



Le thiazole orange : un outil complémentaire aux méthodes diagnostiques établies des anomalies héréditaires des granules denses

Thiazole orange: a complement to established methods for diagnosing inherited dense granule defects

Martin M, Strandberg K, Zetterberg E, Norström E.
Platelets 2025 ; 36 : 2592683.

Analyse commentée réalisée par Agnès RIBES

Date de publication : 28 mai 2026

JUSTIFICATIFS ET OBJECTIFS

Les déficits constitutionnels en granules denses (anomalie de contenu et/ou de sécrétion) plaquettaires sont probablement sous-diagnostiqués en raison des limites des outils diagnostiques actuels. En effet, si les formes sévères, notamment syndromiques, comme le syndrome de Hermansky-Pudlak ou de Chediak-Higashi, sont facilement identifiables, les formes plus modérées manquent d'outils accessibles et sensibles. De plus, les techniques de référence basées sur la microscopie électronique ou la sérotonine radiomarquée restent peu accessibles, même pour des laboratoires spécialisés. Enfin, l'analyse moléculaire n'est jamais réalisée en première intention et, là encore, des formes sans thrombopénie peuvent être manquées.

Dans ce contexte, un fluorochrome cationique, la mépacrine, quantifiable par cytométrie en flux, avait été développé dans les années 1990. Toutefois, les études rapportent une faible valeur prédictive positive (environ 35 %).

L'objectif de cette étude est d'examiner la pertinence du thiazole orange (TO), un agent intercalant fluorescent des acides nucléiques habituellement utilisé pour quantifier les réticulocytes et les plaquettes réticulées, comme nouveau marqueur des granules denses en cytométrie de flux. Ainsi, les auteurs ont testé le TO pour distinguer les déficits quantitatifs des déficits de sécrétion des granules denses et l'ont comparé à la mépacrine.

METHODES

L'étude a porté sur 12 volontaires sains et 15 patients suspectés de thrombopathie. Les méthodes employées comprenaient :

- Titration des colorants : comparaison du TO (*via* le réactif Retic-Count™) et de la mepacrine sur des plaquettes au repos et activées par le TRAP-6 (80 µM) à température ambiante et à 37 °C ;
- Analyse par cytométrie de flux : Mesure de l'intensité de fluorescence (GeoMean) sur un cytomètre Navios ;
- Les résultats du TO ont été comparés à l'agrégométrie optique (LTA) et à l'expression de marqueurs d'activation (CD62P, CD63, PAC-1).

RESULTATS

Concernant les capacités de détection de la sécrétion des granules denses, correspondant à la variation de fluorescence entre un état au repos et un état activé, en réponse au TRAP6 (80 µM à 37°C pendant 15 min), les auteurs montrent que le TO (non dilué) est supérieur à la mepacrine (104 µM) (différence de fluorescence à 75 % pour le TO contre 20-30 % pour la mepacrine).

Concernant la sensibilité de détection d'une anomalie de sécrétion des granules denses, les auteurs montrent que seul le TO permet de suivre une diminution dose-dépendante de la fluorescence (test de titration de la fluorescence émise en réponse à des concentrations croissantes de TRAP6, 0 à 80 µM).

Les auteurs ont ensuite réalisé une étude pilote sur 15 échantillons de patients suspects d'une thrombopathie et comparé le résultat obtenu avec le TO *versus* les réponses obtenues en agrégométrie (ADP 2 µM, collagène 2 µg/mL, épinéphrine 5 µM, ristocétine 1,2 mg/mL) et en cytométrie en flux (CD62P, CD63, PAC1). Leurs résultats suggèrent que le TO pourrait permettre de distinguer un déficit en granules denses d'un défaut de dégranulation.

AVIS D'EXPERT

Les auteurs présentent le thiazole orange (TO) comme un outil diagnostique prometteur et un complément précieux pour le dépistage des anomalies héréditaires des granules denses. Ils avancent plusieurs avantages concrets par rapport à la mepacrine, principalement en raison des propriétés fluorescentes et de la sensibilité accrue du TO.

Ils exploitent les données publiées par Robinson et ses collaborateurs en 1998 (1) selon lesquelles à forte concentration, le TO se fixerait ailleurs que sur les acides nucléiques/nucléotides et pourrait s'accumuler dans les granules denses où il interagirait avec l'ADP/ATP intra-granulaire.

Ils précisent que, d'un point de vue biochimique, le TO présenterait un meilleur rapport signal/bruit ; constitué de cyanines, le TO est une molécule très peu fluorescente en solution libre, mais sa fluorescence est multipliée par 1 000 lorsqu'il se lie à sa cible (acides nucléiques et nucléotides). À l'inverse, la mepacrine est déjà très fluorescente lorsqu'elle n'est pas liée, ce qui génère davantage de bruit de fond défavorable et réduit la précision du test.

Les auteurs démontrent que le TO a une grande amplitude de signal à 37°C où la différence de fluorescence entre plaquettes au repos et plaquettes activées atteint 70 %. En comparaison, la mepacrine ne montre qu'une amplitude de 20-30 %.

Les auteurs discutent également de la facilité d'analyse du TO en raison d'un spectre d'émission plus étroit que pour la mépacrine, ce qui facilite sa détection (pas/peu de chevauchement) et permet de l'associer à d'autres marqueurs d'activation de la sécrétion plaquettaire (CD62P, CD63) dans un seul et même test.

Enfin, les auteurs suggèrent que le TO présenterait une sensibilité accrue pour les formes modérées d'anomalies granulaires. Compte tenu de sa grande amplitude de signal, le TO pourrait être plus sensible pour détecter des défauts partiels en granules denses (quantitatif, de contenu, ou d'exocytose) chez des patients pour lesquels les résultats aux tests standards (agrégométrie ou CD63) apparaissent normaux.

Ainsi, là où la mépacrine est limitée par une faible valeur prédictive positive (35 %), le TO serait plus sensible pour dépister voire caractériser un défaut en granules denses.

Des limites doivent toutefois être soulignées et la première concerne le signal interprété comme spécifique par les auteurs ; pour ces derniers, il ne peut correspondre qu'au marquage exclusif des granules denses.

Or, le TO est un cation lipophile pouvant s'accumuler dans des lysosomes, ou tout autre compartiment, dont le pH est maintenu acide par un gradient de protons, indépendamment du contenu en nucléotides. De fait, toute anomalie de pompes à protons et/ou du trafic lysosomal peut modifier le signal, indépendamment du contenu granulaire, et générer un signal faussement positif.

Par ailleurs, les travaux de Robinson *et al.* ne sont illustrés par aucune donnée d'imagerie confocale. De même, le taux de plaquettes réticulées peut interférer (thrombopénie périphérique, thrombopénie immunologique, turn-over augmenté) et venir surestimer le TO incorporé, d'autant que la concentration utilisée ne discrimine pas le marquage granulaire du marquage ribonucléique. Les conditions analytiques sont spécifiées pour 37°C afin d'avoir la meilleure amplitude de signal ; toutefois, rien n'est spécifié concernant les délais préanalytiques, les conditions de réalisation des tests (pH, concentration en Ca²⁺, fixation du plasma riche en plaquettes) ou la nécessité d'une calibration interne.

De plus, le gain de 70 % en TO *versus* 30 % en mépacrine entre plaquettes au repos et activées reste un gain analytique qui ne permet pas à lui seul d'établir une preuve de supériorité diagnostique. Il aurait fallu présenter une courbe ROC avec un tableau de concordance comportant sensibilité/spécificité et valeur prédictive négative/positive. Les auteurs parlent de supériorité du TO sur la mépacrine mais ne présentent aucune analyse de performance, ni aucune donnée statistique. Enfin, la cohorte de patients est extrêmement modeste (n = 15), contre une population contrôle également trop faible (n = 12) pour définir un intervalle de référence, et non comparée à un *gold standard* (pas de microscopie électronique ni d'HPL pour le dosage de la sérotonine).

Concernant le marquage par la mépacrine, les plaquettes sont marquées après stimulation, ce qui n'est habituellement pas recommandé (test d'*uptake* et non de *release*). La mépacrine étant un composé fluorescent cationique lipophile, il est très étonnant de voir si peu de différence entre les conditions de repos et après activation.

En conclusion, le TO peut effectivement être une méthode prometteuse, mais reste au stade exploratoire, et nécessite une validation plus robuste (cohorte indépendante corrélée à un *gold standard*) avant d'être utilisée en pratique courante.

RÉFÉRENCE

1. Robinson MS, Mackie IJ, Khair K, Liesner R, Goodall AH, Savidge GF, *et al.* Flow cytometric analysis of reticulated platelets: evidence for a large proportion of non-specific labelling of dense granules by fluorescent dyes. *Br J Haematol* 1998 ; 100 : 351-7.