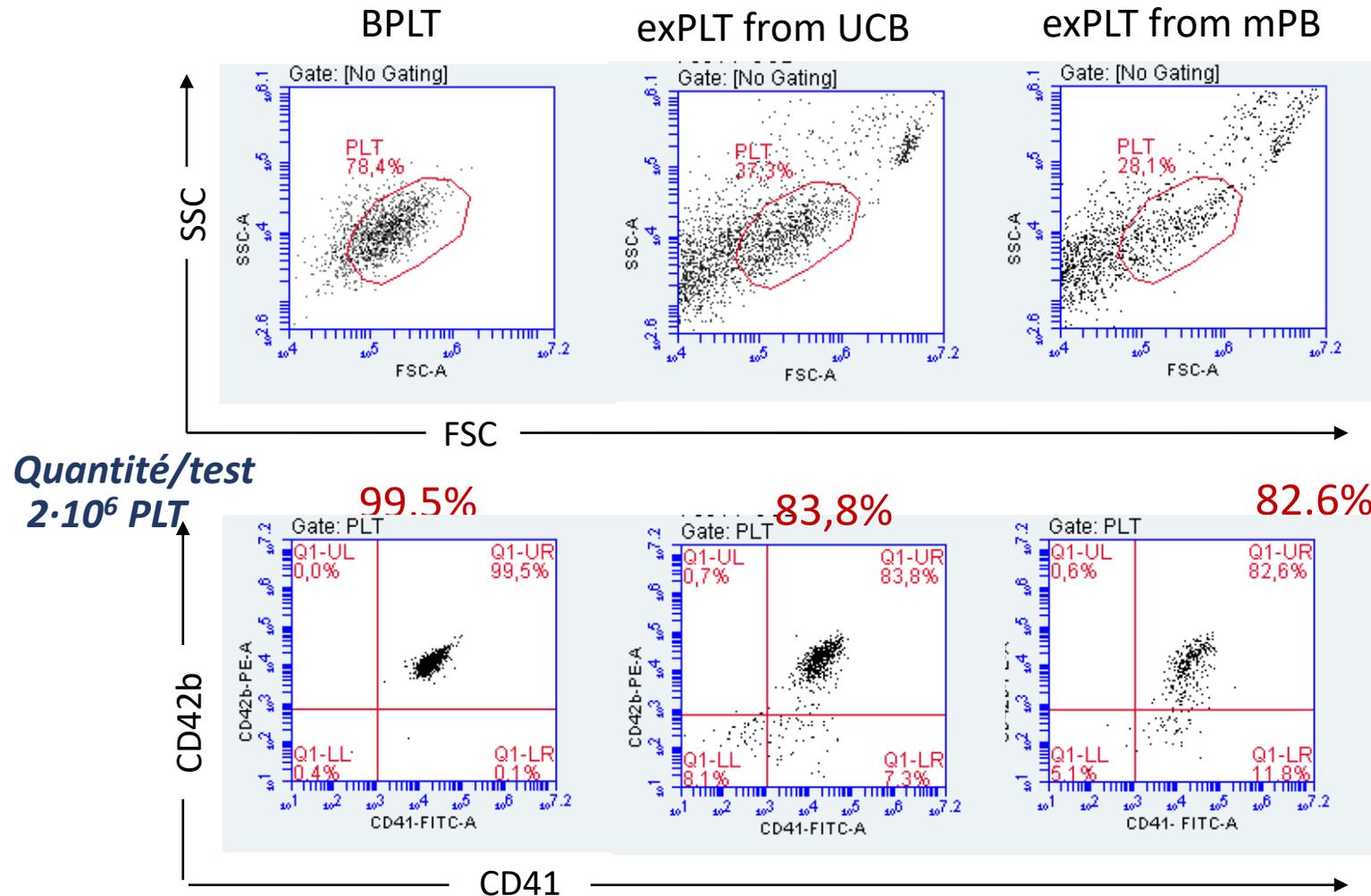


Blin Le Goff & al. Sci Rep 2016



Collaboration BRCF H. Feys 2019

Caractérisation des plaquettes PlatOD

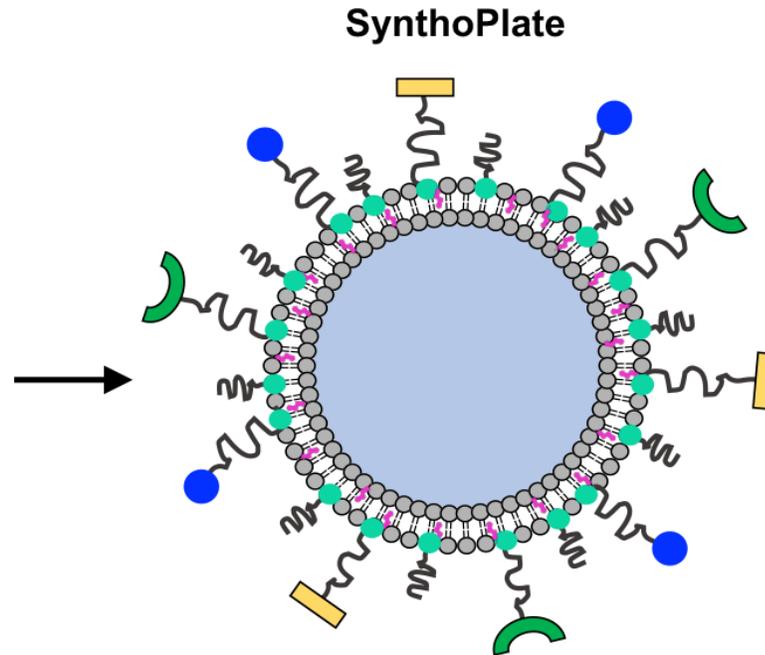
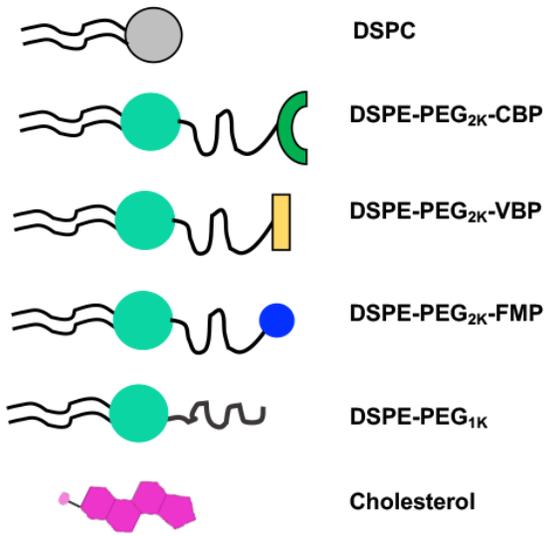


Plaquettes in vitro pour le diagnostic : y a-t-il vraiment un marché ?

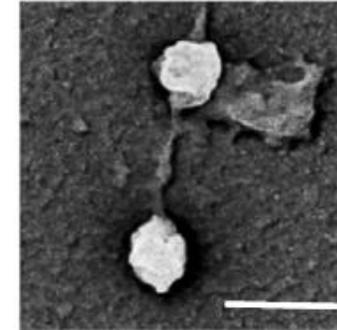
- Accès aux plaquettes fraîches de témoins pour les tests de diagnostic n'est pas simple... mais ne coûte pas cher
- Même en disposant d'un prototype évolutif et d'une lignée immortalisée, les coûts de production des plaquettes resteront élevés.
- Les industriels du diagnostic pourraient-ils s'engager à soutenir les coûts de développement propres au diagnostic?

Plaquettes synthétiques ou SynthoPlate™

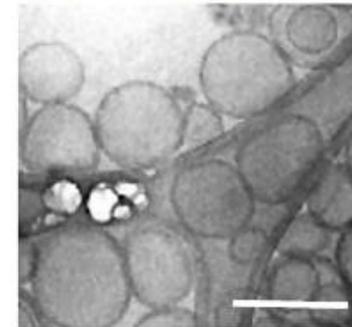
SynthoPlate Components



C Scanning electron microscopy image of SynthoPlate particle



D Cryo-transmission electron microscopy image of SynthoPlate



SEN GUPTA LAB
 BIO-INSPIRED ENGINEERING for ADVANCED THERAPIES



Modery-Pawlowski *Biomaterials* 2013

Anselmo *ACS Nano* 2014

Shukla *J Thromb Haemost* 2017

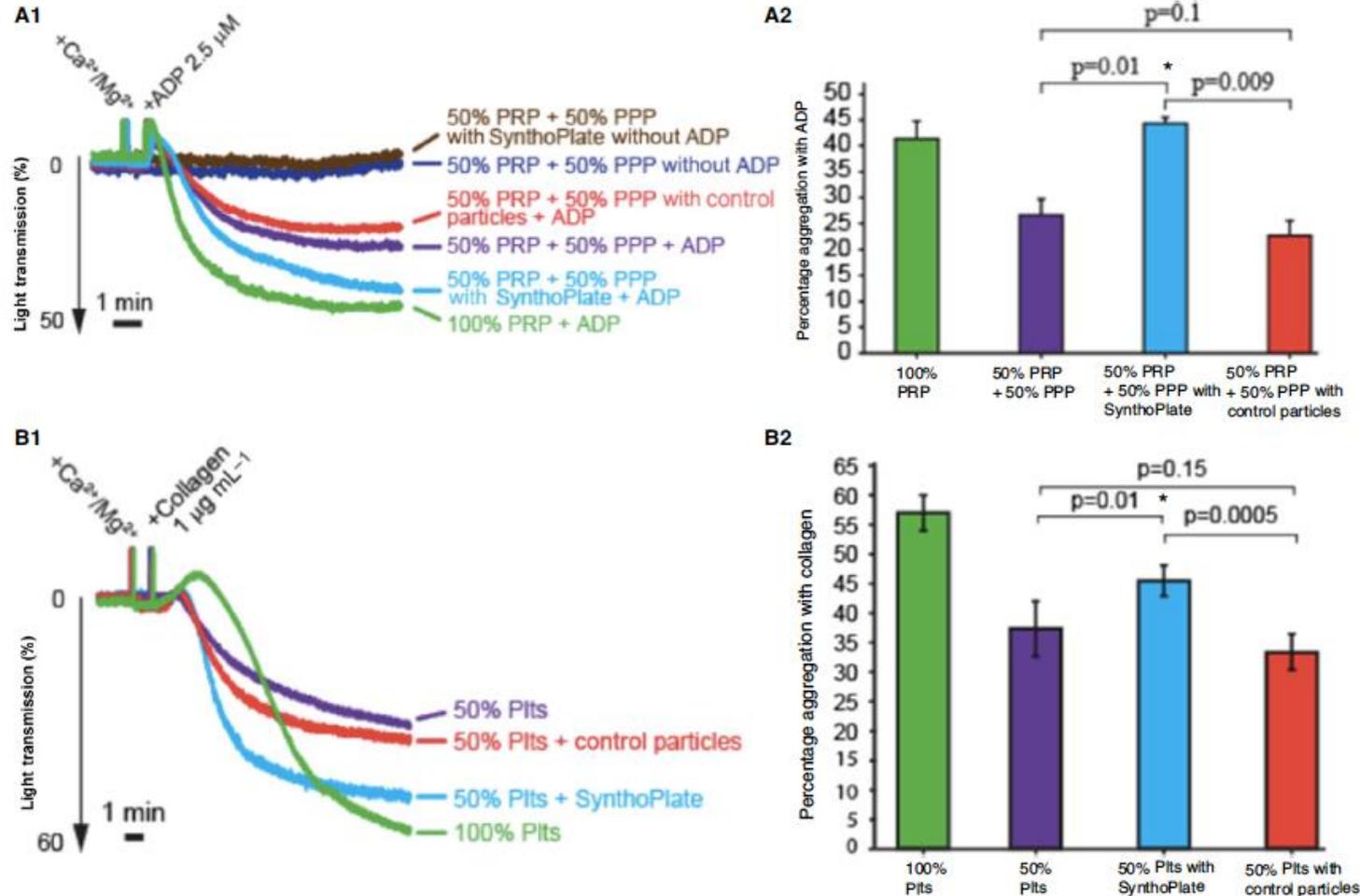
FMP: Fibrinogen-mimetic peptide

VBP: VWF-binding peptide

CBP: collagen binding peptide

(Diapo adaptée de Cécile Denis)

Plaquettes synthétiques ou SynthoPlate™



Conclusions

- Définir les besoins des laboratoires d'étude des fonctions plaquettaires
 - Enquête auprès des laboratoires de diagnostic et de recherche
 - Contraintes liées au donneurs sains
- Quel avantage indiscutable des tests d'agrégation de plaquettes de donneurs ?
- Se diriger vers des alternatives aux plaquettes de donneurs (type Synthoplate) à développer sans recours aux plaquettes fraîches
- Étude de marché
 - Quelle prise de risque acceptable pour les industriels ?
- Nécessité de standardisation des procédures pour les laboratoires de recherche