

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique Et populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur
Et de la recherche scientifique
Université Constantine III
Faculté de médecine
Département de pharmacie



وزارة التعليم العالي
و البحث العلمي
جامعة قسنطينة 3
كلية الطب
قسم الصيدلة

Thèse de Doctorat en Sciences Médicales

Recherche des anticorps antiplaquettes par cytométrie en
flux chez les patients présentant une thrombopénie
immunologique

Présentée par

Docteur ZOUITEN Raouf

Maitre-assistant en hémobiologie et transfusion sanguine

Soutenue publiquement le 23 février 2023

JURY

Président	BROUK Hacene	Professeur en hémobiologie	Faculté de médecine d'Annaba
Directeur de thèse	BRAHIMI Mohamed	Professeur en hématologie	Faculté de médecine d'Oran
Membre 1	LARFI Yacine	MCA en hémobiologie	Faculté de pharmacie d'Alger
Membre 2	BOUAB Haroun	MCA en immunologie	Faculté de médecine de Constantine
Membre 3	EL HORRI Mohamed	MCA en hémobiologie	Faculté de médecine d'Oran

Constantine 2023



REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier Monsieur **BRAHIMI Mohamed**, Professeur en hématologie, et chef d'unité de thérapie cellulaire de l'EHU 1^{er} novembre d'Oran, qui m'a encadré tout au long de cette thèse et qui m'a fait partager ses brillantes intuitions. Qu'il soit aussi remercié pour sa gentillesse, sa disponibilité permanente et pour les nombreux encouragements qu'il m'a prodigués. Cette thèse est le fruit d'une collaboration de plus de quatre années avec lui. C'est à ses côtés que j'ai compris ce que rigueur et précision voulaient dire.

J'adresse tous mes remerciements à Monsieur le **directeur général de l'hôpital militaire régional universitaire de Constantine**, sans votre aide, votre soutien et votre confiance en ma personne, ce travail ne sera pas accompli.

Docteur **GABA Zakaria** chef du service de pharmacie, docteur **DJEKIREF** pharmacienne responsable des réactifs de laboratoire et Monsieur **LATHAMNA Abdessalam** responsable du service technique, pour vos efforts consacrés afin d'assurer le développement de notre laboratoire en équipements et son approvisionnement en réactifs et consommables.

Professeur **BOUAB Haroun** chef du service de laboratoire central, docteur **REGGAM Khalil**, tout le personnel du laboratoire central en général et le personnel de l'unité d'hémobiologie et du centre de transfusion sanguine en particulier, merci infiniment pour vos soutiens, vos encouragements et votre précieuse aide.

Dr ATTARI, Dr SID AHMED, Dr MENZER, Dr DJAALAB, Dr KEBAILI, Pr SALHI et toutes les équipes des services d'hématologie et de pédiatrie de l'hôpital militaire et du service d'hématologie du CHU Constantine.

Je remercie également le professeur **BROUK Hacene** chef du centre d'hémobiologie et de transfusion sanguine CHU Ibn Rochd d'Annaba, pour l'honneur qu'il me fait d'être président de mon jury de thèse.

Je tiens à remercier **Pr LARFI** chef du service d'hémobiologie à l'hôpital central de l'armée et **Pr ELHORI** chef du laboratoire d'hémobiologie à l'hôpital militaire d'Oran (HMRUO), pour avoir accepté de participer à mon jury de thèse et pour votre participation scientifique ainsi que le temps que vous avez consacré à ma recherche.

Enfin, je remercie toutes les personnes avec qui j'ai partagé mes études et notamment ces années de thèse.

DÉDICACES

Je dédier ce travail à la mémoire de mon père disparu trop tôt, que dieux le tout-puissant ait son âme, lui prête sa clémence et sa miséricorde et l'accueille en son vaste paradis.

À ma très chère mère **MALIKA** et ma maitresse durant mes cinq premières années primaires. Celle qui a attendu avec patience les fruits de sa bonne éducation, de son enseignement et de ses dévouements. J'implore le Dieu qu'il te protège et qu'il t'apporte bonheur et santé.

À ma très chère femme **HAMIDA**, tu as tout fait pour m'aider, tu m'as soutenu et surtout supporté dans tout ce que j'ai entrepris, tu as partagé avec moi les meilleurs moments de ma vie, aux moments les plus difficiles de ma vie, tu étais toujours à mes côtés, je te remercie de ne m'avoir jamais déçu. Je remercie le Bon Dieu qui a croisé nos chemins. Puisse le Bon Dieu nous procure santé et longue vie.

À mes chers frères **SAMIH, RAFIK, SOFIANE** et **AYOUB** pour leur amour et leur encouragement permanents, je n'oublierai jamais les merveilleux moments passés ensemble, je vous dédie ce travail en témoignage de ma profonde affection en souvenir de notre indéfectible union qui s'est tissée au fil des années. Garder et renforcer notre fraternité j'implore Allah de vous réserver un avenir meilleur.

A mes très chères filles **MAYAR, SAHAR** et **SERINE** l'amour que j'ai pour vous est sans aucune mesure, j'implore le Dieu qu'il vous protège et qu'il vous apporte bonheur et santé.

À mes beaux-parents, Monsieur **BOUZIANE MAHAMED** et sa femme **KHADIDJA** vous m'avez accueilli les bras ouverts. Je vous dédie ce travail en témoignage de mon grand respect et mon estime envers vous. Pour vos conseils et votre soutien moral. J'implore le dieu qu'il vous apporte bonheur et santé.

À ma belle-sœur **FATMA ZOHRA** et son mari **BELKACEM** Trouvez ici l'assurance de mon profond respect et de mon fidèle attachement. Que ce travail soit pour vous un modeste témoignage de ma profonde affection.

Et enfin à tous mes amis, tous mes collègues et à toutes mes connaissances...

Recherche des anticorps antiplaquettes par cytométrie en flux chez les patients présentant une thrombopénie immunologique

RÉSUMÉ

Le purpura thrombopénique immunologique (PTI), est définie par la destruction périphérique des plaquettes circulantes par un mécanisme immunologique impliquant des auto-anticorps antiplaquettes, induisant une thrombopénie périphérique $<100\text{G/L}$ et un syndrome hémorragique cutanéomuqueux. Le diagnostic du PTI se pose après exclusion de toutes les autres causes de thrombopénies, car il n'existe pas actuellement un test biologique « gold standard » pouvant confirmer le diagnostic. Dans ce travail nous avons optimisé une technique de recherche directe des anticorps antiplaquettes par cytométrie en flux appelée PAIg, ensuite nous avons évalué ses performances dans le diagnostic du PTI.

Matériels et méthodes : il s'agit d'une étude cas-témoins, où nous avons réalisé une recherche directe des anticorps antiplaquettes chez 102 patients présentant un PTI confirmé selon les directives de l'ASH, et 204 témoins répartis entre 162 sujets sains et 42 témoins présentant une thrombopénie d'une autre étiologie. Après la préparation d'une suspension de plaquettes lavées, le marquage a été réalisé par une antiglobuline humaine polyvalente anti-IgG et anti-IgM couplés à FITC, plus un anticorps anti-GP plaquettaires (CD41a, CD42b ou CD61) couplés à la PE. Les résultats sont exprimés en MFI IgG ou IgM de 7000 plaquettes. L'évaluation des performances de la technique a été effectuée après traçage de la courbe ROC et fixation d'une valeur seuil du test.

Résultats : la recherche combinée des anticorps d'isotype IgG et IgM, a montré les meilleures performances par rapport à l'IgG seul ou l'IgM seul. La surface sous la courbe ROC était à 0,95, la sensibilité à 84,3%, la spécificité à 95,5% et le rapport de vraisemblance $\text{LR}+=19$ $\text{IC}[10-36]$, en faveur d'un excellent apport diagnostique de ce test dans le PTI. Il existe une corrélation négative entre la MFI et le taux de plaquettes, une MFI supérieure à 18.10^3 constitue un facteur de risque de thrombopénie sévère à moins de 30G/L. La surveillance des patients PTI par le test PAIg, a montré également une excellente corrélation entre le taux de plaquettes et la MFI.

Afin d'améliorer les performances de cette technique et standardiser ses résultats, on propose certaines recommandations relatives au choix et préparations de l'échantillon, méthode d'analyse et d'interprétation des résultats.

Conclusion : La technique du PAIg directe optimisée au niveau de notre laboratoire durant cette étude, est caractérisée par sa simplicité, sa rapidité et son coût très réduit, en plus des bonnes performances analytiques intrinsèques et extrinsèques, elle est donc très prometteuse pour qu'elle soit appliquée en pratique courante dans le diagnostic des thrombopénies immunologiques.

Mots clés : anticorps antiplaquettes, PTI, thrombopénie, cytométrie en flux, PAIg.

Detection of Platelet Associated Immunoglobulin by flow cytometry in patients with immune thrombocytopenia

ABSTRACT

Immune thrombocytopenia (or ITP) is defined by the peripheral destruction of circulating platelets by an immunological mechanism involving antiplatelets autoantibodies, inducing peripheral thrombocytopenia $<100\text{G/L}$ and a cutaneous-mucous hemorrhagic syndrome. The diagnosis of the ITP arises after exclusion from all the other causes of thrombocytopenia, as there is currently no "Gold Standard" biological test that can confirm the diagnosis. In this work we have optimized a direct research technique for antiplatelets antibodies by flow cytometry called PAIg, then we evaluated its performances in the diagnosis of ITP.

Materials and methods: This is a case-control study, where we have carried out direct research of Platelet Associated Immunoglobulin in 102 patients with a confirmed ITP according to the ASH guidelines, and 204 controls distributed between 162 healthy subjects and 42 controls presenting a thrombocytopenia of another etiology. After preparing a suspension of washed platelets, the marking was carried out by an mouse anti-human globulin anti-IgG and anti-IgM coupled with FITC, and an anti-Platelet antibody (CD41a, CD42b or CD61) coupled with PE. The results are expressed in MFI IgG or IgM of 7000 platelets. The technique performance assessment was carried out after tracking the ROC curve and selecting a test threshold value.

Results: Combined research of IgG and IgM antibodies has shown the best performance compared to IgG alone or IgM alone. The surface under the ROC curve was 0.95, sensitivity to 84.3%, specificity at 95.5% and the LR+likelihood ratio = 19 CI [10-36], in favor of an excellent diagnostic contribution of this test in the ITP. There is a negative correlation between the MFI and the platelets rate, an MFI greater than $18 \cdot 10^3$ constitutes a risk factor of severe thrombocytopenia less than 30G/l . In addition, monitoring ITP patients by the PAIg test show an excellent correlation between the platelets rate and the MFI.

In order to improve the performance of this technique and standardize the results, we have proposed recommendations relating to the choice and preparations of the sample, method of analysis and interpretation of the results.

Conclusion : the direct PAIg technique optimized in our laboratory during this study is characterized by its simplicity, speed and very reduced cost, in addition to the good intrinsic and extrinsic analytical performances, it is therefore very promising to either applied in routine practice in the diagnosis of immune thrombopenia.

Keywords : antiplatelets antibodies, PTI, thrombocytopenia, flow cytometry, PAIg.

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS	I
DÉDICACES	II
RÉSUMÉ	III
ABSTRACT	IV
TABLE DES MATIERES	V
LISTE DES FIGURES	IX
LISTE DES TABLEAUX	XI
LISTE D'ABREVIATIONS.....	XIII
INTRODUCTION.....	1
REVUE DE LA LITTÉRATURE	
I. PLAQUETTES, STRUCTURES ET FONCTIONS	3
A. THROMBOPOÏÈSE	3
1. Développement mégacaryocytaire.....	3
2. Endomitose et maturation mégacaryocytaire	4
3. Formation des plaquettes.....	5
4. Régulation.....	7
B. MORPHOLOGIE PLAQUETTAIRE	8
1. La membrane plasmique et le cytosquelette.....	9
2. Systèmes membranaires internes :.....	11
3. Les granules plaquettaires :.....	11
C. LES RECEPTEURS MEMBRANAIRES PLAQUETTAIRES	13
1. Les intégrines :.....	13
2. Les récepteurs types LRR (répétitions riches en leucine).....	16
3. Les récepteurs à sept domaines transmembranaires :.....	20
4. Superfamille d'immunoglobulines	24
5. Famille de récepteurs de lectine de type c.....	26
6. Les récepteurs de tyrosine kinase	27
7. Glycosyl phosphatidylinositol (GPI).....	28
8. Diverses glycoprotéines membranaires.....	28
D. POLYMORPHISME DES ANTIGENES PLAQUETTAIRES :.....	29
E. VOIES DE SIGNALISATIONS PLAQUETTAIRES	31
F. LES FONCTIONS DES PLAQUETTES.....	33
1. Rôle des plaquettes dans l'hémostase.....	33
2. Rôle des plaquettes dans l'angiogenèse :.....	35
3. Rôle dans l'athérombose	35
4. Rôle dans l'inflammation.....	35
5. Rôle dans la défense antimicrobienne.....	36
6. Rôle dans la croissance tumorale et les métastases.....	36
II. CONDUITE À TENIR DIAGNOSTIQUE D'UNE THROMBOPÉNIE.....	37
A. HISTORIQUE CLINIQUE.....	37
1. Le saignement :.....	37
2. Sexe et historique familial.....	37

3.	<i>Historique pathologique et thérapeutique</i>	37
B.	EXAMEN CLINIQUE	38
C.	EXAMENS BIOLOGIQUES	38
1.	<i>Numération plaquettaire</i>	38
2.	<i>Frottis sanguin</i>	39
3.	<i>Médullogramme</i>	40
D.	DIAGNOSTIC ETIOLOGIQUE	40
III.	LE PTI : PHYSIOPATHOLOGIE, DIAGNOSTIC ET PRISE EN CHARGE	43
A.	PHYSIOPATHOLOGIE.....	43
1.	<i>Lymphocytes B et la réponse immunitaire humorale</i>	43
2.	<i>Implication des lymphocytes T</i>	44
3.	<i>Déficit de production médullaire</i>	45
4.	<i>Facteurs déclenchant</i>	45
B.	DIAGNOSTIC DU PTI	46
C.	TRAITEMENT	47
1.	<i>Traitements de première ligne</i>	47
2.	<i>Traitements de deuxième ligne</i>	48
IV.	RECHERCHE DES ANTICORPS ANTIPLAQUETTES	49
A.	TECHNIQUES IMMUNO--ENZYMATIQUES	50
1.	<i>ELISA capture d'antigène ACE</i>	50
2.	<i>ELISA capture d'antigène modifiée MACE</i>	50
3.	<i>MAIPA (monoclonal antibody immobilization of platelet antigens)</i>	50
B.	TECHNIQUES D'IMMUNOFLUORESCENCE PAR CYTOMETRIE EN FLUX.....	51
1.	<i>La cytométrie en flux</i>	51
2.	<i>Technique PAIg par cytométrie en flux</i>	55
3.	<i>FCIA (flow cytometric immunobead assay),</i>	56
PARTIE PRATIQUE		
I.	OBJECTIFS	60
A.	OBJECTIF PRINCIPAL.....	60
B.	OBJECTIFS SECONDAIRES :	60
II.	MATÉRIELS ET MÉTHODES :	61
A.	TYPE DE L'ÉTUDE.....	61
B.	POPULATIONS ETUDIÉES	61
1.	<i>Population des patients</i>	61
2.	<i>Population des témoins</i>	62
C.	MATÉRIELS	63
1.	<i>Cytomètre en flux Attune™ Nxt (life technologie)</i>	63
2.	<i>Analyseur d'hématologie Beckman Coulter DxH500</i>	64
3.	<i>Autres matériels</i>	65
4.	<i>Réactifs</i>	65
D.	MÉTHODES.....	66
1.	<i>Phase préanalytique</i>	66
2.	<i>Recherche des PAIg : (dépistage)</i>	67
3.	<i>Quantification des PAIg</i>	69
4.	<i>Identification des auto-Ac antiplaquettes (FCIA)</i>	70
5.	<i>Mesure de la taille cellulaire</i>	71
6.	<i>Analyse cytométrique</i>	72
7.	<i>Analyse statistique</i>	74

III. RÉSULTATS.....	78
A. DESCRIPTION DES POPULATIONS ETUDIÉES	78
B. DESCRIPTION DE LA POPULATION DES PATIENTS.....	78
1. Répartition des patients selon l'âge et le sexe.....	78
2. Données cliniques et thérapeutiques des patients	80
3. Données biologiques des patients	82
C. DESCRIPTION DE LA POPULATION DES TEMOINS NORMAUX	83
D. DESCRIPTION DE LA POPULATION DES TEMOINS THROMBOPENIQUES	84
E. RECHERCHE DES PAIG PAR METHODE DIRECTE	85
1. Gating des plaquettes par un marqueur plaquettaire	85
2. Taux d'évènements CD41/CD61 positifs chez les patients et les témoins	86
3. Étude des paramètres de la taille plaquettaire MI-FSC et VPM.....	88
4. MFI IgG/IgM, témoins/patients.....	90
5. MI-FSC et MFI-IgG/IgM.....	92
6. Comparaison des résultats de la MFI et CV IgG/IgM.....	94
7. Détermination des valeurs intrinsèques du test	95
8. Détermination des valeurs extrinsèques du test.....	99
9. Analyse des résultats selon les valeurs seuils fixées	101
10. Marqueur d'activation plaquettaire CD62p	107
F. RECHERCHE DES PAIG PAR METHODE INDIRECTE	107
1. Résultats MFI IgG/IgM et CV	107
2. Interprétation des valeurs MFI obtenues.....	108
3. Comparaison de la MFI des deux méthodes : directe et indirecte	109
4. Comparaison des résultats des deux méthodes : directe et indirecte.....	110
G. TITRAGE DES PAIG	111
1. Détermination de la concentration des billes	111
2. Courbe d'étalonnage par les billes de capture.....	112
H. IDENTIFICATION DES AUTO-AC ANTIPLAQUETTAIRES	114
I. CALIBRATION D'UN NOUVEAU LOT DE REACTIF	115
1. Comparaison des MFI-IgG	115
2. Variation des MFI selon le voltage du PMT	116
3. Corrélation entre les deux réactifs.....	117
4. Ajustement du réactif 2	118
J. SUIVI DES PATIENTS PAR LA TECHNIQUE PAIG DIRECTE.....	118
1. Présentation d'un cas de suivi de PAIg	120
K. APPLICATION DE LA TECHNIQUE PAIG DANS DES CAS D'ALLO IMMUNISATION PLAQUETTAIRE.....	123
1. Cas N°1 : Thrombopénie néonatale	123
2. Cas N°2 : Allo-immunisation fœto-maternelle.....	125
L. ESTIMATION DU COUT ET DU TEMPS NECESSAIRE A LA REALISATION DE LA TECHNIQUE PAIG PAR CMF :	127
IV. DISCUSSION	129
A. LES PERFORMANCES DU DIAGNOSTIC ACTUEL DU PTI.....	129
B. DONNEES EPIDEMIOLOGIQUES.....	130
C. OPTIMISATION DE LA TECHNIQUE PAIG	132
1. Patients et témoins.....	132
2. Choix d'anticorps et marquage des plaquettes	134
3. Acquisition des données et analyse des résultats.....	135
D. PERFORMANCES ANALYTIQUES DE LA TECHNIQUE PAIG	137
1. Méthodologie d'évaluation de la technique	137
2. Performances intrinsèques du test PAIg	138
3. Performances extrinsèques du test PAIg direct	142

4. <i>Autres caractéristiques du test PAIg</i>	143
E. ÉVALUATION GENERALE DE LA TECHNIQUE PAIG DIRECTE	147
F. QUANTIFICATION DES PAIG ET SUIVI DES PATIENTS	151
G. IDENTIFICATION DES PAIG	152
CONCLUSION	153
REFERENCES	155
ANNEXES	172
ANNEXE 1 : FICHE DE RENSEIGNEMENT	173
ANNEXE 2 : INTERPRETATION DES RAPPORTS DE VRAISEMBLANCE.....	174
ANNEXE 3: DONNEES DE LA POPULATION DES PATIENTS	175

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1: MICROGRAPHIE ELECTRONIQUE D'UNE COUPE D'UN MEGACARYOCYTE MATURE AVEC UN SYSTEME D'INVAGINATION MEMBRANAIRE BIEN DEVELOPPE	5
FIGURE 2: LIBERATION DE PLAQUETTES A PARTIR DE PROPLAQUETTES.....	7
FIGURE 3: MORPHOLOGIE PLAQUETTAIRE AU REPOS(A) ET APRES ACTIVATION (B).....	9
FIGURE 4: ORGANISATION DES PHOSPHOLIPIDES DANS LA MEMBRANE PLAQUETTAIRE.....	10
FIGURE 5: STRUCTURE DE L'INTEGRINE AIIbB3	14
FIGURE 6: STRUCTURE DU COMPLEXE GPIb-IX-V.....	17
FIGURE 7: MODELE DE DECLENCHEMENT DE LA CLAIRANCE PLAQUETTAIRE.....	19
FIGURE 8: STRUCTURE DE LA GPVI.....	25
FIGURE 9: LA SIGNALISATION PLAQUETTAIRE	32
FIGURE 10: PRINCIPE DE LA TECHNIQUE MAIPA.....	50
FIGURE 12: PRINCIPE DE LA CYTOMETRIE EN FLUX.....	52
FIGURE 13: FOCALISATION HYDRODYNAMIQUE	52
FIGURE 14: LA DIFFUSION DE LA LUMIERE LASER	53
FIGURE 15: CHEVAUCHEMENT SPECTRAL ENTRE LES FLUOROCHROMES EXCITES PAR LE LASER BLEU	54
FIGURE 16: TRANSFORMATION DE LA LUMIERE EN UN SIGNAL ELECTRIQUE PAR LES PMT	55
FIGURE 11: PRINCIPE DE LA FCIA	57
FIGURE 18: SYSTEME ACOUSTIQUE DE L'ATTUNE NXT	64
FIGURE 17: CYTOMETRE ATTUNE NXT.	63
FIGURE 19: ANALYSEURS D'HEMATOLOGIE BECKMAN COULTER DXH500	64
FIGURE 20: PROCEDURE DE PREPARATION D'ECHANTILLONS POUR LA RECHERCHE DES PAIG.	68
FIGURE 21: CONCENTRATION DES BILLES DE CAPTURE	70
FIGURE 22: TECHNIQUE FCIA	71
FIGURE 23: COMPENSATION PLAQUETTAIRE BL1/BL2, SUR L'ATTUNE™ NXT.....	73
FIGURE 24: STRATEGIE DE GATING	74
FIGURE 25: REPARTITION DES PATIENTS EN CATEGORIES D'AGES	79
FIGURE 26: REPARTITION DES PATIENTS SELON LE SEXE	79
FIGURE 27: REPARTITION DES PATIENTS, NOUVEAUX/ANCIENS CAS.....	80
FIGURE 28: PRESENCE DE SYNDROME HEMORRAGIQUE DANS LA POPULATION DES PATIENTS.....	80
FIGURE 29: TRAITEMENTS DE LA POPULATION DES PATIENTS	81
FIGURE 30: LA REPOSE DES PATIENTS AUX TRAITEMENTS	81
FIGURE 31: REPARTITION DES PATIENTS SELON LA SEVERITE DE LA THROMBOPENIE	82
FIGURE 32: REPARTITION DES TEMOINS NORMAUX SELON LE SEXE.....	83
FIGURE 33: REPARTITION DES TEMOINS NORMAUX SELON LE TYPE DE DON.....	83
FIGURE 34: ASPECT DES PLAQUETTES TEMOIN SUR LES SCATTERGRAMME	85
FIGURE 35: ASPECT DES PLAQUETTES PATIENTS PTI.....	86
FIGURE 36: POURCENTAGE D'EVENEMENTS CD41/CD61 POSITIFS.....	86
FIGURE 37: CALIBRATION DE LA TAILLE PLAQUETTAIRE	89
FIGURE 38: PATIENT POSITIF IGG.....	90
FIGURE 39: PATIENT POSITIF IGM ET OVERLAY PATIENT/TEMOIN	91
FIGURE 40: MFI-IGG SELON LA MFI_FSC	92
FIGURE 41: VARIATION DE LA MFI-IGG SELON LA MFI-FSC	93
FIGURE 42: DISTRIBUTION DES VALEURS MFI IGG/IGM ET CV IGG/IGM.....	95
FIGURE 43: COURBES ROC, IGG ; IGM ET IGG+IGM	96
FIGURE 44: NOMOGRAMMES DE FAGAN.....	99
FIGURE 45: VARIATION DE LA VPP SELON LA PREVALENCE DU PTI.....	100
FIGURE 46: VARIATION DE LA VPN SELON LA PREVALENCE DU PTI	101
FIGURE 47: FREQUENCE DES ISOTYPES DE L'AC SELON LA CATEGORIE D'AGE.....	102
FIGURE 48: FREQUENCE DES ISOTYPES DE L'AC SELON LE SEXE	103
FIGURE 49: VARIATION DU TAUX DE PLAQUETTES SELON L'ISOTYPE DE L'AC.....	104

FIGURE 50: CORRELATION TAUX DE PLAQUETTES VS MFI IGG ET/OU IGM.....	105
FIGURE 51: COURBE ROC MFI_IgG+IGM VS TAUX DES PLAQUETTES <30 G/L.....	105
FIGURE 52: MESURE DE LA CONCENTRATION DES BILLES DE CAPTURE.....	111
FIGURE 53: VARIATION DE LA MFI-FITC SELON LA QUANTITE D'ANTICORPS EN PG/BILLE.....	112
FIGURE 54: COURBE D'ÉTALONNAGE PAR LES BILLES DE CAPTURE.....	113
FIGURE 55: EXEMPLE DE RECHERCHE DIRECTE DE L'ANTI-CD42B (GPIb) CHEZ UN TEMOIN.....	114
FIGURE 56: EXEMPLE D'IDENTIFICATION DE L'ANTI-CD42B CHEZ UN PATIENT PTI.....	114
FIGURE 57: VARIATION DE LA MFI SELON LE VOLTAGE PMT.....	116
FIGURE 58: COMPARAISON MFI DES DEUX REACTIFS.....	117
FIGURE 59: CORRELATION ENTRE LES VALEURS MFI DES DEUX REACTIFS.....	117
FIGURE 60: CONCORDANCE PAIG ET TAUX DES PLAQUETTES.....	120
FIGURE 61: TESTS PAIG REALISES CHEZ UNE PATIENTE PRESENTANT UN PTI REFRACTAIRE.....	121
FIGURE 62: SUIVI D'UN PTI REFRACTAIRE.....	122
FIGURE 63: TESTS PAIG DANS LE CAS D'UNE THROMBOPENIE NEONATALE.....	124
FIGURE 64: PAIG CAS D'ALLO-IMMUNISATION FÆTO-MATERNELLE.....	126
FIGURE 65: ALLO-IMMUNISATION FÆTO-MATERNELLE, DEPISTAGE DES IGG SERIQUES.....	127
FIGURE 66: STRATEGIE DE GATING.....	137
FIGURE 67: PATIENT FAIBLEMENT POSITIF IGG.....	139
FIGURE 68: PATIENT FORTEMENT POSITIF IGG.....	139
FIGURE 69: ASPECT DES PLAQUETTES SUR UN HISTOGRAMME FSC/SSC.....	143

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1: PRINCIPAUX COMPOSANTS DES GRANULES A PLAQUETTAIRES.....	12
TABLEAU 2: ALLO ANTIGENES HPA ET LEURS FREQUENCES.....	30
TABLEAU 3: CAUSES DE THROMBOPENIES ISOLEES (TAUX NORMAL DE GB).....	41
TABLEAU 4: THROMBOPENIES ASSOCIEES A UNE LEUCOPENIE OU UNE HYPERLEUCOCYTOSE.....	42
TABLEAU 5: RECOMMANDATIONS DIAGNOSTIQUES DU PTI SELON L'ASH	46
TABLEAU 6: PRINCIPALES CARACTERISTIQUES DES ETUDES DE FCIA.	58
TABLEAU 7: LISTE DES REACTIFS	65
TABLEAU 8: STATISTIQUES DESCRIPTIVES DE L'AGE DES PATIENTS	78
TABLEAU 9: REPARTITION DES PATIENTS SELON LA CATEGORIE D'AGE	78
TABLEAU 10: TAUX DE PLAQUETTES, VPM ET Hb DES PATIENTS	82
TABLEAU 11: TAUX DE PLAQUETTES, VPM ET Hb DES TEMOINS NORMAUX.....	84
TABLEAU 12: LES PATHOLOGIES DES TEMOINS THROMBOPENIQUES	84
TABLEAU 13: TAUX DE PLAQUETTES, VPM ET Hb DES TEMOINS THROMBOPENIQUES.....	85
TABLEAU 14: COMPARAISON TAUX D'EVENEMENT CD41/CD61 POSITIFS PATIENTS/TEMOINS	87
TABLEAU 15:COMPARAISON TAUX D'EVENEMENT CD41/CD61 POSITIFS (TEMOINS NORMAUX/TEMOINS THROMBOPENIQUES)	87
TABLEAU 16: TAUX DE VRAIES PLAQUETTES DANS LES THROMBOPENIES CENTRALES ET PERIPHERIQUES	87
TABLEAU 17: MFI-FSC PATIENTS/TEMOINS	88
TABLEAU 18: MFI FSC DES BILLES DE CALIBRATION	88
TABLEAU 19: TAILLES DES PLAQUETTES PATIENTS ET TEMOINS	89
TABLEAU 20: CORRELATION DE PEARSON MFI-FSC/VPM.....	90
TABLEAU 21: CORRELATION DE PEARSON ENTRE MI-FSC ET MFI-IGG	93
TABLEAU 22: STATISTIQUES DES MFI IGG/IGM ET CV	94
TABLEAU 23: SURFACES SOUS LES COURBES ROC	96
TABLEAU 24: REPARTITION DE LA POPULATION GENERALE SELON L'EXPRESSION DE L'IGG	97
TABLEAU 25: REPARTITION DE LA POPULATION GENERALE SELON L'EXPRESSION DE L'IGM.....	97
TABLEAU 26: REPARTITION DE LA POPULATION GENERALE SELON L'EXPRESSION DE L'IGM ET/OU IGG.....	98
TABLEAU 27:REPARTITION DES CAS FAUX NEGATIFS SELON LE TYPE DU PTI.....	98
TABLEAU 28: RAPPORTS DES VRAISEMBLANCES (LIKELIHOOD RATIO).....	99
TABLEAU 29: VPP ET VPN.....	100
TABLEAU 30: REPARTITION DES PATIENTS SELON L'ISOTYPE DE L'ANTICORPS ANTIPLAQUETTES	101
TABLEAU 31: ISOTYPE DE L'ANTICORPS SELON L'AGE.....	102
TABLEAU 32: STATISTIQUES DU TAUX DE PLAQUETTES SELON L'ISOTYPE DE L'AC.....	103
TABLEAU 33: CORRELATION MFI_IGG ET/OU IGM ET LE TAUX DE PLAQUETTES.....	104
TABLEAU 34: TABLEAU DE CONTINGENCE TAUX DE PLAQUETTES VS MFI.....	106
TABLEAU 35: RELATION ENTRE LES PARAMETRES BIOLOGIQUES : PTTE <30G/L ET MFI> 18.10 ³	106
TABLEAU 36: EXPRESSION DES P-SELECTINES ET CORRELATION AVEC LA MFI IGG/IGM	107
TABLEAU 37: STATISTIQUE DE LA METHODE INDIRECTE.....	107
TABLEAU 38: SENSIBILITE ET SPECIFICITE DE LA METHODE INDIRECTE	108
TABLEAU 39: RAPPORTS DES VRAISEMBLANCES DE LA METHODE INDIRECTE.....	108
TABLEAU 40: REPARTITION DES PATIENTS SELON L'ISOTYPE DE L'AC PAR METHODE INDIRECTE.....	109
TABLEAU 41: MFI IGG+IGM PAR LES DEUX METHODES	109
TABLEAU 42: EXPRESSION DES IGG PAR LES DEUX METHODES.....	110
TABLEAU 43: EXPRESSION DES IGM PAR LES DEUX METHODES.....	110
TABLEAU 44: EXPRESSION DE L'IGG ET/OU IGM PAR LES DEUX METHODES	110
TABLEAU 45: ÉTALONNAGE PAR LES BILLES DE CAPTURE	112
TABLEAU 47: CARACTERISTIQUES DES REACTIFS ANTI-IGG	115
TABLEAU 48: MFI-IGG PAR LES DEUX REACTIFS.....	115
TABLEAU 49: MFI IGG APRES CALIBRATION DU REACTIF 2	118

TABLEAU 50: SUIVI DES PATIENTS PTI.....	119
TABLEAU 51: COUT DES REACTIFS ET CONSOMMABLES UTILISES DANS LE TEST PAIG PAR CMF.....	128
TABLEAU 52: TECHNIQUES DE PAIG DIRECT PAR CYTOMETRIE EN FLUX.....	147
TABLEAU 46: DESIGNATION DES BILLES POUR LE TEST FCIA.....	152

LISTE D'ABREVIATIONS

ACD-A : Acide Citrate Dextrose Solution-A

ADAM : A Disintegrin And Metalloproteinase

ADAMTS13 : A Disintegrin And Metalloprotease With Thrombospondin Type I Repeats-13

ADCC : Cytotoxicité A Médiation Cellulaire Dépendante Des Anticorps

Ac : Anticorps

Ag : Antigène

AGH : Antiglobuline Humaine

AHAI : Anémie Hémolytique Auto-Immune

AML : Leucémie Aigue Myéloïde

AMPc : Adénosine Monophosphate Cyclique

APC : Allophycocyanine

Arg : Arginine

ASH : Société Américaine D'hématologie

BSA : Albumine Du Sérum Bovin

BSH : Société Britannique D'hématologie

BSS : Bovine Albumin Serum

CAR-T : Chimeric Antigenic Receptor - T

CCMH : Concentration Corpusculaire Moyenne en hémoglobine

CFU-Mk : Colony Forming Unit Megakaryocyte

CIVD : Coagulation Intravasculaire Disséminée

CMF : Cytométrie En Flux

C-Mpl : Myéloprolifératif Leukemia (récepteur de la thrombopoïétine)

CRP : Protéine C Réactive

CSH : Cellules Souches Hématopoïétiques

CTS : Centre de Transfusion Sanguine

CVID : Déficit Immunitaire Commun Variable

Cys : Cystéine

DAPI : 4',6-diamidino-2-phénylindole

DMS : Système De Démarcation Membranaire

EBV : Epstein Barr Virus

EDTA : Acide Ethylène Diamine Tétracétique

ELISA : Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

FCIA : Flow Cytometry Immuno Beads Essay

FDA : Food and Drug Administration

FITC : Isothiocyanate De Fluorescéine

FNAIT : Thrombopénie Allo Immune Fœtale Et Néonatale

FNS : Numération Formule Sanguine

FSC : Forward Scatter Channel

FVW : Facteur De Von Willebrand

GAH : Goat Anti Human

GB : Globule Blanc

G-CSF : Facteur De Stimulation Des Colonies De Granulocytes

GM-CSF : Facteur De Stimulation Des Colonies De Granulocytes Et Monocytes

GP : Glycoprotéine

GP IIb : Glycoprotéine IIb

GP IIIa : Glycoprotéine IIIa

GPIb : Glycoprotéine Ib

GPIbIX : Glycoprotéine IbIX

GPV : Glycoprotéine V

GPVI : Glycoprotéine VI

Hb : Hémoglobine

HCV : Virus de l'Hépatite C

HHC : Hydrocortisone

HMRUC : Hôpital Militaire Régional Universitaire De Constantine

HP : Helicobacter Pylori

HPA : Antigène Plaquettaire Humain

HTA : Hypertension Artérielle

IBLS : Immunologic Thrombopénia Bleeding Scale

IFC : Cytomètre En Flux D'imagerie

Ig : Immunoglobuline

IHC : Insuffisance Hépatocellulaire

IMS : Système D'invagination Membranaire

ISTH : Société Internationale D'hémostase Et De Thromboses

ITAM : Immunoreceptor Tyrosine-Based Activation Motif

IVIg : Immunoglobuline Intraveineuse

KHPM : Kininogène de Haut Poids Moléculaire

LBD : Ligand-Binding Domain

LLC : Leucémie Lymphoïde Chronique

LMNH : Lymphome Malin Non Hodgkinien

LR : Rapport de Vraisemblance

LRR : Répétitions Riches en Leucine

LyB : Lymphocyte B

LyT : Lymphocyte T

MACE : ELISA Capture D'antigène Modifiée

MAIPA : Immobilisation D'antigènes Plaquettaires par des Anticorps Monoclonaux

MDS : Syndrome Myélodysplasique

MFI : Intensité Moyenne de Fluorescence

MFI IgM : Intensité Moyenne de Fluorescence IgM

MFI IgG : Intensité Moyenne de Fluorescence IgG

MHPM : Multimères de Haut Poids Moléculaire

MI-FSC : Intensité Moyenne du Canal FSC

MPF : Facteur de Promotion Mitotique

MSD : Domaine Mécanosensoriel

NFS : Numération Formule Sanguine

NK : Natural Killer

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PAF : Facteur d'Activation Plaquettaire

PAIg : Immunoglobulines Associées aux Plaquettes

PBS : Tampon Salin Phosphate

PDGF : Platelet-Derived Growth Factor

PE : Phycoerythrine

PECAM : Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule

PKC : Protéine Kinase C

PMT : Photomultiplicateur

PPP : Plasma Pauvre en Plaquettes

PRP : Plasma Riche en Plaquettes

PSL : Produit Sanguin Labile

PTI : Purpura Thrombopénique Immunologique

PTT : Purpura Thrombotique Thrombopénique

Ptte : Plaquette

RAS : Rien A Signaler

RGD : Arginine-Glycine-Acide Aspartique

ROC : Receiver Operating Characteristic

ROR : Rougeole-Oreillons-Rubéole

R-TPO : Récepteur de la Thrombopoïétine

SAGM : Saline Adénine Glucose Mannitol

SAPL : Syndrome Des Antiphospholipides

SD : Déviation Standard

SDF : Facteur Dérivé des cellules Stromales

SHU : Syndrome Hémolytique Urémique

SLP : Syndrome Lymphoprolifératif

SNP : Polymorphismes Mononucléotidiques

SSC : Side Scatter Channel

TCMH : Teneur Corpusculaire Moyenne En Hémoglobine

TFH : T Follicular Helper cells

TFPI : Inhibiteur Plasmatique du Facteur Tissulaire

TGF- β : Transforming Growth Factor Beta

TIH : Thrombopénie Induite par l'Héparine

TLR : Receptors Toll-Like

TNN : Thrombopénie Néonatale

TP : Taux de Prothrombine

TPO : Thrombopoïétine

TQ : Temps de Quick

TRT : Traitement

TSH : Thyroid Stimulating Hormone

TX : Thromboxane

UC : Unstained Contrôle

V.I.H. : Virus de l'Immunodéficience Humaine

VEGF : Facteur de Croissance de l'Endothélium Vasculaire

VPM : Volume Plaquettaire Moyen

VPN : Valeur Prédicative Négative

VPP : Valeur Prédicative Positive

VWF : Facteur de Von Willebrand

Xa : Facteur X Activé

INTRODUCTION

Selon les directives de la société américaine d'hématologie (ASH) de 2011⁽¹⁾, le (PTI) «purpura thrombopénique immunologique» est un désordre auto-immun caractérisé par la destruction immunologique des plaquettes circulantes, sous un stimulus qui reste mal connu. Le PTI peut se présenter sous une forme isolée (PTI primaire) ou associée à d'autres pathologies (PTI secondaire). Ces causes secondaires incluent les désordres auto-immuns (particulièrement le syndrome des anti-phospholipides), les infections virales (HCV, HIV), et certaines prises médicamenteuses. Son incidence annuelle est de 3 à 4 cas/100000, avec une prévalence d'environ 50 cas/100000 habitants, selon des études britanniques⁽²⁾.

Le PTI primaire est défini par un taux de plaquettes inférieur à 100 G/L, en absence de toutes autres causes d'une thrombopénie. Sa physiopathologie est comparable à celle de l'anémie hémolytique auto-immune AHAI, où les cellules, sensibilisées par des anticorps à leurs surfaces, vont être détruites dans le système réticulo-endothélial⁽³⁾. Outre la destruction périphérique des plaquettes, la synthèse médullaire peut être aussi insuffisante ou inadéquate, responsable d'une aggravation de la chute de la numération plaquettaire⁽³⁾. Les auto-anticorps antiplaquettaires sont souvent des IgG dirigés contre le complexe glycoprotéique (GP) GPIIb/IIIa, et/ou le complexe GPIb/IX⁽³⁻⁶⁾.

Le diagnostic du PTI, est basé sur un fuseau d'arguments cliniques et biologiques et se pose par élimination de toutes les autres causes secondaires d'une thrombopénie^(1, 7-9). Il est fondé sur : l'historique de la pathologie⁽¹⁰⁾, l'examen clinique, ainsi que l'examen de l'hémogramme et du frottis sanguin. Cette démarche diagnostique par exclusion est parfois très longue et laborieuse, elle nécessite la réalisation d'une série d'explorations biologiques et radiologiques spécialisées surtout dans les cas complexes. En outre, les performances de ce mode de diagnostic ne sont pas très satisfaisantes, il a été montré que plusieurs patients classés initialement PTI, ont été reclassés après plusieurs mois en d'autres pathologies et inversement^(11, 12).

Le développement d'un test biologique explorant le PTI, a fait l'objet de nombreuses études où les auteurs ont cherché une éventuelle relation entre le PTI et : les anticorps antiphospholipides et antinucléaires, le dosage de la thrombopoïétine ou bien les paramètres plaquettaires mesurés par les analyseurs d'hématologie. Cependant tous ces tests ont été considérés comme insuffisants par l'ASH (société américaine d'hématologie) pour la mise en routine dans le diagnostic du PTI, selon les dernières directives de 2011 et ses mises à jour de 2019⁽¹³⁾. Néanmoins, parmi ces tests, la recherche des anticorps antiplaquettes fournit des résultats de plus en plus satisfaisants, et commence à être utilisée en routine par plusieurs laboratoires. Bien que la recherche d'anticorps antiplaquettes n'est pas recommandée à nos jours dans la démarche diagnostique validée par la société américaine d'hématologie l'ASH⁽¹⁾ et la société britannique d'hématologie BSH⁽⁸⁾, ce test commence d'être utilisé davantage, essentiellement dans les pays asiatiques. Les sociétés

japonaises et chinoises recommandent la recherche des anticorps antiplaquettes dans les cas complexes uniquement, mais pas pour l'usage en routine⁽⁷⁾.

La cytométrie de flux (CMF), a émergé à partir des années 70 s, comme un outil très puissant dans l'étude des antigènes de membranes cellulaires, et intracytoplasmiques par l'utilisation des anticorps couplés aux fluorochromes. C'est une technique rapide, performante, très objective et ne requière qu'un petit volume d'échantillon, elle est également réalisable même pour les prélèvements pauvres en cellules. La CMF a donc écarté les problèmes relatifs à la radioactivité des méthodes RIA (radio immuno assay), et à la richesse plaquettaire de la MAIPA directe (monoclonal antibody immobilization of platelet antigens).

La CMF, utilisant des anticorps fluorescents, a permis la détection des immunoglobulines associées aux membranes plaquettaires appelées PAIg (Platelet associated immunoglobulin). Une technique très prometteuse qui peut être appliquée pour le dépistage du PTI, selon les nombreuses études réalisées. D'autres versions modifiées de la recherche des PAIg ont permis une quantification des PAIg, en utilisant une calibration à base de microbilles fluorescentes ou des plaquettes témoins positives sensibilisées par des Ig de surface. L'utilisation des microbilles dans les études récentes a permis l'identification des GP plaquettaires, cibles des auto-anticorps, la technique est appelée FCIA (flow cytometry immunobead assay).

Bien que la technique de la recherche des PAIg par CMF est une technique très sensible, simple et applicable en routine dans les laboratoires d'analyses médicales, les résultats obtenus par les différents auteurs depuis les années 70 du siècle précédent à nos jours restent très divergents. La sensibilité de la technique était de bonne à excellente, cependant la spécificité était variable de l'acceptable à la mauvaise en raison de la fixation non spécifique des immunoglobines à la surface plaquettaire. Ce problème constitue le principal argument pour lequel le test de PAIg par CMF, n'est pas encore validé pour l'usage en routine comme un outil diagnostique du PTI.

Dans ce travail, nous commençons par une revue de la littérature, pour bien illustrer la physiologie plaquettaire et la physiopathologie du PTI d'une part, et essentiellement afin d'analyser soigneusement les différentes études qui ont appliqué la CMF pour la recherche des PAIg d'autre part. Une fois toutes les informations nécessaires ont été collectées, nous passons à la partie pratique, où nous avons optimisé une technique de recherche de PAIg d'une spécificité acceptable, dans la perspective d'être validée et introduite dans la démarche diagnostique du PTI

REVUE DE LA LITTERATURE

I. PLAQUETTES, STRUCTURES ET FONCTIONS

A. Thrombopoïèse

C'est l'ensemble des mécanismes contribuant à une synthèse continue et régulée des plaquettes. La thrombopoïèse fait partie d'un processus global, appelé : hématopoïèse. Les cellules souches hématopoïétiques (CSH) résident au niveau de la moelle osseuse, cependant durant le développement embryonnaire jusqu'à la naissance, elles se logent successivement au niveau du sac vitellin ; le foie fœtal et la rate^(14, 15).

1. Développement mégacaryocytaire

Dans le modèle classique de l'hématopoïèse, la CSH est dotée d'une capacité d'autorenouvellement et de totipotence, elle donne naissance aux progéniteurs multipotents (myéloïdes et lymphoïdes) avec perte progressive de l'autorenouvellement. Ensuite, les progéniteurs bipotent (Mégacaryocytaire-Erythrocytaire) et (granulocytaire-monocytaire) donnent naissance aux progéniteurs unipotents. Le progéniteur mégacaryocytaire continue sa différenciation jusqu'à la libération de plaquettes matures⁽¹⁶⁾. Néanmoins, les études récentes ont démontré que les progéniteurs mégacaryocytaires peuvent avoir d'autres modèles de synthèse sans passage par les progéniteurs multi ou bipotents^(14, 15). Un développement des mégacaryocytes a été mis en évidence où la CSH s'engage en un progéniteur lymphoïde primaire multipotent (lympho-myéloïde) avec perte du potentiel mégacaryocytaire et érythrocytaire, dans ce modèle le progéniteur Mégacaryocytaire-Erythrocytaire provient directement de la CSH⁽¹⁷⁾. En outre l'engagement des CSH dans la lignée mégacaryocytaire peut se faire directement, sans passage par les progéniteurs multi ou bipotent, dans ce modèle les CSH donnent naissance à un progéniteur unipotent mégacaryocytaire⁽¹⁸⁾. Cependant les études récentes *in-vivo* et *in vitro* de culture des CSH ou des progéniteurs mégacaryocytaires restreints ont démontré que le développement des mégacaryocytes à partir des CSH se fasse selon les trois modèles simultanément, donc en mode classique avec les divisions binaires ; en générant un progéniteur bipotent Méga-Erythro ou enfin directement en un progéniteur mégacaryocytaire⁽¹⁵⁾.

Les progéniteurs mégacaryocytaires expriment le CD34, et leur engagement dans la lignée mégacaryocytaire est indiqué par l'expression du CD61 (intégrine $\beta 3$) et le CD41 (intégrine $\alpha 11b$). Ces progéniteurs sont divisés en deux colonies selon leurs capacités fonctionnelles. Le mégacaryocyte (burst-forming cell), qui est un progéniteur primitif, provient d'un progéniteur bipotent Méga-Erythrocytaire, il ressemble morphologiquement aux petits lymphocytes et il peut donner naissance à environ 40 à 500 mégacaryocytes matures après une semaine de prolifération. Le mégacaryocyte (colony-forming cell) est un progéniteur plus mature que le précédent, il peut se développer en 3 à 50 mégacaryocytes matures^(15, 19).

Bien que les mégacaryocytes colony-forming et burst-forming cells, expriment tous le CD34, l'antigène HLA-DR est exprimé uniquement par les mégacaryocytes colony-forming cells⁽²⁰⁾.

Trois précurseurs mégacaryocytaires sont identifiables morphologiquement, dont le premier est le mégacaryoblaste⁽¹⁵⁾. Le deuxième est le prémégacaryocyte ou bien mégacaryocyte stade I, est une cellule plus mature avec des caractéristiques morphologiques plus distinctes. Le dernier précurseur est le promégacaryocyte qui est une cellule de grande taille de 20 à 80 µm, avec un cytoplasme polychromatophile et agranulaire.

2. Endomitose et maturation mégacaryocytaire

Le mégacaryocyte effectue des endomitoses, par la réalisation de multiples cycles de réplication de l'ADN sans divisions cellulaires⁽²¹⁾. Le nombre de cycles d'endomitoses peut varier de deux à six, mais généralement le mégacaryocyte effectue trois cycles pour atteindre un contenu d'ADN de 16N. Dans la majorité des cellules de l'organisme, la réplication de l'ADN et la division cellulaire sont finement régulées et synchronisées. Le mégacaryocyte semble faire l'exception, où il dispose d'un mécanisme qui empêche son engagement dans la division cellulaire. La plupart des études qui se sont focalisées sur ce phénomène de polyploïdisation mégacaryocytaire, le relient avec une diminution de l'activité du facteur de promotion mitotique (MPF). Le MPF possède une activité kinase nécessaire pour l'engagement de la cellule en un cycle mitotique⁽¹⁵⁾. Néanmoins d'autres études réalisées sur certaines lignées mégacaryocytaires en culture, ont mis en évidence une activité MPF normale, ce qui rend la compréhension du rôle du MPF dans la division cellulaire plus complexe⁽²²⁾.

Une fois les cycles d'endomitoses sont accomplis, la maturation mégacaryocytaire commence par la synthèse de protéines spécifiques des plaquettes ; les organelles et le système membranaire qui va être à l'origine des plaquettes par la suite. Durant ce stade de maturation, le cytoplasme mégacaryocytaire va développer un système d'invagination membranaire (IMS) ; un système tubulaire dense et des granules.

Le système d'invagination membranaire (IMS) appelé également (système de démarcation membranaire DMS), est une extension du réseau membranaire à l'intérieur du cytoplasme (Figure 1), l'initiation de l'IMS commence à partir du stade promégacaryocyte, et il est bien développé au stade du mégacaryocyte mature. L'IMS joue un rôle capital dans le phénomène de formation plaquettaire à partir des mégacaryocytes, il a été longtemps proposé que ce système délimite le territoire des futures plaquettes⁽²³⁾. Néanmoins les études récentes ont démontré que le principal rôle de l'IMS est de construire une réserve membranaire indispensable pour la formation des plaquettes⁽²⁴⁾.

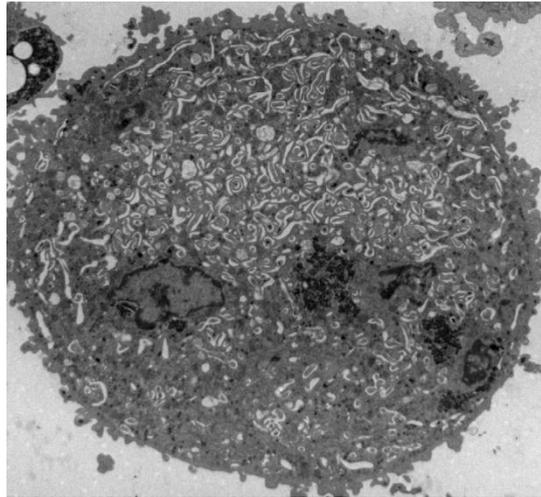


Figure 1: micrographie électronique d'une coupe d'un mégacaryocyte mature avec un système d'invagination membranaire bien développé Par Machlus, et al (15)

Durant sa maturation le mégacaryocyte développe également un système tubulaire dense, qui va devenir le lieu de synthèse des prostaglandines et du thromboxane, ainsi que le stockage du calcium par les plaquettes. La maturation est caractérisée également par l'apparition progressive des granules intracytoplasmiques, les plus abondantes ce sont les granules α qui contiennent des protéines nécessaires à l'adhésion plaquettaire et des substances procoagulantes. Les granules denses sont moins abondantes et contiennent des substances hémostatiques libérées au moment de l'activation plaquettaire⁽²⁵⁾.

3. Formation des plaquettes

Il est admis que les plaquettes sanguines proviennent principalement de mégacaryocytes au niveau de la moelle osseuse. Cependant il a été démontré qu'ils peuvent migrer dans la circulation sanguine, par conséquent la synthèse des plaquettes peut avoir lieu dans des sites extramédullaires, comme le poumon⁽²⁶⁾ et le sang⁽²⁷⁾. Le mécanisme exact de formation a fait l'objet de plusieurs études, dont trois principaux modèles ont été proposés : le bourgeonnement plaquettaire ; la fragmentation via l'IMS et la formation des proplaquettes. La découverte de la thrombopoïétine (TPO), cytokine responsable de la stimulation et de la croissance des précurseurs plaquettaires, a permis la culture des précurseurs mégacaryocytaires *in vitro*, ce qui a amélioré nos connaissances sur le mécanisme de la libération plaquettaire⁽¹⁵⁾.

a) **Bourgeonnement de la surface mégacaryocytaire**

Cette théorie est basée, sur l'observation en microscopie électronique, de mégacaryocytes matures renfermant à leur surface des bourgeons qui ressemblent aux plaquettes sanguines⁽²⁸⁾. L'étude de ces structures par des coupes fines sur microscope électronique a montré que les bourgeons ne contiennent pas les organelles plaquettaires, ce

qui est incompatible avec un mécanisme de libération plaquettaire. Il semble que ces bourgeons ont été confus avec le début du mécanisme de formation proplaquettaire.

b) *Fragmentation via le système d'invagination membranaire*

La microscopie électronique a montré que le cytoplasme des mégacaryocytes matures est rempli d'organelles spécifiques des plaquettes et d'un réseau de membrane. Il a été proposé que ce réseau de membrane qui constitue l'IMS délimite les territoires des futures plaquettes. Le mégacaryocyte subit une fragmentation au long des lignes de l'IMS⁽²⁹⁾. La présence d'un réseau marginal tubulaire est l'une des caractéristiques les plus spécifiques des plaquettes, il a été démontré que ces tubules marginaux sont absents au niveau des territoires délimités par l'IMS. Cette absence des tubules est contradictoire avec la libération des plaquettes à partir de la fragmentation via l'IMS. Bien qu'il ait été admis, que le réseau d'IMS est indispensable pour la libération des plaquettes, son principal rôle est de construire une réserve en membrane pour la formation proplaquettaire.

c) *Formation proplaquettaire*

Les proplaquettes sont une formation qui représente une étape intermédiaire entre le mégacaryocyte et les plaquettes. Elles sont caractérisées par des petits gonflements à la taille d'une plaquette, reliés entre eux par une fine membrane cytoplasmique⁽³⁰⁾. Ces prolongements qui se forment à partir du mégacaryocyte, ressemblent à des pseudopodes et peuvent atteindre plus qu'un millimètre de longueur, pour finir dans les sinus sanguins. La formation de ces élongations débute par une formation microtubulaire au niveau du corps cellulaire. Ces microtubules, en glissant les uns le long des autres, permettent l'élongation de bras de cytoplasme, l'actine et la myosine intervenant dans la formation des renflements qui correspondent aux futures plaquettes. Certains médicaments comme le Nocodazole ou la Vincristine dépolymérisent les microtubules et bloquent la formation de proplaquettes.

d) *Libération de plaquettes*

Les proplaquettes une fois libérées dans le sang, elles deviennent des préplaquettes qui apparaissent sous forme de plaquettes géantes de 3 à 10 μm . Ces préplaquettes conservent leur capacité à se transformer en proplaquettes en forme d'haltères (deux gonflements reliés par une fine membrane), ensuite elles subissent une fission afin de libérer les plaquettes⁽³¹⁾. L'élongation des microtubules préplaquettaires et la fission sont les phénomènes responsables de la taille finale des plaquettes. Ainsi un médicament inhibiteur du glissement de microtubules est à l'origine d'une augmentation de la taille des plaquettes circulantes. Un échec de fission plaquettaire bloque la transformation des préplaquettes en proplaquettes d'haltères, il est observé également dans certaines marcothrombopénies héréditaires.

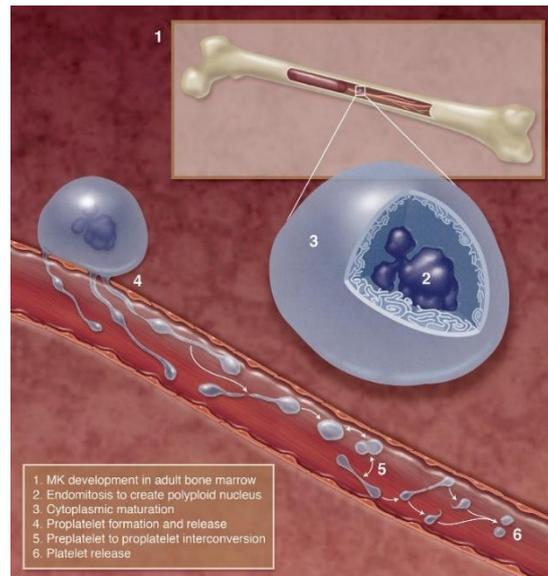


Figure 2: Libération de plaquettes à partir de proplaquettes.

(1) Cellules souches hématopoïétiques dans la moelle osseuse se différencient en mégacaryocytes. (2) Les mégacaryocytes subissent des endomitoses. (3) la membrane des mégacaryocytes matures est hautement invaginée partout dans le cytoplasme. (4) Mégacaryocytes dans la niche vasculaire étendent les proplaquettes dans les sinusoides vasculaires. (5) Une fois dans la circulation sanguine, les plaquettes se transforment en préplaquettes. (6) Un événement de fission crée deux plaquettes d'une proplaquette d'haltères⁽¹⁵⁾.

4. Régulation

a) Thrombopoïétine TPO

La TPO est la principale cytokine impliquée dans le processus de production plaquettaire, elle est produite principalement au niveau du foie, néanmoins certaines quantités de TPO peuvent être produites dans d'autres organes comme les reins et les cellules stromales médullaires⁽³²⁾. Le gène de la TPO est situé sur le chromosome 3 dans la région q26-q27⁽³³⁾, codant pour un polypeptide de 353 acides aminés. La TPO est organisée en deux domaines, dont le domaine N-terminal de 154 acides aminés, porte l'activité biologique de la molécule et présente une grande homologie structurale avec l'érythropoïétine (EPO)^(32, 34), ce domaine assure la fixation de la TPO à son récepteur C-Mpl.

La TPO est une hormone indispensable pour la différenciation mégacaryocytaire, la prolifération de progéniteurs et la maturation de mégacaryocytes⁽³⁵⁾. En absence de TPO, la formation des CFU-Mk est complètement avortée. Outre son rôle dans les stades précoces, la TPO joue un rôle dans la maturation mégacaryocytaire également par, augmentation de la taille, la ploïdie et l'expression des GP spécifiques GP IIb/IIIa au niveau du mégacaryocyte⁽³⁶⁾. D'autres études ont démontré que la TPO induit une augmentation de synthèse de membrane de démarcation et de granules plaquettaires, suggérant que cette hormone est

essentielle pour la formation plaquettaire. Cependant elle n'a pas d'effet sur le stade final de formation proplaquettaire et libération de plaquettes⁽³⁴⁻³⁶⁾.

Le taux sérique de la TPO augmente en cas de thrombopénie, ce qui stimule toutes les cellules de lignée mégacaryocytaire pour une régénération rapide et efficace. Cette variation du taux de la TPO est régulée par un mécanisme de feed-back négatif. Étant donné que les plaquettes circulantes sont très riches en récepteurs C-Mpl, elles fixent et neutralisent une quantité importante de TPO (*la TPO se fixe, mais n'a pas d'effet sur les plaquettes matures*). En cas de thrombopénie, la fraction de TPO neutralisée par les plaquettes diminue, et la fraction libre augmente et vice versa^(32, 34, 35). Cependant, des discordances entre la numération plaquettaire et le taux sérique de TPO ont été rapportées dans certaines situations⁽³⁷⁾. La première est observée au cours des thrombopénies par destruction plaquettaire où le taux de la TPO n'est pas vraiment augmenté malgré l'effondrement du taux de plaquettes. Cette situation caractérise la plupart des thrombopénies immunologiques avec une augmentation de la richesse médullaire en mégacaryocytes. Ces mégacaryocytes contribuent probablement à la régulation du taux de la TPO. La deuxième situation est enregistrée au cours des thrombocytose inflammatoires, où le taux sérique de TPO est élevé malgré l'augmentation du taux de plaquettes. Une altération probable de la production de la TPO peut être à l'origine de la thrombocytose inflammatoire, mais le mécanisme exact n'est pas encore élucidé.

b) Autres facteurs de régulation

Des études expérimentales de neutralisation génétique totale de la synthèse de la TPO ont démontré une persistance d'une production résiduelle de plaquettes aux alentours de 10%. Cette synthèse plaquettaire suggère l'existence d'autres mécanismes de stimulation de la thrombopoïèse TPO indépendants⁽³⁷⁾. Des cytokines comme l'IL3, IL6, IL11, LIF (*leukemia inhibiting factor*), c-Kit ligand, GM-CSF et G-CSF, peuvent agir directement ou en association avec la TPO^(37, 38). Cependant, le facteur 1 dérivé des cellules stromales de la chimiokine (SDF-1) exerce de nombreuses influences sur la mégacaryopoïèse, et des études indiquent qu'il pourrait être responsable d'une thrombopoïèse non liée à la thrombopoïétine⁽³⁷⁾. En cas de thrombopénie sévère, il a été noté l'augmentation de l'ARNm de TPO au niveau des cellules stromales médullaires. Cette variation est régulée par certains médiateurs humoraux ou cellulaires. Par exemple, les protéines des granules α plaquettaires PDGF et FGF-2 augmentent la synthèse de la TPO, tandis que le facteur 4 plaquettaire, la thrombospondine et le TGF- β diminuent la synthèse de la TPO.

B. Morphologie plaquettaire

La plaquette est la plus petite cellule dans la circulation sanguine. Il s'agit d'une cellule discoïde biconvexe (ressemble aux lentilles), de taille qui varie de 2 à 4 μm , anucléé et granulaire⁽³⁹⁾. Les plaquettes possèdent la durée de vie la plus courte dans le sang (8 à 10

jours), par rapport aux autres cellules hématopoïétiques. Elles circulent dans le sang sous deux formes. Une forme activée et une forme de repos. À l'état normal, la majorité des plaquettes restent en état de repos durant toute leur vie, jusqu'à leur élimination (Figure 3)

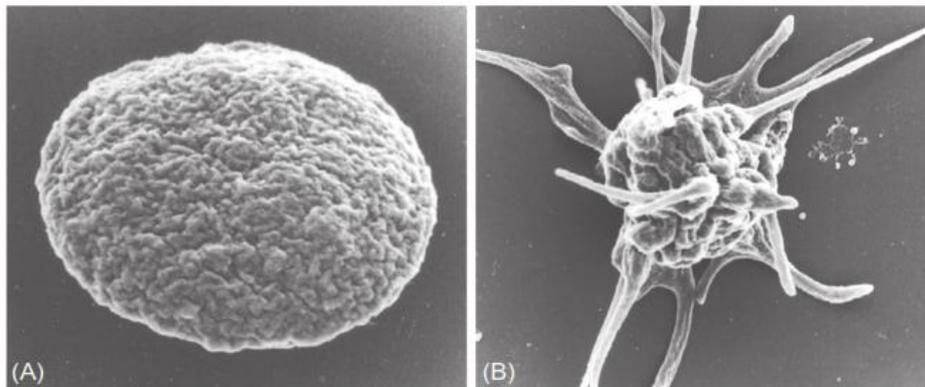


Figure 3: Morphologie plaquettaire au repos(A) et après activation (B) (39)

1. La membrane plasmique et le cytosquelette

La membrane plasmique plaquettaire ressemble au modèle classique des membranes cellulaires. Cependant, elle a des particularités qui lui permettent d'assurer plusieurs fonctions critiques au cours de l'activation et l'agrégation plaquettaire. La bicouche lipidique membranaire est composée de plusieurs types de phospholipides, principalement : phosphatidylcholine, phosphatidylsérine, phosphatidyléthanolamine ainsi que des quantités importantes de sphingomyéline sphingolipide et le cholestérol⁽⁴⁰⁾. La répartition de ces différents phospholipides est asymétrique de part et d'autre de la membrane plasmique. Ainsi, les PS et PE sont insérés dans le feuillet interne de la plaquette à l'état de repos. Cette asymétrie est assurée par un système enzymatique Flipase/Flopase ATP dépendant⁽⁴¹⁾ (figure 4). La membrane plasmique plaquettaire à l'état de repos est donc inappropriée à la fixation des facteurs de la coagulation. Elle contient également un nombre considérable de molécules de signalisation comme : le 1,2-diacylglycérol (DAG), inositol triphosphate (IP3), eicosanoïdes / prostaglandines (PG)⁽⁴⁰⁾.

La surface extérieure de la membrane plaquettaire contient une couche de glycoprotéines et glycolipides appelée « Glycocalyx » qui joue un rôle important dans les fonctions physiologiques de la plaquette (figure 4). Le glycocalyx est chargé négativement, ce qui empêche l'interaction des plaquettes entre elles ; avec les autres cellules sanguines et avec les cellules endothéliales, afin d'éviter toute activation accidentelle des plaquettes dans la circulation⁽⁴²⁾. De plus, cette charge négative permet la capture de certaines molécules plasmatiques à la surface des plaquettes et leurs endocytose et stockage au niveau des granules plaquettaires, comme le cas du fibrinogène des granules alpha plaquettaires⁽⁴³⁾. La plaquette renferme un important glycocalyx, en rapport avec le grand nombre et les divers

types de récepteurs de surface. Il a été suggéré que le glycocalyx joue un rôle clé dans la régulation de la durée de vie des plaquettes, par le changement dans la composition de l'acide sialique (plus exactement de la GPIb), induisant leur destruction hépatique par le biais des récepteurs d'Ashwell–Morell ⁽⁴⁴⁾.

Au sein de la membrane plasmique plaquettaire, les principaux complexes glycoprotéiques (GPIb-IX et GPIIb/IIIa) sont mobiles⁽⁴⁵⁾. Cette capacité de mouvement facilite l'interaction entre la GPIb-IX et le facteur de Von Willebrand et permet d'absorber l'énergie cinétique induite par la plaquette en mouvement au moment de sa fixation à l'endroit de la brèche vasculaire. Sans cette mobilité des récepteurs, la plaquette risque de ne pas bien se fixer et de rebondir.

Le cytosquelette plaquettaire est au-dessous du feuillet interne de la membrane plasmique. Composé principalement de spectrine, d'actine et de tubuline. Le cytosquelette joue deux grands rôles dans la plaquette. À l'état de repos, il assure le maintien de la forme discoïde de la plaquette et préserve l'intégrité de la plaquette face aux forces de cisaillement de circulation sanguine. Une fois la plaquette est activée, le cytosquelette devient très dynamique pour répondre aux besoins physiologiques de la plaquette dont ; l'émission de pseudopode ; changement de forme et formation d'agrégats. ⁽³⁹⁾

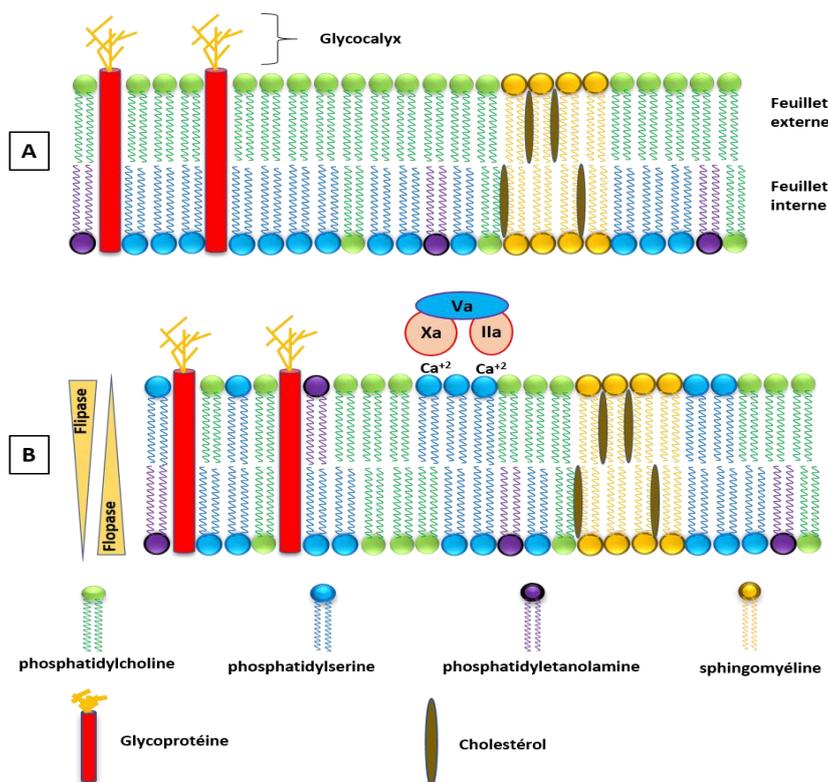


Figure 4: organisation des phospholipides dans la membrane plaquettaire

A : répartition asymétrique des phospholipides à l'état de repos

B : répartition en cas d'activation plaquettaire, exposition des phosphatidylserines à la surface et formation d'une surface procoagulante

2. Systèmes membranaires internes :

À l'état de repos, la plaquette possède des systèmes membranaires internes, dont le système canaliculaire ouvert et le système tubulaire dense. Le système canaliculaire ouvert est une forme d'extension de la membrane plasmique extérieure vers l'intérieur de la cellule, tandis que le système tubulaire dense est formé à partir du réticulum endoplasmique.

a) *Le système canaliculaire ouvert (SCO) :*

Il s'agit d'une invagination de la membrane plasmique plaquettaire, dans le milieu intracellulaire. Il traverse toute la plaquette et il est connecté à la surface. Le mécanisme de formation de ce système n'est pas certain, mais il peut être lié au système de démarcation membranaire de mégacaryocytes⁽⁴⁶⁾. Ce système joue un rôle important pour les fonctions physiologiques de la plaquette à l'état de repos et après activation. Par sa connexion à la surface, il fournit d'une part ; un accès des composants de l'environnement extracellulaire pour atteindre le milieu interne à l'état de repos ; d'autre part, il permet la libération du contenu des granules intraplaquettaires (granules alpha et denses) vers le milieu extérieur lors de l'activation plaquettaire⁽⁴⁷⁾. Outre les échanges dans les deux sens, le SCO représente également une réserve importante en membrane plasmique pour la plaquette. Cette réserve sera utilisée au moment de l'extension et l'émission de pseudopode par la plaquette au cours de son activation, où la plaquette nécessite une grande augmentation de sa surface (jusqu'à 420%)⁽⁴⁸⁾.

b) *Le système tubulaire dense (STD) :*

Le système tubulaire dense est un compartiment membranaire différent du SCO. Il est né à partir du réticulum endoplasmique mégacaryocytaire et distribué d'une façon aléatoire dans le cytoplasme plaquettaire. Le STD représente le principal lieu de stockage du calcium intraplaquettaire⁽⁴⁹⁾. Le STD joue également un rôle important dans la génération des prostaglandines par les plaquettes⁽⁵⁰⁾.

3. Les granules plaquettaires :

La plaquette apparaît au microscope optique après coloration, comme une cellule contenant un nombre important de granulations. La synthèse des granules plaquettaires commence au niveau des mégacaryocytes, mais leur maturation continue même dans le sang circulant. Elles jouent un rôle important dans le processus de l'hémostase primaire. La sécrétion du contenu granulaire en milieu extérieur est une étape clé au moment de l'activation plaquettaire et la formation d'agrégat. La microscopie électronique a mis en évidence une diversité de granulation, dont trois principaux types : les granules α ; les granules denses et les lysosomes⁽³⁹⁾.

a) **Les granules α :**

Les granules α sont les organelles intraplaquettaires les plus importantes et abondantes. Elles sont généralement de forme ronde à ovale ; de taille comprise entre 200 à 500 nm de diamètre ; d'un nombre de 40 à 80 granules par plaquette et distribuées partout dans la cellule ⁽⁵¹⁾. Les granules α sont synthétisées à partir du réticulum endoplasmique du mégacaryocyte par une voie qui implique le réseau transgolgien, les étapes de maturation impliquent la capacité du mégacaryocyte et de la plaquette à endocyter les protéines plasmatiques. Les granules α sont délimitées par une membrane qui contient une molécule d'adhésion cellulaire très spécifique (P-selectine). La mise en évidence des P-selectines à la surface plaquettaire par cytométrie en flux est le témoin d'une activation plaquettaire et libération du contenu granulaire ⁽⁵²⁾. L'endocytose plaquettaire est indispensable pour charger les granules α par certaines protéines telles que : le fibrinogène, les immunoglobulines, le facteur V de la coagulation et les facteurs de croissance tels que le VEGF (*facteur de croissance de l'endothélium vasculaire*) ⁽⁵³⁾.

Tableau 1: principaux composants des granules α plaquettaires⁽⁵⁴⁾

Fonction physiologique/type	Protéines des granules α
GP membranaire	GPIb-IX-V, GPVI, P-selectine
Hémostase	FV, FIX, FXIII Antithrombine, Protéine S, TFPI Plasminogène, PAI-1
Molécules d'adhésion	Fibrinogène, VWF, Thrombospondine
Facteurs de croissance	VEGF (<i>endothélium vasculaire</i>), Facteur de croissance de fibroblastes Facteur de croissance épidermique Facteur de croissance d'hépatocytes
Chimiokines	CXCL1 (GRO- α), CXCL4 (PF4), CXCL5 (ENA-78), CXCL8 (IL-8), CXCL12 (SDF-1 α), CCL2 (MCP-1), CCL3 (MIP-1 α).
Protéines microbicides	Thymosine- β 4, thrombocidine 1 et 2

Les granules α contiennent à la fois des protéines liées à la membrane, qui vont être exprimées à la surface des plaquettes activées, et des protéines solubles libérées dans le milieu extracellulaire au moment de l'activation plaquettaire. Les protéines liées à la membrane comprennent les intégrines (α IIb, α 6, β 3) ; les récepteurs de la famille des immunoglobulines (GPVI, récepteur Fc, PECAM) ; tétraspanines (comme CD9) et d'autres récepteurs (comme

CD36)⁽⁵⁵⁾. Plus de 300 protéines solubles sont libérées à partir des granules α ⁽⁵⁶⁾, dont les fonctions sont très divergentes, principalement impliquées dans la coagulation sanguine ;

l'adhésion cellulaire ; l'inflammation ; la croissance cellulaire et la défense de l'hôte (Tableau 1).

b) Les granules denses :

Les granules denses (*granules δ*) sont des organites spécifiques des plaquettes. Elles sont nommées ainsi parce qu'elles apparaissent très denses en microscopie électronique. Elles sont plus petites et moins abondantes que les granules α , en moyenne une plaquette contient 3 à 8 granules denses d'environ 150 nm de diamètre⁽⁵⁷⁾. Elles dérivent du système endosomal, partageant ainsi certaines caractéristiques avec les lysosomes telles que le pH acide et des protéines membranaires comme le CD63. Les granules denses contiennent une forte concentration de certaines molécules, comme les nucléotides Adénine qui sont concentrés à 653 mM pour l'ADP et 436 mM pour l'ATP ; le calcium qui se retrouve à 2,2 mM⁽⁵⁸⁾. Elles contiennent également des amines bioactives telles que la sérotonine et l'histamine.

c) Les lysosomes :

Les plaquettes renferment également des lysosomes contenant des enzymes dégradantes. Ce sont des organites très hétérogènes, généralement sphériques que la taille est comprise entre 200 et 250 nm de diamètre. Les lysosomes sont liés à la membrane en nombre de 0 à 3 copies par plaquette⁽⁵⁹⁾. Les lysosomes plaquettaires, comme les lysosomes d'autres types cellulaires, contiennent des enzymes impliquées dans la dégradation des protéines, glucides, et lipides. La classe la plus abondante est l'acide hydrolases.

C. Les récepteurs membranaires plaquettaires

Les récepteurs plaquettaires déterminent leur identité cellulaire spécifique et assurent le contact des plaquettes entre elles, et avec le milieu extérieur. Ils sont responsables de la réactivité des plaquettes avec une large gamme d'agonistes et de protéines adhésives. Les plaquettes sont des cellules anucléées incapables d'assurer une synthèse protéique, afin de s'adapter aux différentes situations physiologiques. Les plaquettes renferment une grande variété de molécules et de protéines membranaires, représentant une grande proportion de leur masse par rapport aux autres cellules de l'organisme. Les principaux récepteurs membranaires jouent un rôle direct dans le processus de l'hémostase, cependant il existe plusieurs autres récepteurs dont le rôle est encore indéterminé, et sans doute d'autres restent à découvrir. Les différents récepteurs plaquettaires peuvent être regroupés en plusieurs classes.

1. Les intégrines :

Les intégrines sont une classe majeure de molécules adhésives et de signalisation présente sur la plupart des types de cellules. Ce sont des hétérodimères, résultants de l'association non covalente de sous unités α , et β et sont généralement impliqué dans la

liaison des molécules adhésives au cytosquelette cellulaire. Trois familles d'intégrines ont été identifiées sur la surface de plaquettes : $\beta 1$ (CD29), $\beta 2$ (CD18) et $\beta 3$ (CD61)⁽⁶⁰⁾.

a) $\alpha\text{IIb}\beta 3$

$\alpha\text{IIb}\beta 3$ (CD41/CD61 - complexe GPIIb-IIIa) est la seule intégrine exprimée uniquement sur les plaquettes. C'est la principale intégrine plaquettaire (et récepteur) avec 80 000 à 100 000 copies par plaquette⁽⁶¹⁾. La membrane des granules α plaquettaire contient également la $\alpha\text{IIb}\beta 3$, ce pool peut être exposé à la surface après activation plaquettaire⁽⁶²⁾.

Comme toutes les intégrines, $\alpha\text{IIb}\beta 3$ est un hétérodimère qui se compose d'une sous-unité αIIb et une $\beta 3$ associées de manière non covalente. Les deux sous-unités sont le produit de deux gènes adjacents sur le chromosome 17⁽⁶³⁾. Les deux sous-unités sont synthétisées sous forme de polypeptide glycosylé. La sous-unité αIIb (GPIIb) est composée de 1008 acides aminés, tandis que la sous-unité $\beta 3$ (GPIIIa) contient 762 acides aminés⁽⁶⁴⁾. Chaque sous-unité est composée d'un large domaine extracellulaire avec un court domaine cytoplasmique, et elles sont exprimées dans une orientation de type 1 où la région N-terminale est située dans le domaine intracellulaire (Figure 5).

La $\alpha\text{IIb}\beta 3$ peut se lier à plusieurs ligands, comme les protéines de la matrice extracellulaire : fibrinogène, fibronectine, vitronectine, thrombospondine-1 et VWF.

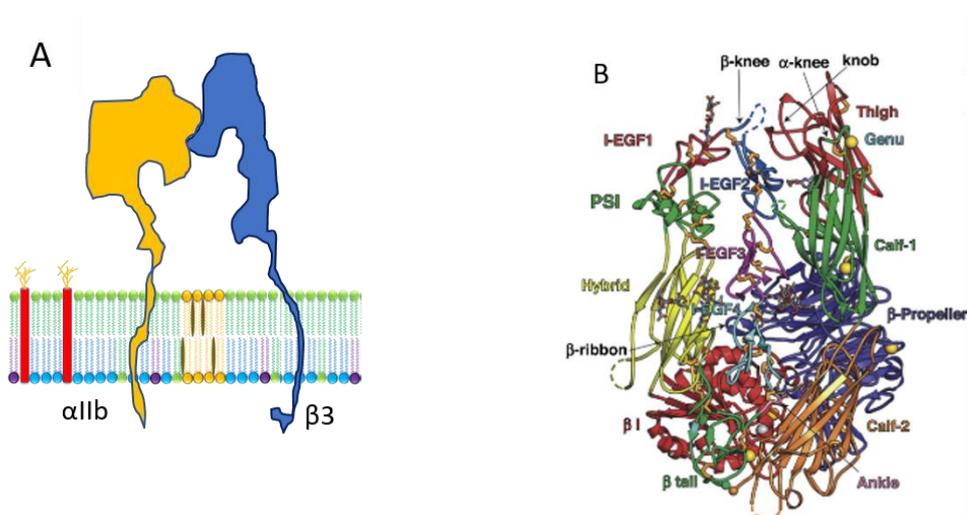


Figure 5: structure de l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta 3$

A : schéma représentatif des domaines intracytoplasmiques et extracellulaires des sous-unités αIIb et $\beta 3$

B : Diagramme de dessin animé de la molécule 1 in $\alpha\text{IIb}\beta 3$ crystals. Les ions Ca^{2+} et Mg^{2+} sont représentés respectivement par des sphères d'or et d'argent. Les disulfures sont représentés sous forme de bâtonnets d'or, et les glycanes sont présentés sous forme de bâtonnets plus minces avec des charbons gris. Les extrémités C et N sont représentées sous forme de petites sphères. Les boucles avec une densité manquante sont représentées par des tirets Adapté à partir de Zhu J, et al 2008 (60).

La $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ reconnaît une petite séquence peptidique, Arg-Gly-Asp (RGD), présente dans la majorité de ses ligands. Cette séquence (RGD) est également reconnue par plusieurs d'autres intégrines⁽⁶⁵⁾. Le fibrinogène et le FVW, les principaux ligands responsables de l'agrégation plaquettaire, contiennent des séquences RGD, qui peuvent être également reconnues par d'autres intégrines. Cependant les observations récentes n'indiquent pas si la $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ reconnaît ses deux principaux ligands uniquement par leurs séquences RGD, ou que les deux se fixent à la $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ au niveau du même site. La $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ peut utiliser d'autres sites pour engager le fibrinogène⁽⁶⁶⁾.

L'affinité de la $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ pour ses ligands est variable. Un changement de conformation du domaine extracellulaire est nécessaire pour améliorer son affinité aux ligands solubles. Cette modulation d'affinité/avidité contribue à l'activation de la $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ simultanément avec l'activation plaquettaire par un ou plusieurs agonistes⁽⁶⁷⁾. Ce phénomène est désigné sous le nom de «signalisation inverse» où la stimulation de l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ provient du milieu intérieur vers l'extérieur. Le signal intracellulaire généré lors de la stimulation de la plaquette par un agoniste entraîne un changement du domaine cytoplasmique de la $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$, transmis par la suite au domaine extracellulaire⁽⁶⁸⁾. L'exposition du collagène et du FVW sous endothéliales après une brèche vasculaire, est le stimulus le plus important de l'activation de la $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$, par le biais de la GPVI et le complexe GPIb-IX-V. Le collagène se lie à la GPVI, est capable d'activer la plaquette par la voie de protéine kinase C (PKC), il déclenche le signal inverse d'activation de la $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ ⁽⁶⁹⁾. L'activation de la $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ est initiée également par la liaison du FVW à la GPIb-IX-V⁽⁷⁰⁾.

Les voies d'activation de la $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ les plus importantes sont déclenchées après l'activation plaquettaire, où d'autres puissants agonistes sont générés (thrombine, ADP et thromboxane A₂/TXA₂). La thrombine active la plaquette via les récepteurs PAR1 et PAR4⁽⁷¹⁾ ; l'ADP via les récepteurs P2Y₁, P2Y₁₂ et P2X₁ ; la TXA₂ via les récepteurs TP α et TP β ⁽⁷²⁾. Tous ces récepteurs d'agonistes sont couplés à la protéine G. bien que chacun de ces agonistes peut déclencher le signal d'activation inverse, il est très probable qu'ils agissent en synergie d'une manière coopérative⁽⁷³⁾.

b) Autres intégrines de la famille β3

$\alpha\text{v}\beta\text{3}$: (CD51/CD61) est présente à la surface des plaquettes en plusieurs centaines de copies, dont la fonction n'est pas claire. Sur d'autres cellules, la $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ est un récepteur de la vitronectine⁽⁶⁰⁾.

c) Intégrines de la famille β1

(1) $\alpha\text{2}\beta\text{1}$:

(CD49b/CD29) la deuxième intégrine plaquettaire la plus importante après $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ (4000 copies par plaquette), elle est également connue sur les plaquettes comme GPIa-IIa et sur les

lymphocytes comme VLA2⁽⁷⁴⁾. La $\alpha 2\beta 1$ est considérée comme le principal ligand du fibrinogène sur les plaquettes et les autres cellules de l'organisme qui l'expriment. Comme la plupart des intégrines, la $\alpha 2\beta 1$ subit des changements (activation), afin de réguler son affinité pour le fibrinogène. Un modèle théorique «en deux sites, deux étapes» d'interaction du fibrinogène avec les plaquettes a été proposé, dans lequel les plaquettes se lient au collagène par la $\alpha 2\beta 1$ et puis elles s'activent via la GPVI⁽⁷⁵⁾. Dans les conditions de forces de cisaillements élevées, ni la $\alpha 2\beta 1$, ni la GPVI ne sont suffisantes pour assurer l'adhésion des plaquettes au sous endothélium. La plaquette adhère au sous-endothélium essentiellement par le biais de la GPIb-VWF-Collagène, cette liaison amène la plaquette à rouler sur le sous-endothélium jusqu'à ce qu'elle adhère fermement ou elle revient vers la circulation. Après cette primofixation plaquettaire, la $\alpha 2\beta 1$ s'active et assure une liaison solide de la plaquette au sous endothélium⁽⁷⁶⁾.

(2) $\alpha 5\beta 1$

CD49e/CD29 est un récepteur plaquettaire de fibronectine et joue un rôle supplémentaire dans l'adhésion plaquettaire au sous endothélium. Il a été démontré que le blocage de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ atténue l'activation plaquettaire médiée par sCD40L. La $\alpha 5\beta 1$ est également impliquée dans la formation de fibrillaire de fibronectine à la surface des plaquettes. Cette formation s'est avérée soutenir une agrégation plaquettaire efficace et une activité procoagulante^(77, 78).

(3) $\alpha 6\beta 1$

CD49f/CD29 est le récepteur plaquettaire de la laminine. Il y a environ 11500 copies par plaquette qui ont un rôle supplémentaire dans l'adhésion plaquettaire au sous-endothélium. Les plaquettes contiennent de la laminine-8 qui est libérée lors de l'activation et contribue à l'adhésion plaquettaire en interagissant avec $\alpha 6\beta 1$ ⁽⁷⁹⁾.

d) *Intégrines de la famille $\beta 2$*

$\alpha L\beta 2$ (CD11a/CD18) est présente à la surface des plaquettes activées, mais absentes à l'état de repos. Ce qui suggère son expression sur la membrane des granules plaquettaires. Des études récentes sur des plaquettes de souris ont montré que l'absence de la $\alpha L\beta 2$, est liée à une diminution de la durée de vie de plaquettes, et une augmentation des activités caspases⁽⁸⁰⁾.

2. Les récepteurs types LRR (répétitions riches en leucine)

a) *Complexe GPIb-IX-V*

Le complexe GPIb-IX-V joue un rôle central dans l'étape de l'adhésion plaquettaire. Dans les conditions de force de cisaillement au niveau d'une brèche vasculaire, l'adhésion des plaquettes au collagène sous endothélial, n'est possible qu'après l'établissement de liaison GPIb-FVW-Collagène. L'importance de ce complexe membranaire a été démontrée aux années 1970, quand un syndrome hémorragique sévère a été observé chez des patients

déficitaires en GPIb. Cette pathologie est connue sous le nom du syndrome de Bernard-Soulier (BSS) ⁽⁸¹⁾.

La GPIb-IX-V est le deuxième récepteur le plus abondant à la surface des plaquettes, avec 25000-35000 copies par plaquette ⁽⁸²⁾. La GPIb-IX-V contient quatre sous-unités : GPIb α , GPIb β , GPIX et GPV (Figure-6). Chaque sous-unité est codée par un gène distinct, ce sont des protéines transmembranaires contenant ; un domaine extracellulaire glycosylé ; un domaine transmembranaire et un court domaine intracytoplasmique. Les masses moléculaires de GPIb α , GPIb β , GPIX, GPV sont environ 120-140, 24, 20 et 85 kDa respectivement. La masse moléculaire de la GPIb α est la plus variable en raison de son grand polymorphisme et de sa haute glycosylation. La GPIb α est liée à deux sous-unités GPIb β par un pont disulfure, ensemble ils sont connus sous le nom de GPIb ⁽⁸³⁾. La GPIb s'associe de manière non covalente avec la GPIX et GPV, mais plus étroitement avec la GPIX qu'avec la GPV. La GPIb α contient la région riche en leucine (LRR) à son extrémité (Figure-6), cette région constitue le domaine d'établissement de la majorité de liaisons avec les différents ligands, elle est appelée également région LBD (ligand-binding domain).

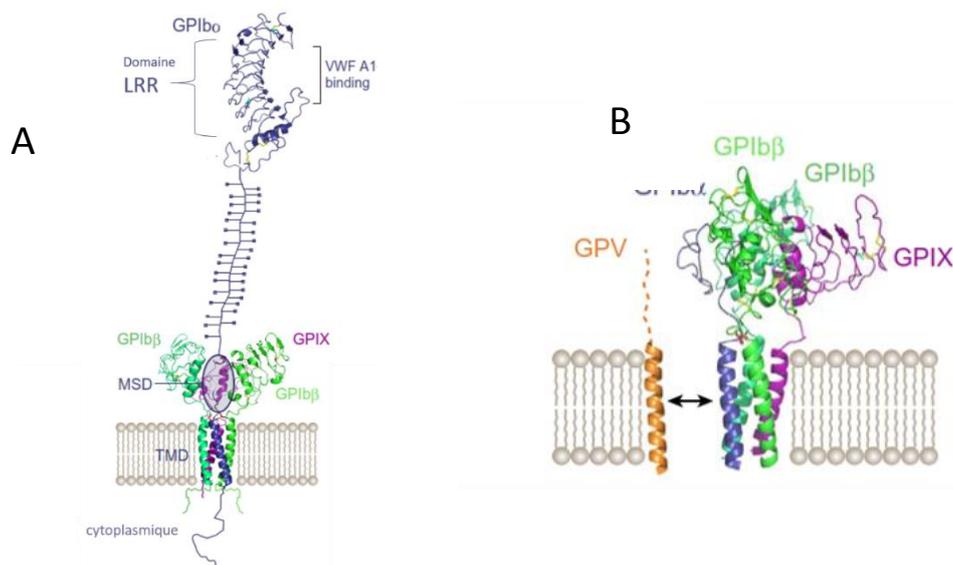


Figure 6: Structure du complexe GPIb-IX-V

(A) Une illustration du complexe GPIb-IX qui se compose de GPIb α (bleu), GPIb β (vert) et GPIX (violet). Diverses parties de GPIb α , telles que le domaine de liaison au ligand riche en leucine (LRR) et le domaine transmembranaire (TMD), sont étiquetées. Le domaine mécanosensoriel (MSD) est ombré par un ovale rayé, indiquant le manque d'informations structurelles. (B) Une vue latérale de l'interaction de GPV (orange) avec GPIb-IX à travers les TMD ⁽⁸³⁾.

La principale fonction de la GPIb-IX-V en hémostasie est d'assurer l'adhésion plaquettaire au sous-endothélium. L'adhésion plaquettaire au collagène sous endothélial est assurée par le biais du facteur de Von Willebrand (VWF), qui forme un pont entre les plaquettes et le collagène, et génère et signal d'activation plaquettaire. Le VWF est une glycoprotéine

hautement multimérisée. À l'état normal, les multimères de haut poids moléculaire (MHPM) de FVW se trouvent sous une forme condensée très peu affine à la GPIb-IX-V. Au niveau d'une brèche vasculaire et après leur fixation au collagène, les MHPM vont être exposés aux forces de cisaillement, provoquant l'ouverture de la molécule en forme étendue. Sous cette forme les MHPM se lient à la GPIb avec une forte affinité⁽⁸⁴⁾. Donc l'absence de forces de cisaillement empêche la liaison accidentelle indésirable du FVW à la GPIb des plaquettes en circulation. Il est à noter que la liaison du FVW à la GPIb peut être provoquée par certaines substances telles que la ristocétine (glycopeptide d'une bactérie) ou la botrocétine (toxine de serpent).

Outre l'adhésion plaquettaire, la GPIb-IX-V peut médier l'activation plaquettaire induite par la thrombine. La thrombine se lie à la GPIb α , facilitant son clivage pour les récepteurs de thrombine PAR-1, agissant essentiellement comme cofacteur⁽⁸⁵⁾. Cependant le Kininogène de haut poids moléculaire (KHMP) inhibe la liaison de la thrombine à la GPIb, cette action du KHMP est inhibée par les deux anticorps anti-GPIb α (TM60 et SZ2) et anti-GPIX (AK1 et FMC25)⁽⁸⁶⁾. La GPIb-IX-V agit également comme un contre récepteur de plusieurs autres ligands. On cite en premier l'intégrine leucocytaire « α M β 2 (Mac-1) », cette liaison fournit un mécanisme d'adhérence et de migration aux leucocytes sur les sites de dépôt plaquettaire au niveau des lésions vasculaires⁽⁸⁷⁾. La GPIb reconnaît également la P-sélectine⁽⁸⁸⁾ exprimée par les cellules endothéliales et les plaquettes activées, permettant ainsi l'adhésion des plaquettes à l'état de repos aux plaquettes activées. La liaison GPIb-P_sélectine est partiellement inhibée par les anticorps anti-GPIb α (AK2 et SZ2)⁽⁸⁸⁾.

Parmi les propriétés et les fonctions de la GPIb-IX, son implication dans l'accélération de la clairance des plaquettes. Au moment de l'activation plaquettaire, la GPIb transmet un signal intraplaquettaire et induit la présentation de signes d'élimination de la plaquette « clear-me », ces signes sont ensuite reconnus par le système réticuloendothélial (rate et foie). Cette clairance via la GPIb-IX-V peut être déclenchée par le FVW. Toutes les situations favorisant la liaison du FVW à la GPIb plaquettaire dans les conditions normales de la circulation entraînent une thrombocytopénie par augmentation de la clairance plaquettaire. Parmi lesquelles on cite la Ristocétine qui a été retirée de l'utilisation clinique, car elle provoque une thrombopénie et des thromboses⁽⁸⁹⁾. La Botrocétine a également le même effet, mais son mécanisme de liaison du FVW à la GPIb est différent de celui de la Ristocétine. L'activation de la GPIb par le FVW est constamment observée dans les purpuras thrombotiques thrombopéniques (PTT), où la formation de multimères de FVW de très haut poids moléculaire, à cause d'un déficit en ADAMTS13⁽⁹⁰⁾. Les patients atteints d'une maladie de Willebrand type 2B, présentent un purpura thrombopénique, dû à une affinité accrue des MHPM à la GPIb ce qui induit l'accélération de la clairance du complexe FVW-plaquette au niveau de la rate et/ou foie⁽⁹¹⁾.

La clairance des plaquettes via la GPIb-IX-V est initiée également par les anticorps anti-GPIb. Étant donné que la GPIb est une cible courante des auto-anticorps au cours des thrombopénies immunologiques, il existe une corrélation entre la résistance au traitement par immunoglobuline intraveineuse G (IVIG) ou stéroïdes et la présence d'anticorps anti-GPIb plutôt que l'anti-intégrine α IIb β 3⁽⁹²⁻⁹⁴⁾. Les anticorps monoclonaux ciblant la région LBD de la GPIb α provoquent une déplétion rapide de presque toutes les plaquettes dans le modèle animal⁽⁹⁵⁾. Ces anticorps anti-LBD activent directement la GPIb-IX et induisent une signalisation intraplaquettaire et une déglycosylation, provoquant une clairance plaquettaire ultérieure. L'absence d'implication du système immunitaire dans ce processus d'élimination « FC-indépendant » des plaquettes pourrait expliquer la résistance de ces thrombopénies au traitement par IVIG^(96, 97). Plusieurs caractéristiques de ces anticorps anti-LBD ont été rapportées dans la littérature, on cite tout d'abord que le fragment F(ab')₂ (mais pas le fragment Fab) d'un anticorps anti LBD peut induire une clairance de plaquettes, indiquant que la structure bivalente de l'anticorps est nécessaire pour activer la GPIb-IX⁽⁹⁸⁾; deuxièmement, de nombreux anticorps anti-LBD, tel que (6B4), éliminent rapidement les plaquettes, quel que soit leur épitope dans le LBD⁽⁹⁸⁾; troisièmement, la plupart des anti-LBD induisent une clairance FC-indépendante, sauf quelques exceptions comme le VM16D et AK2⁽⁹⁷⁾; enfin les anticorps ciblant d'autres régions de la GPIb-IX compris MSD, n'induisent pas une clairance FC-indépendante⁽⁹⁹⁾. Un modèle Trigger⁽⁹⁷⁾ est proposé, afin d'expliquer les caractéristiques énumérées ci-dessus (Figure 7). Dans ce modèle, la forme dimérique de l'anticorps est indispensable pour lier deux plaquettes par leur GPIb. Ensuite dans les conditions physiologiques de force de cisaillement, cette liaison va générer des forces sur la GPIb, exactement au niveau de la région MSD. Ce qui active la GPIb et génère le signal de clairance⁽¹⁰⁰⁾.



Figure 7: modèle de déclenchement de la clairance plaquettaire

À gauche, illustration de la structure de la GPIb-IX avec les deux régions LBD et MSD sur la sous-unité GPIb α . À droite, le pontage de deux GPIb sur deux plaquettes par un Ac anti-LBD ou bien un FVW déclenche le signal de clairance plaquettaire, par l'augmentation du Ca^{+2} intracellulaire; l'expression de P-sélectine et la désialylation (exposition du β galactose). Adapté à partir de Li.R (100).

La GPIb-IX-V est impliquée également dans la médiation de la thrombopoïèse. Les preuves à l'appui de cette fonction proviennent de la présence de macrothrombopénie chez les patients déficitaires en GPIb-IX-V (atteints de BSS). Le système de démarcation membranaire est sous-développé dans les plaquettes de souris BSS, et la formation de proplaquette est significativement diminuée ⁽¹⁰¹⁾. Ces observations suggèrent que la GPIb-IX-V joue un rôle dans les derniers stades de la mégacaryopoïèse, coïncidant avec son expression.

b) Les récepteurs Toll-Like (TLR)

Ils représentent la deuxième classe de protéines LRR, exprimés par les plaquettes après la GPIb-IX-V. Ce sont des récepteurs transmembranaires de type 1, avec un domaine extracellulaire contenant plusieurs régions LRR ; un domaine transmembranaire et un domaine intracellulaire Toll/interleukine. Les TLR sont exprimés par les cellules immunitaires, leur stimulation par les ligands correspondants est liée au processus de l'immunité innée permettant la génération de cytokines proinflammatoires. L'expression de TLR permet donc aux plaquettes de se lier aux agents infectieux et de fournir différents signaux pour la sécrétion de cytokines et chimiokines ⁽¹⁰²⁾.

3. Les récepteurs à sept domaines transmembranaires :

La famille des récepteurs à sept domaines transmembranaires est la principale famille de récepteurs d'agonistes dans les cellules en général. Cette famille est bien présentée à la surface de plaquettes, dont on va citer les principaux.

a) Récepteurs d'activation de protéases PAR (Récepteurs de la thrombine)

Ce sont les principaux récepteurs à sept domaines transmembranaires sur les plaquettes. Le premier récepteur identifié et caractérisé était le récepteur d'activation de la protéase 1 (PAR1) ⁽⁷¹⁾. Les plaquettes humaines ont environ 2500 copies du récepteur PAR1, qui répondent à des taux de thrombine d'environ 1 nM. Les récepteurs PAR, ont un mécanisme d'activation particulier par rapport aux autres récepteurs à sept domaines transmembranaires. Leur activation implique un clivage spécifique du domaine N-terminal extracellulaire. Le PAR expose un nouveau domaine N-terminal après clivage qui va agir comme un ligand au récepteur. Le peptide N-terminal, libéré après clivage, peut activer les plaquettes via un récepteur non déterminé pour le moment ⁽¹⁰³⁾. D'autres classes de récepteurs PAR ont été également mises en évidence sur les plaquettes. Le récepteur PAR2 est clivé et activé par la trypsine et les protéases apparentées, mais pas par la thrombine. Les plaquettes expriment le PAR4, qui est sensible à des concentrations de thrombine 10 fois plus élevées que le PAR1 ⁽¹⁰⁴⁾. Le PAR4 peut agir éventuellement dans des situations où les plaquettes sont exposées à de fortes doses de thrombine, mais elles sont déplétées de PAR1. La thrombine à faible dose induit une réponse cellulaire PAR-dépendante, nécessitant

la coopération du signal de la GPIb-IX, et inversement le signal de la GPIb-IX induit par la thrombine nécessite la coopération des PARs. La coopération entre le signal de la GPIb-IX et le signal des PARs, entraîne l'activation de plaquettes à de faibles doses de thrombine, qui est très importante pour le bon déroulement du processus d'hémostase in vivo⁽¹⁰⁵⁾. En plus de thrombine, plusieurs autres sérines protéases sont capables d'activer des PARs, tels que le facteur Xa ; la plasmine ; élastase ; protéine C activée ; protéinase-3 ; granzyme ; cathepsine G et calpaïne⁽¹⁰⁶⁾. Selon le site de clivage, les PARs peuvent être activés ou inactivés par ces protéases. En outre, les sites de clivage alternatifs peuvent générer de nouveaux ligands attachés qui amorcent une voie de signalisation spécifique.

Plusieurs essais de synthèse d'antagonistes de PARs, sont en cours. Le premier antagoniste, approuvé en 2014 par la FDA (Food and Drug Administration/USA), est le Vorapaxar (Zontivity)⁽¹⁰⁷⁾. C'est un inhibiteur orthostérique qui entre directement en compétition avec le ligand actif. Il réduit le taux de mortalité causé par les futurs événements cardiovasculaires des patients ayant un antécédent d'infarctus du myocarde ou de maladie artérielle périphérique⁽¹⁰⁸⁾.

b) Récepteurs P2 (récepteurs de l'ADP)

Les récepteurs P2 de l'ADP, exprimés à la surface plaquettaire, sont divisés en deux grands groupes selon leur poids moléculaire. Des récepteurs couplés à la protéine G ou « métabotropique » appelés P2Y ; des canaux ioniques ligand-dépendants ou « inotropes » appelés P2X.

Le récepteur purinergique P2Y1 plaquettaire est une protéine de 42 kDa contenant 373aa. Il a sept hélices transmembranaires couplées à la protéine G. le gène P2Y1 situé sur le chromosome 3q21-q25. Le P2Y1 est également abondamment représenté à l'intérieur de la plaquette, dans la membrane de granules α et dans le système canaliculaire ouvert. Le P2Y1 médie un changement de forme de plaquettes et une agrégation rapide, mais réversible induite par l'ADP. La stimulation du P2Y1 est également associée à une sécrétion des granules α et l'activation de plaquettes. Outre la réponse à l'ADP, les P2Y1 jouent un rôle ; dans la réponse plaquettaire aux autres agonistes tels que collagène, chimiokines et protéases⁽¹⁰⁹⁻¹¹¹⁾ ; un rôle dans la génération de thrombine⁽¹¹²⁾ et un rôle dans la formation de thrombus in vitro sur une surface de collagène⁽¹¹³⁾.

Le récepteur P2X1 est un canal ionique ligand-dépendant largement distribué à la surface plaquettaire. Son gène est situé sur le chromosome 17p3.2. La sensibilisation du P2X1 par son agoniste entraîne un flux du Ca^{+2} intracellulaire et un changement morphologique plaquettaire⁽¹¹⁴⁾. La stimulation du P2X1 seule ne peut pas conduire à l'agrégation plaquettaire, mais il a été démontré qu'il contribue à l'agrégation et à la sécrétion plaquettaires en synergie avec les autres récepteurs⁽¹¹⁵⁾.

c) Les récepteurs de prostaglandines**(1) Récepteurs de thromboxane (TX)**

Les plaquettes ne contiennent que les récepteurs de type A (TXA₂/prostaglandine H₂). C'est un récepteur très important pour l'amplification autocrine de l'activation plaquettaire après stimulation par un des agonistes primaires. Le TXA₂/PGH₂ a 57 kDa de masse et deux sites N-glycosylés⁽¹¹⁶⁾. Les récepteurs de la TXA₂ activent plusieurs types de protéine G, leurs agonistes induisent une tyrosine phosphorylation de plusieurs récepteurs protéiques, dont la P72^{SYK}. Une grande partie de récepteurs de la TXA₂ (40%) est localisée au niveau des radeaux lipidiques membranaires⁽¹¹⁷⁾. L'agrégation plaquettaire aux analogues de la TXA₂ comme U46619 et IBOP ; l'activation de l'intégrine αIIbβ3 et l'exposition de P-sélectines sont presque totalement inhibées dans les plaquettes dépourvues de cholestérol. La perturbation du radeau lipidique membranaire inhibe également l'augmentation du calcium cytosolique induite par la TXA₂.

(2) Récepteur PGI₂

Le récepteur de prostaglandines I₂ (prostacyclines) ; appelé également récepteur IP, est l'inhibiteur majeur de la prostaglandine sur les plaquettes. Il fixe les prostacyclines libérées des cellules endothéliales afin de maintenir les plaquettes à l'état de repos. C'est un récepteur de 41 à 83 kDa, avec une courte région N-terminale et une région C-terminale intracellulaire étendue⁽¹¹⁸⁾. Les analogues synthétiques de PGI₂ tels que l'iloprost et le cicaprost peuvent se lier au récepteur IP avec la même affinité comme la PGI₂, mais il existe une réactivité croisée des ligands du récepteur IP avec plusieurs autres récepteurs de prostaglandines tels que la PGE₂⁽¹¹⁸⁾. Contrairement aux récepteurs de la TXA₂, l'augmentation du cholestérol membranaire diminue l'expression des récepteurs IP, tandis que l'augmentation des phospholipides augmente le nombre de ces récepteurs et augmente la quantité de PGI₂ liée.

(3) Récepteur PGD₂

Les récepteurs PGD₂ sont similaires aux récepteurs vasculaires, mais distincts des autres récepteurs plaquettaires des prostaglandines. Plusieurs antagonistes de récepteurs de PGD₂ ont été mis en évidence, où ils ont montré une excellente activité inhibitrice de l'accumulation de l'AMPc dans le plasma humain riche en plaquettes⁽¹¹⁹⁾.

d) Récepteurs de chimiokines

Les principales chimiokines plaquettaires sont : le facteur 4 plaquettaire et la β-thromboglobuline. Plus récemment, d'autres chimiokines plaquettaires ont été mises en évidence dont le ENA-78 (peptide d'activation de neutrophiles épithéliaux) et RANTES (*regulated upon activation, normal T cells expressed and presumably secreted*). Les plaquettes possèdent également des récepteurs de chimiokines dont on cite : CXCR4 (récepteur 4 pour les chimiokines contenant le motif Cys-X-Cys) ; CCR4 (récepteur 4 pour les chimiokines contenant le motif Cys-Cys) et de petites quantités de CCR1 et CCR3⁽¹¹⁰⁾. Le

CXCR4 est l'unique récepteur du facteur 1 dérivé des cellules stromales, il est retrouvé sur les mégacaryocytes. Le CXCR4 avec la thrombopoïétine, joue un rôle dans la mégacaryopoïèse et la maturation de mégacaryocytes. Le CCR4 est le récepteur de chimiokines dérivées de macrophages et de thymus, ainsi les chimiokines à activation régulée (TARC) produites par les monocytes. Le CCR4 est peut-être impliqué dans les interactions plaquettes-monocytes, qui sont courantes après une lésion vasculaire. Le CCR1 et CCR3 sont tous les deux des récepteurs de RANTES libéré lors de l'activation plaquettaire, et pourraient ainsi participer dans les mécanismes de feedback autocrine.

e) Récepteurs de lipides

(1) Récepteur du facteur d'activation plaquettaire (PAF)

Il existe environ 300 récepteurs de PAF sur la surface plaquettaire. Le récepteur de PAF est une glycoprotéine de 50 à 60 kDa⁽¹²⁰⁾. Le PAF est un lipide 1-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine, qui génère des réponses biologiques à des niveaux aussi bas que 10 fM, il représente également un majeur médiateur de l'inflammation.

f) Autres récepteurs à sept domaines transmembranaires

(1) Récepteur V_{1a} de la vasopressine

La vasopressine est un agoniste capable d'induire une activation de plaquettes, mais le niveau de cette activation dépend du taux plasmatique d'adénosine et elle est fortement augmentée en présence de théophylline, qui antagonise les récepteurs de l'adénosine. Les récepteurs V_{1a} plaquettaires sont couplés à la protéine Gq₁₁⁽¹²¹⁾.

(2) Récepteur A_{2a} de l'adénosine

L'adénosine agit sur les plaquettes via le récepteur A_{2a} couplé à la protéine G pour stimuler l'adénylate cyclase. L'adénosine plasmatique est un puissant inhibiteur plaquettaire, en inhibant l'activation par la vasopressine et le PAF⁽¹²²⁾.

(3) Récepteur β₂-adrénergique

L'épinéphrine n'induit l'agrégation plaquettaire qu'en présence d'autres agonistes. Son récepteur β₂-adrénergique est couplé à une protéine Gs. L'épinéphrine active la synthèse plaquettaire de l'oxyde nitrique en augmentant l'AMPc par un mécanisme Ca²⁺-dépendant⁽¹²³⁾.

(4) Récepteur de la sérotonine

La sérotonine plaquettaire majeure est (5-hydroxytryptamine 5-HT) et son récepteur est le 5-HT_{2A}. Dans les plaquettes, le 5-HT_{2A} est couplé aux protéines G, et sa stimulation par la sérotonine conduit à une signalisation par le calcium⁽¹²⁴⁾. La sérotonine est donc un autre agoniste plaquettaire autocrine, car c'est le composant majeur des granules denses plaquettaires. Il existe un polymorphisme T102C du gène du 5-HT_{2A} entraînant une augmentation de signalisation qui a été associée à des infarctus du myocarde⁽¹²⁵⁾.

(5) *Récepteur de la dopamine*

Des études récentes ont montré la présence de récepteurs D3 et D5 de la dopamine sur les plaquettes, ce sont des glycoprotéines de 42 KDa (126).

(6) *Récepteur $\alpha 7$ -nicotinique de l'acétylcholine*

Les plaquettes et les précurseurs mégacaryocytaires expriment les sous unités nAChR $\alpha 7$ qui forment des canaux Ca²⁺ fonctionnels. L'entrée du Ca²⁺ dans les plaquettes a été induite par le PNU-282987 (agoniste sélectif du nAChR $\alpha 7$). Le PNU-282987 améliore l'activation induite par les agonistes classiques du récepteur du fibrinogène (l'analogue de thromboxane A2 U46619 et l'ADP). En revanche l'agrégation plaquettaire induite par un agoniste, était significativement inhibée par les antagonistes sélectifs de nAChR $\alpha 7$ (α -bungarotoxine et la méthyllycaconitine). Lors de l'activation, les plaquettes peuvent libérer leurs stocks d'acétylcholine, qui active les canaux nAChR $\alpha 7$, pour contribuer au maintien du niveau de Ca²⁺ intracellulaire et soutenir l'activation plaquettaire (127).

(7) *Récepteurs cannabinoïdes*

Les récepteurs cannabinoïdes (CB) couplés aux protéines G appartenant à la sous-famille de rhodopsine, sont exprimés par les plaquettes. Le CB1, et à un moindre degré le CB2, ont été détectés dans les plaquettes humaines hautement purifiées. Ces résultats peuvent expliquer l'effet procoagulant du delta-9-tétrahydrocannabino, sur les plaquettes humaines (128).

4. Superfamille d'immunoglobulines

a) *GPVI*

La GPVI est l'un des membres importants de la superfamille d'immunoglobuline, présente à la surface des plaquettes. C'est le deuxième récepteur majeur du collagène, après le $\alpha 2\beta 1$. Le premier cas de déficit en GPVI a été identifié en 1987, chez un patient présentant un purpura thrombopénique auto-immun (PTI) (129). Les plaquettes de ce patient n'ont pas pu s'agréger, en réponse au collagène. Plus tard la glycoprotéine de 62 kDa reconnue par l'autoanticorps du patient a été identifiée comme GPVI. Dans le modèle animal, l'absence de la GPVI, n'est pas associée à un syndrome hémorragique sévère, cependant elle protège contre les thromboses (130). Cette importante différence d'action entre hémostase et thrombose, et l'expression restreinte aux mégacaryocytes et plaquettes, a conduit à l'utilisation de la GPVI dans la conception de nouveaux agents antithrombotiques (131).

La GPVI est une protéine de la superfamille des immunoglobulines, qui pourrait s'associer à la chaîne γ du récepteur Fc (FcR γ), via un résidu arginine transmembranaire. C'est une protéine transmembranaire de type I, où le domaine extracellulaire commence par l'extrémité N-terminale. La caractéristique majeure de la partie extracellulaire est la présence de deux boucles d'immunoglobuline (Ig-like) appelées D1 et D2. Ces deux domaines sont maintenus à distance de la surface plaquettaire par un segment en forme de tige rigide hautement glycosylée (132) (Figure 8). Cette tige contient un site de clivage, ce qui

permet l'excrétion de la partie extracellulaire de la GPVI sous l'effet de membres de la famille des métalloprotéinase ADAM (A disintegrin and metalloproteinase). Le domaine transmembranaire de 19 aa contient un résidu Arg qui forme un pont avec l'Asp de la chaîne FcR γ ⁽¹³³⁾. Le court domaine cytoplasmique contient un motif de liaison à la calmoduline, et un domaine riche en proline qui médie l'association à la famille Src kinase (SFK) via le domaine SH3 ⁽¹³⁴⁾. Le gène codant pour la GPVI est situé en 19q13.4, il a deux allèles différents appelés GP6a et GP6b, couramment trouvés dans la population humaine avec une fréquence de 0,85 et 0,13 respectivement ⁽¹³⁵⁾. Ces allèles se distinguent par un haplotype de sept polymorphismes nucléotidiques uniques dont cinq provoquent des variations de la séquence d'acides aminés du GPVI au niveau de la tige et les domaines cytoplasmiques ⁽¹³⁵⁾.

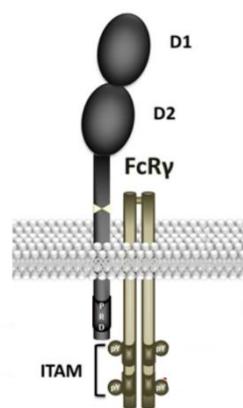


Figure 8: structure de la GPVI

Adapté à partir de Haining, E. J., et al. (2019) ⁽¹³⁵⁾

Le collagène est le principal ligand de la GPVI. Il existe neuf types de collagène au niveau du système vasculaire, mais seulement les types I et III sont capables de former de grosses fibrilles et de se lier à la GPVI avec une forte affinité ⁽¹³⁶⁾. Par ailleurs, de nombreuses molécules peuvent également provoquer l'activation plaquettaire via la signalisation GPVI. Parmi ces molécules on cite des ligands endogènes comme : fibrinogène, fibronectine, vitronectine, adiponectine et plus récemment la fibrine ⁽¹³⁷⁾. Des ligands exogènes synthétiques comme : le peptide lié au collagène (CRP), Convulxin, les Particules d'échappement du diesel et les Polysaccharides sulfatés.

La GPVI ne contient aucun motif de signalisation sur elle-même. Elle déclenche la voie de signalisation classique ITAM (*immunoreceptor tyrosine-based activation motif*). La liaison GPVI-ligand déclenche la signalisation des ITAM des chaînes FcR γ auxquelles elle est associée ⁽¹³⁸⁾. La chaîne FcR γ est non seulement essentielle pour la signalisation de la GPVI, mais également nécessaire pour l'expression du récepteur sur la surface plaquettaire ⁽¹³⁹⁾. L'ADAM10 est la principale métalloprotéase, responsable de l'excrétion de la GPVI, elle coupe le domaine extracellulaire de la GPVI au niveau de la tige ⁽¹⁴⁰⁾. Le mécanisme de déclenchement de l'excrétion de la GPVI est lié à l'activation plaquettaire et le niveau du

Ca²⁺ intracellulaire, médiés par les différents récepteurs, les forces de cisaillement et l'activation de la cascade de la coagulation⁽¹⁴¹⁾. Le but biologique et les conséquences physiologiques de cette excrétion sont encore mal connus, car il n'y a pas eu de fonction biologique décrite pour le fragment de 55 kDa libéré de la GPVI, appelé GPVI soluble (sGPVI).

b) Récepteur FcγRIIa

Le FcγRIIa (CD32), est un récepteur de faible affinité pour le domaine Fc des IgG de 40 à 42 kDa. Comme la GPVI, le FcγRIIa possède deux boucles C-2 extracellulaires (Ig-like), mais ses signaux sont transmis directement via son domaine cytoplasmique, qui contient deux domaines activateurs à base de tyrosine immunorécepteur. Le FcγRIIa a un rôle dans l'immunité antibactérienne, virale et parasitaire. Dans les différentes maladies auto-immunes ou allo-immunes, le complexe Ag-Ac provoque l'activation plaquettaire par sa fixation sur le FcγRIIa. Ainsi presque tous les anticorps monoclonaux dirigés contre les récepteurs plaquettaires et nombreux anticorps monoclonaux, activent les plaquettes en se fixant sur le FcγRIIa. Le récepteur FcγRIIa est impliqué dans le mécanisme de la thrombopénie induite par l'héparine, où les anticorps se développent contre le complexe héparine-facteur 4 plaquettaire, ensuite les complexes formés provoquent l'activation plaquettaire via le FcγRIIa⁽¹⁴²⁾. Le FcγRIIa a un polymorphisme R/H au résidu 131, qui affecte l'affinité de la liaison Fc. En plus de la signalisation en réponse à la liaison des IgG, le FcγRIIa coopère avec la GPIIb/IIIa, par amplification des signaux externes-internes induits par la liaison du ligand⁽¹⁴³⁾.

c) Récepteur FcεRI

Le FcεRI (CD23), récepteur de haute affinité des IgE, a été détecté à la surface des plaquettes par cytométrie en flux et son ARNm par PCR. Sa présence à la surface plaquettaire indique qu'elles sont impliquées dans l'immunité antiparasitaire et dans la réaction d'hypersensibilité⁽¹⁴⁴⁾. Le FcεRI a été détecté également dans le cytoplasme de mégacaryocytes. L'activation plaquettaire via le FcεRI provoque la libération de sérotonine et RANTES.

5. Famille de récepteurs de lectine de type c

a) P-Sélectine (CD62P)

P-sélectine, également connue sous le nom de CD62p, est une protéine membranaire de type I, contenant ; un domaine N-terminal de lectine de type C ; un facteur de croissance épidermique (EGF-like) et un domaine cytoplasmique. La P-sélectine est localisée au niveau de la membrane de granules α plaquettaire et les corps de Weibel-Palade des cellules endothéliales⁽¹⁴⁵⁾. Lors de l'activation plaquettaire, la fusion de granules α avec la membrane externe, expose la P-sélectine à la surface. Le principal ligand de P-sélectine est PSGL-1 (*P-selectin glycoprotein ligand-1*), est un hétérodimère mucine, portant plusieurs O-glycanes sur les résidus sérine et thréonine. La PSGL-1 est exprimée à la surface des neutrophiles, monocytes, cellules dendritiques et des sous-classes lymphocytaires. Les plaquettes

expriment également la PSGL-1 et utilisent ce récepteur pour se lier à la P-sélectine exprimée par les cellules endothéliales⁽¹⁴⁶⁾. La P-sélectine et le PSGL-1 constituent la principale paire récepteur-ligand, permettant les interactions physiques entre les plaquettes et les leucocytes. Cette liaison permet un recrutement efficace des leucocytes au niveau du site de la lésion vasculaire⁽¹⁴⁷⁾. L'interaction plaquettes-leucocytes déclenche également la formation de fibrine et l'extension du thrombus, par la concentration de microparticules dérivées de leucocytes portant la PSGL-1 avec les facteurs tissulaires procoagulant sur la surface de plaquettes⁽¹⁴⁸⁾.

b) CLEC-2 (C-Type Lectin-Like Receptor 2)

Le CLEC-2 est un récepteur hautement exprimé par les plaquettes, les mégacaryocytes et les cellules dendritiques. En 2006, il a été identifié comme récepteur responsable de l'activation plaquettaire par la rhodocytine de venin de serpent⁽¹⁴⁹⁾. CLEC-2 est une protéine transmembranaire de type II qui appartient à la sous-famille du groupe V de récepteurs de lectine de type C. La caractéristique dominante de sa partie extracellulaire est la présence de domaine de lectine type C appelé CTLD (*C-type lectin domain*). La région transmembranaire est liée au CTLD par une tige et la courte région intracellulaire contient un motif de signalisation appelé hemITAM en raison de sa ressemblance à la moitié d'un ITAM⁽¹⁵⁰⁾.

La rhodocytine, connue également sous le nom de aggrétine, est une protéine de venin de vipère des puits de Malaisie, est capable de se fixer au CLEC-2 et provoque sa dimérisation et induire une signalisation⁽¹⁵¹⁾. En raison du fait qu'il n'y a qu'une seule tyrosine dans hemITAM du domaine intracytoplasmique, la dimérisation du CLEC-2 est essentielle pour l'initiation de la signalisation via ce récepteur.

6. Les récepteurs de tyrosine kinase

a) Récepteur de la thrombopoïétine (c-mpl, CD110)

Le récepteur de la thrombopoïétine est une protéine de 80 à 84 kDa. Il existe environ 56 ±17 copies par plaquette. La TPO induit l'activation du R-TPO par la dimérisation de deux récepteurs⁽¹⁵²⁾. Le récepteur de TPO se trouve dans une large gamme de cellules hématopoïétiques, y compris les mégacaryocytes ; les plaquettes matures ; cellules immatures de toutes les lignées ; cellules CD34+ et les cellules souches hématopoïétiques. La liaison TPO à son récepteur produit un nombre d'effets majeurs dont : prévenir l'apoptose des mégacaryocytes⁽¹⁵³⁾ ; augmentation du nombre, de la taille et de la ploïdie des mégacaryocytes⁽¹⁵⁴⁾ ; augmentation du taux de maturation des mégacaryocytes et internalisation du complexe TPO/R-TPO⁽¹⁵⁵⁾. Ces effets sont médiés par multiples voies de signalisation impliquant JAK, STAT et MAP kinase.

b) Récepteur de leptine

La leptine est une protéine de 167 acides aminés du gène *ob*, régule le stockage d'énergie sous forme de graisses chez les mammifères. L'absence ou le déficit en leptine sont associés à une hyperphagie et obésité, en revanche des taux élevés provoquent la perte du poids par la diminution de l'appétit et l'augmentation du métabolisme. La présence du récepteur de la leptine sur les plaquettes a été décrite pour la première fois en 1999, dans une étude montrant que 30 à 100 ng/ml de leptine augmente la réponse d'agrégation plaquettaire aux quantités seuils d'ADP (1 μ M), mais elle n'a aucun effet seule⁽¹⁵⁶⁾.

c) Récepteur du facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF)

Le PDGF est une protéine dimère à pont disulfure, libéré par les granules α lors de l'activation des plaquettes. Les plaquettes n'ont que le récepteur α de PDGF. La liaison PDGF dimérise ce récepteur, initiant une cascade de signalisation basée sur la phosphorylation de la tyrosine⁽¹⁵⁷⁾.

d) Autres récepteurs de tyrosine kinase

Plusieurs récepteurs de tyrosine kinase ont été identifiés à la surface plaquettaire dont on note : le récepteur Tie-1 (Tyrosine kinase avec Homologie à l'immunoglobuline et le facteur de croissance épidermique-1)⁽¹⁵⁸⁾ ; le récepteur de l'insuline⁽¹⁵⁹⁾ ; le récepteur Gas6⁽¹⁶⁰⁾ et le récepteur-1 d'agrégation plaquettaire-endothéliale (PEAR1)⁽¹⁶¹⁾.

7. Glycosyl phosphatidylinositol (GPI)

Il existe cinq glycoprotéines membranaires plaquettaires, liées par la GPI ancrée. Parmi ces GP on trouve classiquement le CD55 (facteur d'accélération de la désintégration DAF) et le CD59, qui sont également présents sur une large gamme de cellules sanguines pour les protéger contre le complément lorsque celui-ci est activé⁽¹⁶²⁾. En outre, les plaquettes activées expriment une glycoprotéine liée à la GPI de 170 kDa, actuellement classée CD109, elle porte l'alloantigène Gov et les oligosaccharides ABO⁽¹⁶³⁾.

8. Diverses glycoprotéines membranaires

a) CD36 (GPIV, GPIIb)

CD36 est également appelé GPIV ou GPIIb. Il existe environ 16700 copies par plaquette normale⁽⁸²⁾. Les études de cette glycoprotéine ont montré l'absence d'expression du CD36 chez une population normale minoritaire estimée à 4-7% en Asie de l'Est⁽¹⁶⁴⁾ et 7-10% en Afrique subsaharienne⁽¹⁶⁵⁾. Les bases moléculaires de ce déficit ont été identifiées comme un polymorphisme dans le codon 90, conduisant à un décalage Pro--Ser⁽¹⁶⁶⁾. Le collagène et la thrombospondine ont été suggérés comme des ligands pour le CD36^(167, 168), mais il existe d'autres protéines qui se lient à ce récepteur. La principale fonction de la GPIV est peut-être de piéger les lipoprotéines oxydées ou de transporter les acides gras à longue chaîne⁽¹⁶⁹⁾.

b) Protéine de liaison spécifique C3 (protéine cofacteur membranaire CD46)

Cette glycoprotéine membranaire est structurellement et antigéniquement distincte du CD55 (DAF). Cependant le CD55 et la protéine de liaison spécifique au C3 (CD46) ont des profils d'activité complémentaires, car le DAF peut empêcher l'assemblage et dissocier les convertase C3, mais il n'a pas d'activité cofacteur, tandis que le CD46 a une activité de cofacteur, mais dépourvue d'activité d'accélération de la dégradation. Ces deux protéines ont été proposées pour fonctionner ensemble afin d'empêcher l'activation autologue du complément⁽¹⁷⁰⁾.

c) Protéines membranaires associées aux lysosomes 1 et 2

LAMP-1 (CD107a) et LAMP-2 (CD107b) sont des glycoprotéines associées à la membrane trouvées dans les lysosomes plaquettaires et les granules denses. Elles sont utilisées comme marqueurs d'activation plaquettaire⁽¹⁷¹⁾.

d) CD 40 Ligand (CD40L, CD154)

Le CD154 est le ligand du CD40, présent au niveau de granules plaquettaires. Il s'agit d'une glycoprotéine membranaire de type II de 39 kDa. Les plaquettes sont capables d'exprimer le CD154 à leur surface quelques minutes après la stimulation. Les plaquettes exprimant le CD154 peuvent interagir avec le CD40 de cellules endothéliales pour provoquer une réponse inflammatoire⁽¹⁷²⁾. Les mutations du gène CD154 sont associées à un état d'immunodéficiences rares « syndrome d'hyper-IgM lié à l'X » dont l'absence d'expression du CD154 sur les plaquettes est un marqueur de diagnostic de la maladie⁽¹⁷³⁾. Le système CD154/CD40 est considéré comme ayant un rôle important dans le maintien des réponses inflammatoires et être impliqué dans l'athérosclérose⁽¹⁷⁴⁾.

D. Polymorphisme des antigènes plaquettaires :

Les glycoprotéines, exposées à la surface plaquettaire, sont exprimées en formes polymorphes, à cause de polymorphismes mononucléotidiques (SNP) touchant les gènes qui les codent. Les changements d'acides aminés résultants de ces SNP, induisent des changements de la structure des glycoprotéines capables d'induire une immunisation et une synthèse d'anticorps, en réponse à une exposition aux alloantigènes, au cours d'une grossesse ou transfusion sanguine. Ces alloantigènes plaquettaires sont connus sous le nom de (HPA), les anticorps anti-HPAs sont impliqués dans plusieurs troubles immunitaires plaquettaires dont on cite : la thrombocytopénie allo-immune fœtale et néonatale (FNAIT) ; le purpura post-transfusionnel (PTP) et la polytransfusion plaquettaire réfractaire (PER)⁽¹⁷⁵⁾.

À ce jour, il y'a 35 alloantigènes HPA (Tableau 2). La liste de database est disponible sur <https://www.ebi.ac.uk/ipd/hpa/table1.html>. Les HPA sont numérotés selon leur ordre de découverte de 1 à 29. Le premier système (HPA-1) a été mis en évidence au début des années soixante⁽¹⁷⁶⁾, et le dernier (HPA-29w) en 2015⁽¹⁷⁷⁾. Il existe six groupes bialléliques

comportant 12 alloantigènes HPA (HPA-1, HPA-2, HPA-3, HPA-4, HPA-5 et HPA-15). L'antigène de grande fréquence est désigné par « a » et l'antigène de faible fréquence par « b ». Pour les autres systèmes dont les anticorps retrouvés actuellement sont dirigés contre un seul antigène, on rajoute la lettre « w » pour « workshop ». Les fréquences des HPA ont été étudiées sur plusieurs populations (Tableau 2), les database sont disponibles sur https://www.ebi.ac.uk/ipd/hpa/freqs_1.html. Les fréquences de plusieurs ethnies en Algérie ont été déterminées par H.Brouk et al^(178, 179). Nous avons noté les fréquences de la population de l'Est algérien dans le (tableau 2).

Le complexe glycoprotéique GPIIb/IIIa renferme le polymorphisme antigénique le plus important, avec 25 alloantigènes sur les 35 répertoriés actuellement (dont 17 portés par la GPIIIa et 8 par la GPIIb). GPIIb (intégrine α Ib, CD41) et GPIIIa (intégrine β IIIa, CD61) sont codés par les gènes ITGA2B et ITGB3 respectivement, situés sur le chromosome 17. Le complexe GPIIb/IIIa est le plus immunogène, à cause de sa grande densité à la surface plaquettaire, environ 80000 copies par plaquette. Il représente également la cible la plus fréquente, des anticorps antiplaquettaires détectés dans les différents troubles plaquettaires.

Le complexe GPIb/IX/V, est le plus exprimé à la surface plaquettaire après la GPIIb/IIIa, avec environ 25000 copies par plaquette. Il est constitué d'une chaîne Ib α (CD42b) codée par le gène GP1BA sur le chromosome 17 ; une chaîne Ib β (CD42c) codée par le gène GP1BB sur le chromosome 22 ; GPIX (CD42a) codé par le gène GP9 sur le chromosome 3 et la GPV (CD42d) codé par le gène GP5 localisé sur le ch3q29. La GPIb α porte le système HPA-2⁽¹⁸⁰⁾ et la GPIb β l'HPA-12w⁽¹⁸¹⁾. Les alloanticorps associés aux polymorphismes de la GPIb α et GPIb β sont responsables de FNAIT. En outre les sujets déficitaires en complexe GPIb/IX/V, atteints de maladie de Bernard-Soulier peuvent développer des iso-anticorps antiGPIb/IX en cas de transfusion ou de grossesse⁽¹⁸²⁾. La GPIb/IX est également une cible fréquente des auto-anticorps antiplaquettaires.

La GPIa, du complexe GPIa/IIa (CD49b/CD29), porte le système HPA-5 a/b⁽¹⁸³⁾ ; HPA-13bw ; HPA18bw et HPA-25bw. Le CD109 porte le système HPA-15⁽¹⁸⁴⁾.

Tableau 2: Allo antigènes HPA et leurs fréquences

Système	Antigènes	Glycoprotéine	Fréquence %			
			Algérie (est) 128	Maroc 107	Espagne 300-900	Chine 1000
HPA-1	HPA-1a	GPIIIa (CD61)	83,6	74,8	81	99,4
	HPA-1b		16,4	25,2	19	0,6
HPA-2	HPA-2a	GPIb α (CD42b)	85,2	81,8	90	95,2
	HPA-2b		16,8	18,2	10	4,8

HPA-3	HPA-3a	GPIIb (CD41)	66,33	68,2	65	59,4
	HPA-3b		33,7	31,8	35	40,6
HPA-4	HPA-4a	GPIIIa (CD61)	100	100	100	99,9
	HPA-4b		00	00	00	0,1
HPA-5	HPA-5a	GPIa (CD49b)	84,4	86,1	88	98,6
	HPA-5b		15,6	13,9	12	1,4
	HPA-6bw	GPIIIa (CD61)	NA	00	00	1,4
	HPA-7bw	GPIIIa (CD61)	NA	NA	NA	00
	HPA-8bw	GPIIIa (CD61)	NA	NA	NA	00
	HPA-9bw	GPIIb (CD41)	00	NA	NA	00
	HPA-10bw	GPIIIa (CD61)	NA	NA	NA	0,05
	HPA-11bw	GPIIIa (CD61)	NA	NA	NA	00
	HPA-12bw	GPIb β (CD42c)	NA	NA	NA	00
	HPA-13bw	GPIa (CD49b)	NA	NA	NA	00
	HPA-14bw	GPIIIa (CD61)	NA	NA	NA	00
HPA-15	HPA-15a	CD 109	53*	NA	47,4	53,2
	HPA-15b		47*	NA	52,6	46,8
	HPA-16bw	GPIIIa (CD 61)	NA	NA	NA	00
	HPA-17bw	GPIIb/IIIa (CD61)	NA	NA	NA	00
	HPA-18bw	GPIa (CD49b)	NA	NA	NA	NA
	HPA-19bw	GPIIIa (CD 61)	NA	NA	NA	NA
	HPA-20bw	GPIIb (CD41)	NA	NA	NA	NA
	HPA-21bw	GPIIIa (CD61)	NA	NA	NA	NA
	HPA-22bw	GPIIb (CD41)	NA	NA	NA	NA
	HPA-23bw	GPIIIa (CD61)	NA	NA	NA	NA
	HPA-24bw	GPIIb (CD41)	NA	NA	NA	NA
	HPA-25bw	GPIa (CD49b)	NA	NA	NA	NA
	HPA-26bw	GPIIIa (CD61)	NA	NA	NA	NA
	HPA-27bw	GPIIb (CD41)	NA	NA	NA	NA
	HPA-28bw	GPIIb (CD41)	NA	NA	NA	NA
	HPA-29bw	GPIIIa (CD61)	NA	NA	NA	NA

*Fréquence d'une population algérienne générale

E. Voies de signalisations plaquettaires

La plaquette répond à plusieurs stimuli (agonistes), via ses récepteurs membranaires qui sont couplés à leurs tours à des voies de signalisation impliquant essentiellement la protéine G, et les immuno-récepteurs à motifs d'activation à base de tyrosine (ITAM)⁽¹⁸⁵⁾. Les récepteurs couplés à la protéine Gq sont le récepteur de la thrombine (PAR1/4), le récepteur

de la thromboxane A2 (TP α / β) et le récepteur de l'ADP (P2Y1). Ces récepteurs activent un second messenger qui est la phospholipase C (PLC β) favorise la mobilisation du calcium intracellulaire et la génération du diacylglycérol (DAG), ce signal est converti par les intégrateurs des signaux RAP1 et la protéine kinase C (PKC) en réponse cellulaire impliquant l'activation de l'intégrine GPIIb/IIIa, les mouvements et les modifications du cytosquelette et la libération des granules cytoplasmiques (Figure 9).

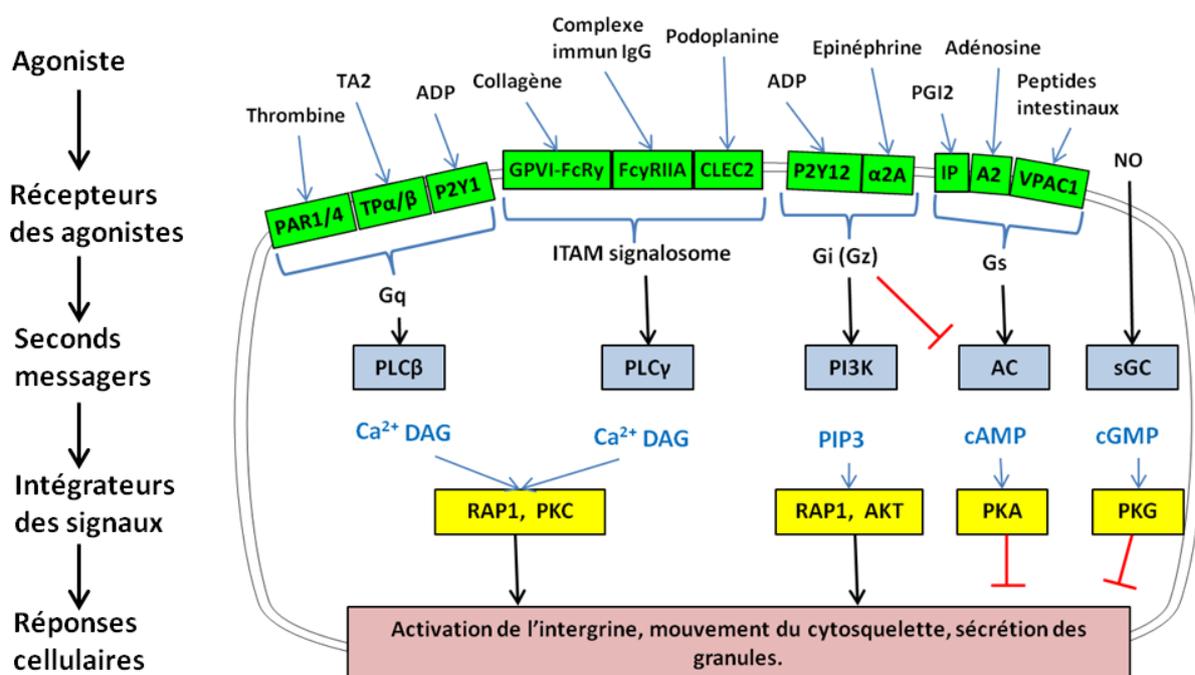


Figure 9: La signalisation plaquettaire

Vue d'ensemble des principaux nœuds de signalisation qui contrôlent l'activation des plaquettes, adapté à partir de Robert H. Lee et al (183).

Le récepteur du collagène (GPVI), le récepteur des complexes immuns IgG (Fc γ RIIA) et le récepteur du podoplanine (CLEC2) sont couplés à l'ITAM qui active un second messenger, la phospholipase C (PLC γ) favorisant la mobilisation du calcium et la génération du DAG qui sera converti par les intégrateurs RAP1 et PKC en une réponse cellulaire similaire à celle de la Protéine Gq (Figure 9).

Le récepteur de l'ADP (P2Y12) et le récepteur de l'épinéphrine (α 2A) sont couplés à une protéine Gi jouant un double rôle en activant un second messenger qui est la Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase (PI3K) et en inhibant l'adénylyl cyclase (AC) qui possède un effet inhibiteur de la plaquette. La PI3K génère la phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate (PIP3) qui active les intégrateurs RAP1 et la protéine kinase B (AKT) entraînant une réponse plaquettaire (Figure 9).

La prostaglandine I₂ (PGI₂), l'adénosine et les peptides intestinaux vasoactifs sont des inhibiteurs plaquettaires agissant via les récepteurs IP, A₂ et VPAC1 couplés à une protéine G_s entraînant l'activation du second messager Adénylyl Cyclase (AC) qui génère l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) activateur de l'intégrateur protéine kinase A (PKA) responsable de l'inhibition plaquettaire (Figure 9).

Le monoxyde d'azote (NO) sécrété principalement par les cellules endothéliales, génère directement un second messager sGC qui synthétise la guanosine monophosphate (cGMP) responsable de l'inhibition plaquettaire.

F. Les fonctions des plaquettes

La plaquette est le principal acteur de l'hémostase primaire, elle possède également des propriétés procoagulantes comme elle participe dans la régulation du système fibrinolytique⁽¹⁸⁶⁾. Par ailleurs les plaquettes ont également d'autres fonctions très divergentes, dont on cite leurs rôles dans : l'angiogenèse ; l'Athérombose ; le diabète ; l'inflammation ; la défense antimicrobienne ; l'oncologie et les métastases et les désordres immunitaires.

1. Rôle des plaquettes dans l'hémostase

a) *Inhibition des plaquettes par les cellules endothéliales :*

À l'état normal, la fluidité du sang et la circulation sont assurées par des mécanismes gérés principalement par les cellules endothéliales de la paroi vasculaire. Ces dernières, par la sécrétion de plusieurs substances anti-agrégantes, assurent le maintien des plaquettes à l'état inactif, afin d'éviter leur agrégation accidentelle et la génération des thromboses. Les plaquettes ne s'activent que dans le cas d'une rupture de la continuité des cellules endothéliales. Les principaux mécanismes d'inhibition des plaquettes sont :

- Sécrétion du monoxyde d'azote : le NO est synthétisé et sécrété par les cellules endothéliales, c'est un vasodilatateur et inhibiteur des plaquettes⁽¹⁸⁷⁾. Le NO diffuse à travers la membrane plaquettaire et induit une baisse du niveau du calcium intracellulaire, et par conséquent une inhibition du changement conformationnel du complexe GPIIb/IIIa en forme active et diminution de sa capacité à la liaison au fibrinogène⁽¹⁸⁸⁻¹⁹⁰⁾.
- Prostacyclines (Prostaglandine I₂): la PGI₂ est un dérivé de l'acide arachidonique, doté d'une activité vasodilatatrice et anti-agrégante⁽¹⁹¹⁾. La synthèse de la PGI₂ dépend d'une enzyme, la prostacycline synthétase largement distribuée et présente au niveau des cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses, mais elle est absente au niveau des plaquettes⁽¹⁹²⁾.
- CD39 (NTPDase-1) : exprimé par les cellules endothéliales, assure l'hydrolyse de l'ADP afin d'éliminer les traces de l'ADP libérée au moment de l'activation plaquettaire et prévenir l'extension du thrombus au niveau des parties saines du vaisseau sanguin⁽¹⁹³⁾.

b) Adhésion, activation et agrégation plaquettaire

La rupture de la continuité des cellules endothéliales vasculaire va mettre le sang en contact direct avec la matrice sous endothéliale, ce qui activera le processus de l'hémostase primaire⁽¹⁹⁴⁾. Les plaquettes arrivent en contact avec le sous-endothélium vasculaire au niveau de l'endroit de la brèche vasculaire ou elles se fixent sur le collagène sous endothéliale par l'intermédiaire du facteur de Von Willebrand (VWF) qui va se fixer d'une part au collagène et d'autre part au complexe GP Ib/IX exprimé à la surface des plaquettes^(195, 196). À la fin de cette étape, une couche initiale des plaquettes adhère au collagène où cette liaison va générer un signal intracellulaire d'activation plaquettaire⁽¹⁹⁷⁾. Plusieurs phénomènes se déroulent au cours de l'activation plaquettaire dont les principaux sont :

- Changement morphologique : les plaquettes activées perdent leur forme discoïde, où elles émettent des pseudopodes^(198, 199).
- Réarrangement des phospholipides membranaires : par le phénomène de flip/flop, la phosphatidylsérine chargée négativement va être exposée à la surface plaquettaire. Les plaquettes activées constituent ainsi une surface chargée négativement indispensable pour la fixation des facteurs de la coagulation^(200, 201).
- Synthèse de la Thromboxane A2 : le métabolisme des phospholipides est déclenché au moment de l'activation plaquettaire, il aboutit à la synthèse de la thromboxane A2(TX2) par l'intermédiaire des cyclo-oxygénases (COX) plaquettaires⁽²⁰²⁾. La TX2 est un puissant agent agrégeant plaquettaire, il active les plaquettes et exerce un effet de chimiotactisme sur elles. Il est également un agent vasoconstricteur qui va renforcer la vasoconstriction réflexe du vaisseau sanguin au niveau de la brèche vasculaire⁽²⁰³⁾.
- Libération du contenu granulaire : les plaquettes activées libèrent leur contenu des granules (Alpha et denses)⁽²⁰⁴⁾. La sérotonine libérée à partir des granules denses renforce encore la vasoconstriction du vaisseau, tandis que le calcium libéré est indispensable à la fixation des facteurs de la coagulation sur la surface négative des plaquettes activées. L'ADP libérée à partir des granules denses est la substance clé dans le processus d'agrégation plaquettaire. L'ADP agit via ses récepteurs membranaires plaquettaires, il induit l'activation plaquettaire et l'activation du récepteur d'agrégation GPIIb/IIIa⁽²⁰⁵⁾.

Les plaquettes activées et sensibilisées par l'ADP, expriment leurs GPIIbIIIa activées et établissent des liaisons entre elles par le biais du fibrinogène. Bien que le fibrinogène représente le principal ligand entre deux GPIIbIIIa in vivo, d'autres molécules peuvent assurer la même fonction comme : le FVW et la fibronectine. À la fin de cette étape, les plaquettes forment un agrégat au niveau de la brèche vasculaire, appelé : clou plaquettaire ou bien le thrombus blanc^(194, 206).

c) *Activité procoagulante*

L'expression de la phosphatidylsérine à la surface des plaquettes activées génère une surface procoagulante indispensable à la fixation des facteurs de la coagulation^(207, 208). Les plaquettes activées libèrent également le contenu de leurs granules très riche en substances procoagulantes, principalement : Zinc⁽²⁰⁹⁾, Fibrinogène⁽²¹⁰⁾, facteur XIII⁽²¹¹⁾, facteur V⁽²¹²⁾, Calcium⁽²¹³⁾, Protéine S⁽²¹⁴⁾...etc.

2. Rôle des plaquettes dans l'angiogenèse :

L'angiogenèse est le processus de formation d'un nouveau vaisseau sanguin, par un processus de germination à partir d'une structure vasculaire existante. Il s'agit d'un processus régulé par des facteurs de croissance tels que le VEGF (vascular endothelial growth factor) et les métalloprotéases matricielles (MMPs)^(215, 216).

Les plaquettes contiennent environ 300 différents facteurs biologiques actifs, qui sont soit synthétisés par les mégacaryocytes ou bien absorbés à partir du milieu extérieur⁽²¹⁷⁾. Il a été démontré que les plaquettes absorbent les facteurs régulateurs de l'angiogenèse libérés par les cellules tumorales⁽²¹⁸⁾, en plus de leur contenu en facteurs de l'angiogenèse qui est estimé à ce jour à 28 différents facteurs stockés au niveau des granules alpha^(219, 220). Les plaquettes sont maintenant connues pour être des régulateurs clés de l'angiogenèse, par la libération de leur contenu en facteurs de croissance, elles soutiennent la néovascularisation et la réparation des vaisseaux sanguins, et par l'absorption de ces facteurs elles préviennent l'angiogenèse pathologique.

3. Rôle dans l'athéromatose

Les plaquettes contribuent à toutes les étapes de l'athéromatose en interférant avec des processus très dynamiques⁽²²¹⁾. En présence de certains facteurs de risque comme le diabète, obésité, déficience de la fraction d'éjection du ventricule gauche, insuffisance rénale, âge avancé et insuffisance cardiaque congestive⁽²²²⁾, les plaquettes peuvent adhérer aux cellules endothéliales même en absence de rupture de ces dernières. Cette adhésion conduit à l'activation des plaquettes et des cellules endothéliales également, avec libération des cytokines et chimiokines pro-inflammatoires aboutissant à une inflammation vasculaire et une athérosclérose⁽²²³⁻²²⁵⁾.

4. Rôle dans l'inflammation

Les plaquettes participent activement dans les pathologies et les syndromes inflammatoires et immunitaires influençant les réponses de l'organisme^(226, 227). Les plaquettes libèrent de nombreux médiateurs inflammatoires, qui peuvent modifier la réponse des leucocytes et des cellules endothéliales face à certains stimuli inflammatoires. Les plaquettes forment des agrégats et des ponts entre les leucocytes et les cellules endothéliales médiés par la P-sélectine plaquettaire⁽²²⁸⁾.

Cette participation aux syndromes inflammatoires est observée et prouvée principalement dans les pathologies inflammatoires pulmonaires⁽²²⁹⁾; la malaria⁽²³⁰⁾; les sepsis⁽²³¹⁾ et les pathologies rhumatismales (Arthrite rhumatoïde, Granulomatose de Wegener et LED)⁽²³²⁻²³⁴⁾.

5. Rôle dans la défense antimicrobienne

Le rôle des plaquettes dans la défense antimicrobienne de l'organisme est actuellement bien établi. Les plaquettes interagissent avec les agents pathogènes directement et indirectement par plusieurs mécanismes. La libération du contenu granulaire entraîne la sécrétion des peptides multifonctionnels de défense de l'hôte (HDPs)⁽²³⁵⁾ agissant d'une façon comparable aux cellules immunitaires innées. Les plaquettes médient également les interactions de l'antigène avec les cellules lymphocytaires T et B, elles coordonnent donc l'immunité adaptative de l'organisme^(236, 237).

6. Rôle dans la croissance tumorale et les métastases

Il y'a une relation bien déterminée, entre les tumeurs et les thrombocytoses⁽²³⁸⁾. En effet, il existe, une boucle d'activation et de stimulation plaquettes-cellules tumorales. Les tumeurs sont à l'origine d'une augmentation du taux de la TPO et l'IL6⁽²³⁹⁾, responsable d'une augmentation de la production plaquettaire, cette thrombocytose accompagnant le processus tumoral, est souvent associée à un mauvais pronostic^(240, 241). Les cellules tumorales induisent, l'activation et l'agrégation plaquettaire⁽²⁴²⁾, après leur recrutement et concentration autour de la tumeur, les plaquettes libèrent leurs contenus granulaires, très riches en facteurs de croissance, soutenant la croissance tumorale, l'angiogenèse et la métastase^(243, 244).

II. CONDUITE À TENIR DIAGNOSTIQUE D'UNE THROMBOPÉNIE

La thrombopénie est définie par une diminution du taux des plaquettes au-dessous de 150 G/L, elle est considérée comme sévère lorsque le taux est inférieur à 20G/L. La plupart des patients ayant un taux des plaquettes supérieur à 50 G/L sont asymptomatiques, en revanche des saignements postes traumatismes minimes peuvent survenir lorsque le taux est inférieur à 30 G/l, et les saignements spontanés à moins de 10 G/L, dont on cite principalement les hémorragies au niveau : cutané ; poumons ; tractus gastro-intestinal ; système nerveux central et les muqueuses génito-urinaires^(245, 246).

A. Historique clinique

Plusieurs paramètres et informations de l'anamnèse sont très utiles et indispensables, afin d'orienter le diagnostic et la prise en charge du patient atteint d'une thrombopénie.

1. Le saignement :

Un syndrome hémorragique cutanéomuqueux spontané ou poste traumatique est en faveur d'une anomalie de l'hémostase primaire. Le clinicien doit demander les informations concernant les antécédents du patient en réponse à certains défis hémorragiques comme : la chirurgie (circoncision), extractions dentaires ; traumatismes ; injections intramusculaires ; accouchement et brossage des dents. Un saignement immédiat dans ces situations est en faveur d'un trouble de l'hémostase primaire, tandis que les saignements retardés sont en faveur d'un trouble de la coagulation. En outre, l'âge d'apparition du saignement permet de distinguer les anomalies héréditaires et acquises.

2. Sexe et historique familial

La présence d'antécédents familiaux est en faveur d'une transmission héréditaire de l'anomalie plaquettaire. Certaines thrombopénies sont à transmission liée au chromosome X (ex. : Syndrome de Wiskott-Aldrich), elles sont donc présentes quasi exclusivement chez les hommes. D'autres sont à transmission autosomale récessive comme le syndrome de Bernard-Soulier ou dominante comme l'anomalie MYH9.

3. Historique pathologique et thérapeutique

Plusieurs médicaments peuvent induire une thrombopénie, principalement l'héparine, la quinidine et ses dérivés. On note également les sulfamides, pénicillines, vancomycines, sels d'or, acide valproïque, carbamazépine, chlorothiazide, abciximab, tirofiban et eptifibatide.

Les antécédents pathologiques visent à révéler une thrombopénie secondaire à une pathologie évidente comme : insuffisance rénale, insuffisance hépatocellulaire, syndromes myéloprolifératifs, leucémies aiguës et syndromes myélodysplasiques.

B. Examen clinique

Plusieurs signes cliniques sont évocateurs d'une pathologie bien particulière, et peuvent constituer un élément d'aide importante dans l'orientation diagnostique. On note la présence d'une splénomégalie qui peut indiquer un hypersplénisme (maladie de Gaucher par exemple); les troubles neurologiques suggèrent un purpura thrombotique thrombocytopénique; un eczéma chez un garçon suggère la possibilité d'un syndrome de Wiskott-Aldrich; un hémangiome géant chez un nouveau-né suggère le syndrome de Kasabach-Merrit; l'albinisme oculocutané est observé dans le syndrome de Chediak-Higachi; une surdité et/ou hypertension suggère un trouble lié à MYH9; une anomalie cardiaque, manifestation ORL, retard de développement et retard mental sont associés au syndrome de Bernard-Soulier.

C. Examens biologiques

1. Numération plaquettaire

Les automates d'hématologie, fournissent des résultats de numération plaquettaire rapides et précis, sur du sang veineux prélevé sur un tube EDTA-K2 ou EDTA-K3. Néanmoins certaines erreurs de numération peuvent être observées, nécessitant une attention particulière du biologiste avant la validation de la NFS. On note principalement les fausses thrombopénies causées par une agrégation plaquettaire in vitro par un mécanisme immunologique, faisant intervenir des anticorps dirigés contre un antigène plaquettaire modifié ou associé à l'EDTA⁽²⁴⁷⁾. Par ailleurs, une surestimation du taux des plaquettes par l'automate peut masquer une vraie thrombopénie et induire le clinicien en erreur, cette situation est habituellement observée dans le cas des anémies hémolytiques avec la présence des schizocytes, ainsi dans le cas des microcytoses très importantes. L'exactitude de la numération plaquettaire dépend des performances de l'automate, les erreurs sont plus fréquentes si l'automate effectue le comptage des plaquettes par impédance électrique uniquement⁽²⁴⁸⁾ cependant, avec les avancés technologiques d'autres principes de mesure et améliorations sont actuellement associés à l'impédance électrique pour une meilleure précision de numération et élimination des interférences des plaquettes géantes, agrégats plaquettaires et schizocytes. Les principales améliorations apportées à l'impédance consistent à l'étude des histogrammes du volume plaquettaire, la production d'une courbe lisse et l'utilisation d'un seuil mobile de discrimination des globules rouges et plaquettes au lieu d'un seuil fixe. Les principaux autres principes de mesure sont la diffraction de la lumière optique ou les techniques immunologiques à l'aide d'un anticorps anti-CD61 fluorescent, cette dernière est une technique couteuse mais elle est considérée comme la technique de référence de la numération plaquettaire⁽²⁴⁹⁾.

Le résultat de la numération de la ligne leucocytaire peut fournir des renseignements supplémentaires très utiles. On identifie un groupe de pathologies qui se présentent en forme thrombopénique isolée (Tableau 3), d'autres pathologies sont souvent associées à une

hyperleucocytose ou bien à une leucopénie comme les aplasies médullaires et les infiltrations médullaires dans le cas des leucémies ou les métastases des tumeurs solides.

Les automates actuellement peuvent mesurer d'autres paramètres plaquettaires, comme le taux des plaquettes immatures (plaquettes réticulées), qui peut être utile dans la différenciation des thrombopénies centrales (taux de plaquettes réticulées diminué), des thrombopénies secondaires ou par excès de destruction (taux de plaquettes réticulées élevé)⁽²⁵⁰⁾. En outre, le VPM, mesuré par l'automate qui nous renseigne sur les anomalies de la taille plaquettaire, il nous permet de différencier les plaquettes de taille petite, grande et géante (Tableau 3).

2. Frottis sanguin

L'examen du frottis sanguin est indispensable dans le cas des thrombopénies. Il permet une estimation de la richesse plaquettaire pour confirmer le taux mesuré par l'automate d'une part ; ou bien de corriger le taux de plaquettes en cas de sous-estimation par formation d'agrégats plaquettaires ou de surestimation par la présence de schizocytes et de microcytes. L'estimation de la richesse plaquettaire sur un frottis sanguin est effectuée après décompte du nombre moyen des plaquettes présentent par un champ de microscope, et peut améliorer par la détermination du rapport entre le nombre de plaquettes et celui des globules rouges ou bien les globules blanc.

Outre la richesse, la taille plaquettaire est estimée directement sur le frottis, elle permet de distinguer les plaquettes de grande taille qui est fréquente dans les thrombopénies immunologiques ; les plaquettes géantes observées essentiellement dans des formes congénitales (Macrothrombopathie méditerranéenne, syndrome de Bernard-Soulier et anomalie MYH9) ; les plaquettes de petite taille dans le syndrome de Wiskott-Aldrich. Par ailleurs, l'aspect cytologique des plaquettes peut fournir des informations utiles également, comme la présence des plaquettes grises agranulaires dans le syndrome des plaquettes grises.

L'analyse des leucocytes sur le frottis peut mettre en évidence la présence des cellules immatures (myéloblastes ou lymphoblastes) dans le cas des leucémies aiguës, une myélémie ou une infiltration lymphocytaire dans le cas des syndromes myéloprolifératifs et lymphoprolifératifs respectivement. La présence des inclusions intracytoplasmiques dans les neutrophiles (corps de Döhle) est observée dans les troubles liés au syndrome MYH9, ainsi que la présence des granulations géantes dans les neutrophiles, les monocytes et les lymphocytes est observée dans le syndrome de Chediak-Higashi.

La présence de globules rouges fragmentés (schizocytes) est observée habituellement dans le purpura thrombotique thrombopénique et le syndrome hémolytique urémique.

3. Médullogramme

Toutes atteinte médullaire par une cytopénie bénigne acquise ou congénitale ; aplasie médullaire ou une prolifération maligne se traduit par une thrombopénie périphérique. Bien que ces pathologies soient souvent accompagnées de manifestations cliniques et biologiques multiples, leur diagnostic peut chevaucher avec celui du PTI pour certains cas, dans ces situations l'étude de la moelle osseuse par réalisation d'un médullogramme permet de confirmer le diagnostic des leucémies aiguës et des aplasies médullaires et d'éliminer le PTI. Le médullogramme est utile également dans le cas de l'amégacaryocytose. L'estimation de la richesse médullaire en mégacaryocytes permet globalement de différencier les thrombopénies d'origine centrale des thrombopénies périphériques, à l'exception de certains cas du PTI où la richesse en mégacaryocytes peut être diminuée.

D. Diagnostic étiologique

Les étiologies d'une thrombopénie sont très divergentes, les principaux mécanismes impliqués ainsi que les pathologies correspondantes sont rapportés dans le (Tableau 3 et Tableau 4). L'historique et l'examen cliniques, avec les données biologiques de l'hémogramme et le médullogramme, sont souvent suffisants pour poser le diagnostic étiologique, ou bien l'orienter vers d'autres examens complémentaires de confirmation.

- Le diagnostic du PTI est posé par exclusion de toutes les autres étiologies. Le taux d'hémoglobine, le taux de leucocytes et le frottis sont normaux. Pas de syndrome tumoral ni d'anomalie de radius. On note que l'anémie peut être parfois associée à cause du saignement ou bien d'un syndrome d'Evans.
- La CIVD est une complication poste chirurgicale ou infectieuse, dont le bilan d'hémostase est perturbé avec augmentation des D-Dimères, diminution du fibrinogène et allongement du TQ/TCA.
- La thrombopénie induite par l'héparine et les thrombopénies médicamenteuses sont révélées par l'historique clinique et thérapeutique du patient.
- Le lupus est une pathologie parfois difficile à diagnostiquer, dans le cas où la thrombopénie précède les autres signes cliniques de la pathologie. Le diagnostic est confirmé par la recherche des anticorps anti-phospholipides et les anticoagulants lupiques.
- La thrombopénie associée au virus de l'HIV est suspectée par l'historique clinique du patient. Les formes nouvelles sont confirmées par la sérologie et la charge virale.
- Le PTT et le SHU sont caractérisés par la présence de schizocytes au frottis sanguin et l'altération des fonctions rénales.
- La CVID (Common variable immunodeficiency) est confirmée par une diminution des immunoglobulines sériques.
- Le purpura poste transfusionnel est une complication qui survient 3 à 4 jours après la transfusion d'un produit sanguin.

- La maladie de Willebrand type 2B et le pseudo-Willebrand sont caractérisés par une agrégation plaquettaire anormale aux faibles doses de ristocétine.
- Le syndrome de Bernard-Soulier est caractérisé par la présence de plaquettes de grande taille avec une agrégation faible à la ristocétine. L'historique familial est en faveur d'une anomalie congénitale.
- Le syndrome de Wiskott-Aldrich est suspecté devant la présence d'un eczéma chez un enfant de sexe masculin associée à des plaquettes de petite taille au frottis sanguin.
- L'absence du radius est facilement diagnostiquée par un examen clinique du nouveau-né.
- L'amégacaryocytose congénitale est confirmée par l'absence isolée des mégacaryocytes au médullogramme.
- La macrothrombopathie méditerranéenne est caractérisée par la présence de plaquettes de grande taille et de plaquettes géantes au frottis sanguin chez un patient asymptomatique.
- Les thrombopénies héréditaires sont confirmées par la recherche des mutations correspondantes (Tableau 3), en présence d'un historique familial en faveur, avec exclusion des autres étiologies des thrombopénies néonatales.
- Hypersplénisme est mis en évidence par un examen clinique du patient.
- Les hémangiomes géants sont souvent présents dans le syndrome de Kasabach-Merritt.

Tableau 3: Causes de thrombopénies isolées (Taux normal de GB)

Mécanisme	Pathologies
Augmentation de la destruction plaquettaire	<ul style="list-style-type: none"> - Thrombopénie immunologique (PTI, FNAIT, PPT) - Purpura thrombotique thrombopénique (PTT) - Thrombopénie induite par l'héparine (TIH) - Autres thrombopénies médicamenteuses. - LED, HIV, CIVD, CVID - Purpura poste transfusionnel⁽²⁵¹⁾. - Maladie de Willebrand type 2B et le pseudo-Willebrand. - Syndrome de Wiskott-Aldrich⁽²⁵²⁾
Diminution de la synthèse plaquettaire	<p>Plaquettes de taille normale</p> <ul style="list-style-type: none"> - Amégacaryocytose congénitale⁽²⁵³⁾ - Thrombopénie avec absence de radius (TAR)⁽²⁵⁴⁾. - Désordre plaquettaire familial avec prédisposition aux leucémies aigües myéloïdes (FPD/AML)⁽²⁵⁵⁾. - Syndrome de Paris-Trousseau/Jacobsen⁽²⁵⁶⁾. - Syndrome de Stormorken/Syndrome de plaquettes York⁽²⁵⁷⁾ - Infections virales : HIV, HBV, HCV, EBV, CMV, parvovirus B19, varicelle zona, rubéole⁽²⁵⁸⁾. - Insuffisance hépatocellulaire.

	Plaquettes de grande taille <ul style="list-style-type: none"> - Syndrome de Bernard-Soulier⁽²⁵⁹⁾. - Macrothrombopathie méditerranéenne⁽²⁶⁰⁾. - Pathologie liée à MYH9⁽²⁶¹⁾. - Syndrome des plaquettes grises⁽²⁶²⁾. - Thrombopénies constitutionnelles liées aux mutations⁽²⁶³⁾: TUBB1, GF11b, TRPM7, ACTN1, PRKACG, TPM4, DIAPH1, SRC, ITGA2B/ITGB3,
Séquestration	<ul style="list-style-type: none"> - Hypersplénisme - Syndrome de Kasabach-Merritt⁽²⁶⁴⁾
Destruction plaquettaire et hémodilution	<ul style="list-style-type: none"> - Perfusion extracorporelle
Grossesse	<ul style="list-style-type: none"> - Thrombopénie gestationnelle⁽²⁴⁵⁾. - HELP syndrome⁽²⁶⁵⁾.

Tableau 4: Thrombopénies associées à une leucopénie ou une hyperleucocytose.

<ul style="list-style-type: none"> - Leucémie myéloïde chronique en phase d'accélération. - Syndromes lymphoprolifératifs. - Métastase médullaire de tumeurs solides. 	<ul style="list-style-type: none"> - Leucémies aiguës. - Aplasie médullaire. - Anémie mégaloblastique.
--	---

III. LE PTI : PHYSIOPATHOLOGIE, DIAGNOSTIC ET PRISE EN CHARGE

Le PTI, est une pathologie auto-immune caractérisée par une diminution isolée du taux de plaquettes au-dessous de 100 G/L, il est classé selon la durée de la pathologie en, nouveau PTI (≤ 3 mois) ; PTI persistant (3-12mois) et PTI chronique (≥ 12 mois)⁽²⁶⁶⁾. Il existe une grande hétérogénéité de la présentation de la pathologie entre les patients, selon la sévérité des manifestations hémorragiques et sa corrélation avec le taux de plaquettes^(267, 268) et selon la réponse aux différents traitements⁽⁹⁾.

L'incidence réelle du PTI est inconnue, cependant les informations collectées à partir des études réalisées montre une incidence chez les enfants estimée à environ 5 cas/100000⁽²⁶⁹⁾ avec une variabilité entre les populations allons de 4,6/100000 enfants chez les européens⁽²⁷⁰⁾ à 7,2/100000 enfants en Amérique du Nord⁽²⁷¹⁾. Chez les adultes l'incidence annuelle est estimée à 3/100000 avec une prédominance féminine, ratio femme/homme à 1,9/1^(272, 273).

A. Physiopathologie

La physiopathologie du PTI n'est pas complètement connue, elle résulte de l'interaction de plusieurs facteurs. La grande variabilité dans la gravité, la durée et la réponse aux traitements est en rapport avec le facteur prédominant. Les principaux mécanismes impliqués sont décrits dans cette section.

1. Lymphocytes B et la réponse immunitaire humorale

Le PTI est la conséquence d'un désordre immunitaire aboutissant à la synthèse d'anticorps antiplaquettes, dirigés principalement contre les complexes glycoprotéiques GPIIb/IIIa et GPIb/IX⁽²⁷⁴⁾. Ces anticorps sont produits par des plasmocytes spléniques caractérisés par une durée de vie plus longue chez les patients PTI⁽²⁷⁵⁾, ces plasmocytes sont également mis en évidence dans la moelle osseuse⁽²⁷⁶⁾.

Plusieurs anomalies des lymphocytes B ont été décrites dans le PTI, incluant l'augmentation du niveau du facteur d'activation des lymphocytes B (BAFF), induisant la prolifération et la survie des LyB associées à une anomalie des LyB rég (CD19+CD24+FOXP3+), ce qui est à l'origine d'une diminution de la tolérance du soi^(277, 278). En outre, Audia et al⁽²⁷⁹⁾ ont démontré une coopération avec les LyT, impliquant le LyT folliculaire auxiliaire (TFH, *T follicular helper cells*) au niveau de la rate via la sécrétion de l'IL-21⁽²⁸⁰⁾.

Les anticorps antiplaquettes, affectent les plaquettes circulantes, dans la rate et également ils affectent la synthèse et la maturation des mégacaryocytes au niveau de la moelle^(281, 282). Il est supposé que la cible antigénique de ces anticorps puisse avoir un lien

direct avec la sévérité de la pathologie, il semble que les anticorps anti-GPIbIX sont associés à des formes plus sévères avec résistance aux traitements^(92, 283). De manière générale, les anticorps antiplaquettes entraînent la destruction des plaquettes cibles par plusieurs mécanismes : par cytotoxicité dépendante du complément ; par opsonisation via les récepteurs FcγR ; par ADCC (cytotoxicité cellulaire dépendante d'anticorps) et par désialylation plaquettaire. Ces mécanismes sont détaillés ci-dessous.

a) Activation du système du complément

Il a été démontré qu'environ 50 à 60% des anticorps antiplaquettes dans le sérum des patients PTI peuvent activer la voie classique du complément, cette activation aboutie à la formation du complexe d'attaque membranaire et la lyse plaquettaire, elle facilite également la phagocytose plaquettaire par opsonisation^(284, 285). Ce mode d'action concerne à la fois, les plaquettes circulantes et les mégacaryocytes médullaires, entraînant une baisse du taux de plaquettes réticulées⁽²⁸⁵⁾. Les anticorps les plus incriminés sont les anti-GPIIbIIIa et à un degré moins les anti-GPIbIX⁽²⁸⁴⁾.

b) Opsonisation par les macrophages spléniques

Les anticorps antiplaquettes fixés à la surface des plaquettes sont captés par les macrophages spléniques par le biais des récepteurs FcγR. Cette liaison permet l'opsonisation et la destruction des plaquettes. En outre, les macrophages présentent des déterminants antigéniques des plaquettes dégradées à leur surface, ce qui va stimuler les lymphocytes T autoréactifs⁽²⁸⁶⁾.

c) Désialylation plaquettaire

Contrairement aux anticorps anti-GPIIbIIIa qui induisent la destruction plaquettaire par opsonisation macrophagique, il a été démontré que les anti-GPIbIX sont responsables d'une désialylation des plaquettes, qui consiste à la perte de l'acide sialique des glycoprotéines membranaires et l'exposition du sucre galactose qui est reconnu par les récepteurs d'Ashwell-Morell hépatiques⁽²⁸⁷⁾. Cette liaison induit la destruction plaquettaire par un mécanisme non FcγR dépendant, ceci explique la grande variabilité dans la réponse aux traitements. Il a été montré qu'une augmentation de l'intensité de la désialylation est en rapport avec une résistance aux traitements de première ligne du PTI⁽²⁸⁸⁾, principalement les immunoglobulines intraveineuses IVIg qui sont moins efficaces chez les patients PTI présentant un anticorps anti-GPIbIX⁽²⁸⁹⁾.

2. Implication des lymphocytes T

Plusieurs désordres touchant la ligne lymphocytaire T, ont été détectés dans le cas du PTI. On note principalement un déficit quantitatif ou fonctionnel en Lymphocytes régulateurs (Treg)⁽²⁹⁰⁾, qui sont responsables de l'inhibition de la plupart des cellules immunitaires impliquées dans la réponse immunitaire. On note également une réponse immunitaire

cellulaire cytotoxique, médiée par les lymphocytes TCD8, qui peut cibler les plaquettes et les mégacaryocytes⁽²⁹¹⁾.

3. Déficit de production médullaire

Bien que le PTI est considéré comme une thrombopénie d'origine périphérique, les premières études de la régénération médullaire ont montré que la production médullaire n'était pas à la hauteur de l'importance de la destruction périphérique⁽²⁹²⁾. Cette atteinte de la production médullaire résulte de deux principaux mécanismes :

a) Destruction des mégacaryocytes

Étant donné que les mégacaryocytes expriment également les GP plaquettaires (GPIIb/IIIa, GPIb/IX et GPIa/IIa), les anticorps antiplaquettes de la réponse immunitaire humorale, ciblent les mégacaryocytes et induisent la diminution de leur nombre⁽²⁹³⁾. En outre, les mégacaryocytes sont ciblés également par les lymphocytes TCD8 cytotoxiques qui perturbent les mécanismes d'apoptose médullaire et diminuent le nombre de mégacaryocytes⁽²⁹⁴⁾.

b) Diminution de la thrombopoïétine

La thrombopoïétine est le principal facteur de croissance mégacaryocytaire. La stimulation des mégacaryocytes est induite par la TPO libre dans le plasma après sa fixation sur son récepteur plaquettaire (voire I.A.4 page 7). Au cours du PTI, la destruction des plaquettes est principalement périphérique, les plaquettes détruites fixent une grande quantité de la TPO et diminuent sa fraction libre qui stimule les mégacaryocytes⁽²⁹⁵⁾.

4. Facteurs déclenchant

Le PTI est une pathologie acquise secondaire à un désordre immunitaire, dont plusieurs facteurs sont incriminés, principalement les infections virales et certaines expositions environnementales. Il est admis que la réaction auto-immune est fréquemment déclenchée par les infections virales. Certains anticorps synthétisés au cours de la réponse immunitaire peuvent avoir une réaction croisée antiplaquettaire, comme le cas de la varicelle chez l'enfant ou le V.I.H. chez l'adulte⁽²⁹⁶⁾. Par ailleurs, il a été montré que la sévérité et la gravité du PTI sont fortement liées à la persistance de l'infection sous-jacente (V.I.H., HCV, CMV et HP).

Plusieurs états de déficits immunitaires avec une anomalie des lymphocytes B et de la synthèse d'anticorps sont associés à un PTI. Ceci est observé essentiellement au cours de la LLC (leucémie lymphoïde chronique), la CVID (immunodéficiences communes variables), le déficit en IgA et le déficit en IgG2⁽²⁹⁷⁾. En outre, le PTI est fréquent dans d'autres pathologies, comme le syndrome des antiphospholipides, la maladie d'Hodgkin et les LMNH.

B. Diagnostic du PTI

Jusqu'à maintenant il n'existe pas de test diagnostique spécifique au PTI. Le diagnostic est évoqué après l'élimination des autres étiologies sur la base de l'examen clinique, l'historique du patient, la numération formule sanguine et le frottis sanguin. Les recommandations du rapport du consensus international du groupe d'experts⁽⁹⁾ et les directives de la société américaine d'hématologie (ASH 2011 et 2018)^(9, 13, 298) sont présentées dans le tableau ci-dessous (

Tableau 5). L'évaluation basique d'un PTI comprend :

- Historique (personnel et familial) et l'examen clinique.
- Hémogramme (NFS + frottis sanguin).
- Dosage d'immunoglobulines IgG, IgA et IgM (chez l'enfant).
- Test de Coombs direct Groupage sanguin Rhésus (pour le choix de la thérapeutique).
- Dépistage V.I.H., HCV et H. Pylori.
- Médullogramme (patient de plus de 60 ans, candidat de splénectomie).

Paramètres d'orientation diagnostique	En faveur d'un PTI primaire	En faveur d'une autre étiologie
Historique personnel	- Pétéchies, ecchymoses, épistaxis, ménorragies, hématurie. - Infections virales, ou vaccin ROR chez l'enfant. - Taux de plaquettes normal antérieurement. - RAS	-SAPL ou autre maladie auto-immune -Hémarthrose. -Prise médicamenteuse récente. -Éruption cutanée, fièvre.
Historique familial	-Aucun	-Thrombopénie familiale.
Examen clinique	-RAS, mis à part le saignement	-Splénomégalie, hépatomégalie, adénopathie. -Anomalie radiologique du radius.
Hémogramme	-Thrombopénie isolée -plaquettes de grande taille (non géantes) -Anémie microcytaire (possible par saignement)	-Agrégats plaquettaires ou satellitisme. -Morphologie plaquettaire anormale : géantes, petites. -Inclusions neutrophiles (MYH9). -Schizocytes (PTT, SHU). -Sphérocytes (Evans). -Blastes (Leucémie)
Dépistage HIV, HCV	-Négatif	-Positif
Recherche de H.Pylori	-Négatif	-Positif
Quantification IgG, IgM et IgA	-Normale	-Anormale (Pic monoclonal)
Test de Coombs direct	-Négatif	-Positif (AHA1, Evans ou autre désordre immunologique).
Médullogramme	-Normal, ou une diminution de la richesse en mégacaryocytes	-Hémopathie maligne (LA, SMP, SLP, SMD) -Aplasie.

Tableau 5: Recommandations diagnostiques du PTI selon l'ASH^(9,13,293)

Cependant le diagnostic est compliqué dans certaines situations. Chez l'enfant, une hépatosplénomégalie peut être observée au cours des infections à EBV ou autres virus, cependant chez l'adulte est parfois encore plus compliqué, en cas de comorbidités ou un séjour prolongé en hospitalisation et risque d'infections nosocomiales, le diagnostic d'un PTI devient très difficile. En outre, l'anémie microcytaire non expliquée par le saignement peut être due à une carence martiale.

D'autres tests biologiques sont prescrits en cas par cas : SAPL, FAN, CMV, EBV, parvovirus, TSH (anti-TPO et anti-TG), taux de TPO, anticorps anti-plaquettes⁽⁹⁾.

C. Traitement

Le but du traitement est d'assurer une hémostasie suffisante afin d'arrêter les saignements, éviter les hémorragies graves, minimiser les toxicités associées et il doit être optimisé selon le mode de vie et les activités du patient. Il existe actuellement des traitements de première, deuxième ligne, ainsi que les traitements d'urgence^(7-9, 13, 298-300).

La décision thérapeutique et le choix du traitement sont parfois difficiles, en rapport avec la difficulté de différencier les patients présentant un risque de saignement grave, des patients pouvant avoir une amélioration spontanée. La majorité des patients atteints du PTI présentent peu ou aucun syndrome hémorragique, le taux des hémorragies graves (cérébrales), est estimé à <1% chez les enfants et 1,4% chez les adultes⁽³⁰¹⁾. Le risque d'hémorragie cérébrale augmente chez les sujets âgés de plus de 60 ans présentant des comorbidités, cependant il n'est pas corrélé avec le taux de plaquettes⁽³⁰²⁾, c'est pour cette raison que le but du traitement est de maintenir un taux de plaquettes >30G/l afin de réduire de risque des hémorragies à haut risque^(7, 8, 299, 302).

1. Traitements de première ligne

Le but du traitement de première ligne est d'arrêter rapidement le saignement ou le risque de complication grave. Il inclut :

- **Les corticostéroïdes** : *dexaméthasone, prednisone ou prednisolone, méthylprednisolone*. Ils inhibent la plupart des cellules immunitaires, principalement les macrophages spléniques ; une augmentation de la clairance des auto-anticorps via le récepteur Fc néonataux FcRn⁽³⁰³⁾ ; normalisation du taux des lymphocytes T reg⁽³⁰⁴⁾ et activation de la mégacaryopoïèse⁽³⁰⁵⁾. Par ailleurs, leurs toxicités surtout à long cours (*changement d'humeur, somnolence, prise de poids, retard de croissance, HTA, pancréatite, ostéoporose...etc.*) limitent considérablement leurs utilisations. Environ deux tiers des patients traités par les corticostéroïdes enregistrent une diminution ou un arrêt du saignement avec une augmentation du taux de plaquettes, cependant ces effets sont généralement transitoires et inversés après la dégression ou l'arrêt du traitement⁽³⁰⁶⁾.

- **Les immunoglobulines intraveineuses IVIg:** leurs mécanismes d'action ne sont pas encore bien compris, mais il est admis qu'ils agissent en inhibant l'action d'opsonisation macrophagique FcγR dépendante⁽³⁰⁷⁾. La réponse aux IVIg est plus rapide que celle des corticostéroïdes, le pic des plaquettes est enregistré en moyenne au bout de 3 jours⁽³⁰⁸⁾. Environ 75 à 80% des patients enregistrent un arrêt du saignement et augmentation du taux de plaquettes, cependant des réactions allergiques de la perfusion peuvent apparaître (*maux de tête, fièvre, hypotension, tachycardie, nausée et plus rarement un choc anaphylactique*)⁽³⁰⁹⁾.
- **Antiglobuline humaine anti-D:** utilisée chez les patients PTI rhésus positif, son mécanisme d'action est similaire à celui des IVIg, mais avec moins de réactions allergiques de perfusion que celle des IVIg, en revanche l'anti-D provoque une légère hémolyse extravasculaire qui peut diminuer le taux d'hémoglobine de 1 à 2 g/dl⁽³¹⁰⁾.

2. Traitements de deuxième ligne

20 à 30% des patients PTI, ne répondent pas aux traitements de première ligne, dans ce cas les traitements de deuxième ligne peuvent être prescrits.

- **Rituximab anti-CD20:** Il provoque une déplétion en lymphocytes B à l'origine de la synthèse des auto-anticorps. Il induit une augmentation du taux de plaquettes >50G/L dans 40 à 60% des cas et une normalisation des plaquettes >150G/L dans 20 à 40% des cas^(311, 312). La réponse au rituximab peut durer de 4 à 12 mois avec une rémission complète de 3 à 5 ans estimée de 20 à 25% des cas⁽³¹²⁾.
- **Agonistes du récepteur de la thrombopoïétine ARTPO (Romiplostim et Eltrombopag):** l'avènement des ARTPO a révolutionné la prise en charge thérapeutique du PTI, en rapport avec leur grande efficacité et très faible toxicité. Ils entraînent une réponse rapide par la stimulation des mégacaryocytes médullaires et l'augmentation de la production plaquettaire, mais cet effet est souvent transitoire. Cependant il a été montré qu'une rémission prolongée peut être obtenue dans environ 15% des cas⁽³¹³⁾.
- **Splénectomie:** le but de la splénectomie est de supprimer le lieu de destruction des plaquettes d'une part, et d'éliminer le lieu de l'interaction des cellules immunitaires responsables de la réaction auto-immune. La normalisation du taux de plaquettes est obtenue chez 80% des patients environ, avec un effet prolongé de 5 à 10 ans chez deux tiers des cas⁽³¹⁴⁾.

IV. RECHERCHE DES ANTICORPS ANTIPLAQUETTES

En 1951 Harrington et al ont montré que le plasma provenant d'un patient atteint d'un PTI contient un facteur doté d'une capacité d'induire une thrombopénie chez les sujets sains. La première phase des essais après cette découverte était centrée sur la mise en évidence d'une éventuelle relation entre ce facteur inhibiteur et : l'agrégation plaquettaire, la libération de l'ADP, C14-serotonine, chromium51 et l'inhibition de la rétraction du clou plaquettaire, mais tous ces tests manquaient de sensibilité et de spécificité. En 1975 Dixon et al⁽³¹⁵⁾ développent le premier test de quantification des auto-anticorps antiplaquettes, basé sur l'inhibition de l'hémolyse des globules rouges du mouton, suite à la consommation de l'antiglobuline par les plaquettes du PTI. L'avènement des techniques radiométriques RIA⁽³¹⁶⁾ a permis une quantification plus précise des Ig de surface plaquettaire, à l'aide des anticorps anti-IgG I125 et anti-C3 I125⁽³¹⁷⁾. Ces techniques ont montré une excellente sensibilité, mais une mauvaise spécificité, par rapport aux taux élevés des anticorps antiplaquettes retrouvés chez les sujets présentant des thrombopénies non immunologiques, et même chez les sujets sains. Ceci est dû à la détection non ciblée de ces techniques des anticorps non spécifiques aux glycoprotéines plaquettaires de surface, en outre elles sont très complexes et non adaptées à l'utilisation en routine⁽³¹⁸⁾.

Avec le développement des anticorps monoclonaux, il est devenu possible de mesurer, les anticorps spécifiques aux glycoprotéines plaquettaires, par des techniques immuno-enzymatiques ou par immunofluorescence. Ces techniques détectent les anticorps antiplaquettes soit directement fixés à la surface des plaquettes (méthode directe), ou bien libres au niveau sérique (méthode indirecte). Par ailleurs, certaines techniques mettent en évidence des anticorps spécifiques aux GP plaquettaires, alors que d'autres sont basés sur le dépistage global des anticorps à la surface des plaquettes.

La recherche des anticorps directement fixés à la surface des plaquettes (méthode directe) est recommandée dans la recherche des auto-anticorps. Elle est réalisée soit par des techniques immuno-enzymatiques (ELISA, MAIPA) qui sont très spécifiques, mais peu sensibles, soit par immunofluorescence (PAIg par cytométrie en flux), qui est très sensible, mais moins spécifique que la MAIPA.

La recherche des anticorps antiplaquettes au niveau du sérum ou plasma du patient est utile dans le cas des allo-immunisations plaquettaires comme la thrombopénie néonatale (TNN), le purpura post transfusionnel (PPT) et l'inefficacité transfusionnelle plaquettaire. Cette méthode ne différencie pas les auto-anticorps des alloanticorps, elle n'est donc pas indiquée dans le cas du PTI⁽³¹⁹⁾, mais elle peut être utile dans certaines situations. Elle est réalisée par les techniques immuno-enzymatiques (ELISA, ACE, MACE et MAIPA) et par

immunofluorescence FCIA. Leur sensibilité est faible dans la détection des auto-anticorps ou les anticorps à faible titre.

A. Techniques immuno--enzymatiques

Les plus utilisées sont la technique ELISA sandwich, ELISA capture d'antigène (ACE), ELISA capture d'antigène modifiée (MACE) et l'immobilisation des antigènes plaquettaires par des anticorps monoclonaux (MAIPA)⁽¹⁷⁹⁾.

Dans la technique ELISA, on utilise une microplaque recouverte de glycoprotéines plaquettaires connues, obtenues à partir d'un lysat par détergents de plaquettes phénotypées. Le principe des autres techniques est dérivé de l'ELISA :

1. ELISA capture d'antigène ACE

Dans l'ACE les glycoprotéines plaquettaires sont liées à la plaque par un anticorps monoclonal spécifique. Après l'ajout du sérum du patient, les anticorps liés sont détectés par une antiglobuline humaine marquée par une enzyme.

2. ELISA capture d'antigène modifiée MACE

Dans la méthode MACE, le sérum du patient est incubé avec les plaquettes d'abord (avant la capture d'antigène), suivi de lavage et lyse plaquettaire par des détergents. Le lysat plaquettaire est ensuite capturé sur la plaque comme la méthode ACE.

3. MAIPA (monoclonal antibody immobilization of platelet antigens)

Elle diffère de la MACE, par une incubation des plaquettes avec anticorps spécifique au GP⁽³²⁰⁾. Les glycoprotéines plaquettaires, sensibilisées par les autos ou alloanticorps, se fixent sur la surface solide de la plaque par le biais des mouse anti-IgG. La révélation est assurée par un autre anticorps anti-immunoglobuline humaine anti-IgG couplé à une enzyme (peroxydase) en contact avec le substrat approprié qui donne un signal lumineux. Les résultats sont exprimés en DO (Figure 10).

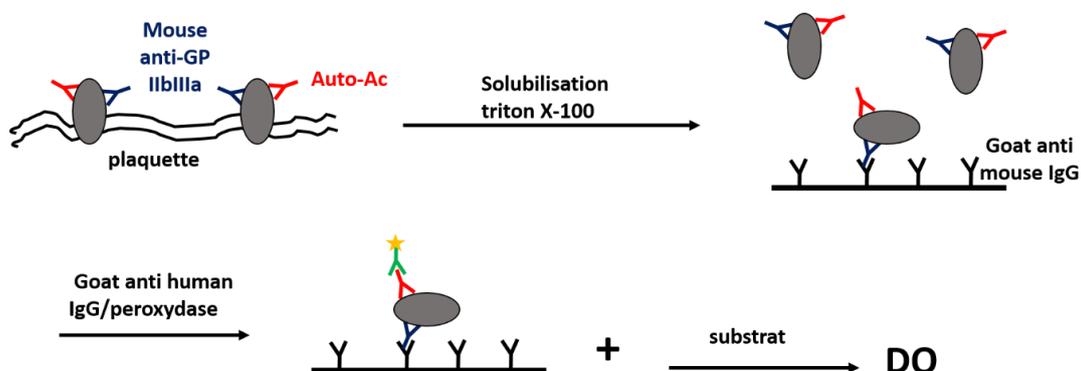


Figure 10: Principe de la technique MAIPA

La MAIPA est considérée comme la technique la plus spécifique à la détection d'anticorps antiplaquettes de 70 à 90%⁽³²⁰⁻³²⁵⁾. Van Leuven⁽³²⁶⁾ a rapporté que 80% des patients ont des Ac anti-GPIIb/IIIa, et selon Hamidpour⁽³²¹⁾ 48% des PTI sont GPIIb/IIIa et 35% d'une association GPIIb/IIIa avec GPIb/IX. Fuji Sawa⁽³²⁷⁾ a rapporté à son tour que 75% des patients ont un antiGPIIb/IIIa et/ou antiGPIb/IX.

Bien que la MAIPA est très spécifique, elle manque de sensibilité par rapport aux autres techniques telles que l'ELISA, ce qui empêche son utilisation comme un test de dépistage, l'autre limite de cette technique, qu'elle est irréalisable dans les cas des thrombopénies sévères quand la recherche est effectuée par méthode directe.

La recherche indirecte des anticorps antiplaquettes par techniques immunoenzymatiques sont très utiles dans le dépistage des thrombopénies néonatales par allo-immunisation, par la détection spécifique des anticorps anti-GP plaquettaires. Cependant ces techniques ne détectent pas les réactivités non HPA (HLA ou système de groupes sanguins), et les kits commerciaux détectent uniquement les anticorps plaquettaires communs.

B. Techniques d'immunofluorescence par cytométrie en flux

1. La cytométrie en flux

La cytométrie en flux est une technologie qui analyse rapidement des cellules ou des particules isolées qui passent dans un flux de liquide devant un ou plusieurs lasers⁽³²⁸⁾. Au fil des années avec ses multiples applications, la cytométrie en flux a eu un impact significatif sur notre compréhension de la biologie cellulaire, en oncohématologie et en immunologie. Les cytomètres en flux modernes ont la capacité d'analyser plusieurs milliers de particules par seconde, les signaux générés sont liés à la taille, la complexité interne et la fluorescence de la cellule ou la particule. La cytométrie en flux a une large gamme d'applications dans plusieurs disciplines. Cependant en hématologie, elle est devenue un outil indispensable dans le diagnostic et le suivi des hémopathies malignes.

a) Principes

Ils comportent trois principaux systèmes, un système fluide pour la présentation des cellules au laser, un système optique pour le recueil des informations de la lumière diffusée et un système électronique/informatique pour la conversion des signaux optiques en signaux numériques (Figure 11).

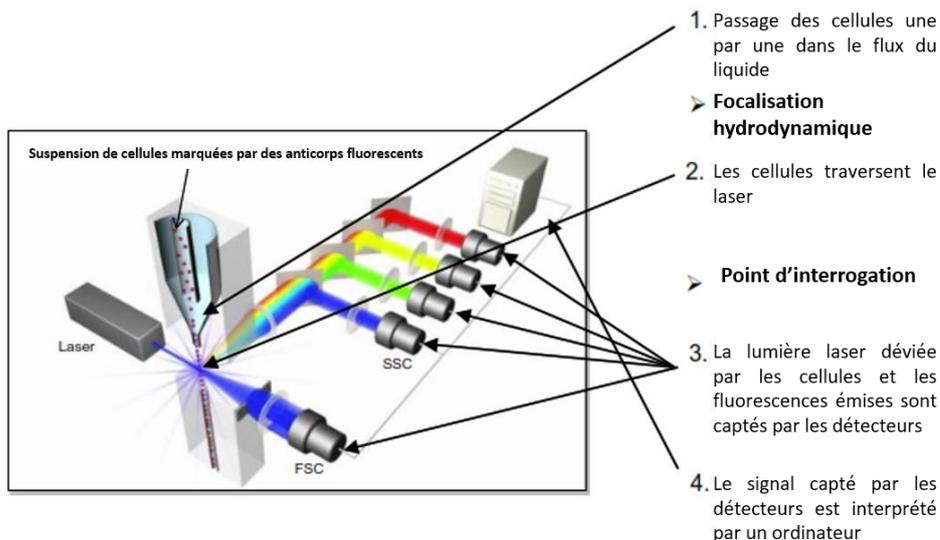


Figure 11: Principe de la cytométrie en flux
Attune® Acoustic Focusing Cytometer USER GUIDE

(1) Système fluide

L'objectif du système fluide est de présenter les cellules en suspension devant le laser au niveau du point d'interrogation, une derrière l'autre. Ceci est assuré par un mécanisme appelé « focalisation hydrodynamique » (Figure 12) basé sur l'injection de la suspension cellulaire au centre d'un flux mobile de liquide de gaine. La différence de pression, de vitesse et de densité entre les deux liquides empêche leur mélange.

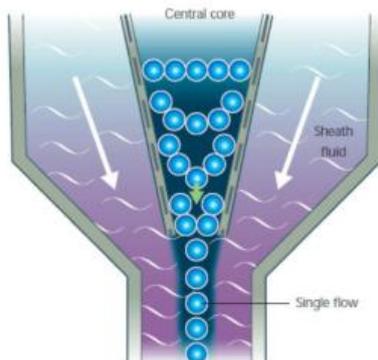


Figure 12: focalisation hydrodynamique
Attune® Acoustic Focusing Cytometer USER GUIDE

(2) Système optique

Il comprend l'excitation optique par le laser et la collection de la lumière à l'aide de lentilles, miroirs et filtres. Son objectif est de diriger la lumière vers des détecteurs optiques spécifiques.

- **La diffusion de la lumière** : lorsqu'une cellule traverse le point d'interrogation avec le faisceau laser, elle le disperse vers différents angles. La quantité de la lumière diffusée vers l'avant (à des angles étroits) est proportionnelle à la taille de la cellule, elle est appelée FSC (forward scatter channel). La quantité de la lumière, diffusée à grand-angle collectée à 90° du faisceau laser, est proportionnelle à la complexité de la structure intracellulaire, elle est appelée SSC (side scatter channel) (Figure 13). Ensemble, les signaux FSC et SSC fournissent des informations sur les propriétés physiques des cellules permettant la différenciation des cellules au sein d'une population hétérogène⁽³²⁹⁾.

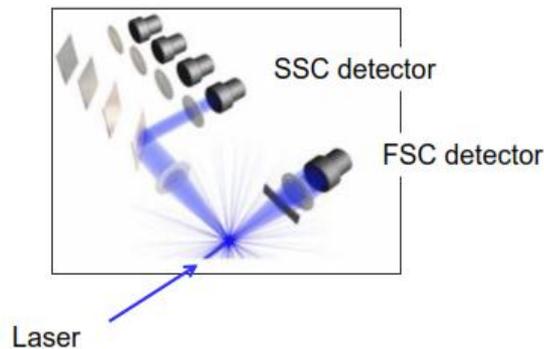


Figure 13: La diffusion de la lumière laser
Attune® Acoustic Focusing Cytometer USER GUIDE

- **La fluorescence** : les signaux FSC et SSC sont émis par déviation de la lumière sans changement de couleur, sur les deux canaux on récupère la lumière de la même longueur d'onde du laser⁽³³⁰⁾. Les fluorochromes, excités par la source laser, absorbent la lumière et émettent une lumière de longueur d'onde plus grande que celle du laser⁽³³¹⁾. Le marquage multiparamétrique permet le recueil de plusieurs informations sur la même cellule, dont on enregistre les signaux FSC et SSC et les fluorescences qui proviennent des anticorps monoclonaux dirigés contre les antigènes de surface ou intracytoplasmique. Le système optique du cytomètre doit assurer le recueil, triage et séparation de ces différents signaux lumineux, plus que le système optique d'un cytomètre est performant, plus qu'il peut traiter plusieurs signaux lumineux en même temps⁽³³²⁾. Communément, on parle d'un cytomètre à 8 couleurs lorsqu'il peut détecter 8 différentes fluorescences en même temps en plus des signaux FSC et SSC. Le triage de la lumière est effectué à l'aide d'un système de miroirs et de filtres⁽³³³⁾ qui va acheminer chaque catégorie de lumière vers un canal de détection spécifique.
- **Intensité de la fluorescence** : la fluorescence émise par une cellule peut être d'une intensité variable. Elle est en corrélation directe avec le nombre de déterminants antigéniques présent dans la cellule. L'intensité moyenne de la fluorescence (MFI) d'une population cellulaire donnée est un paramètre très important en pratique diagnostique courante.

- **Chevauchement spectral** : bien que le système de filtres et miroirs assure le triage de la lumière de chaque fluorochrome dans son canal de détection, le chevauchement spectral est inévitable, à cause des larges spectres d'émission des différents fluorochromes (Figure 14).

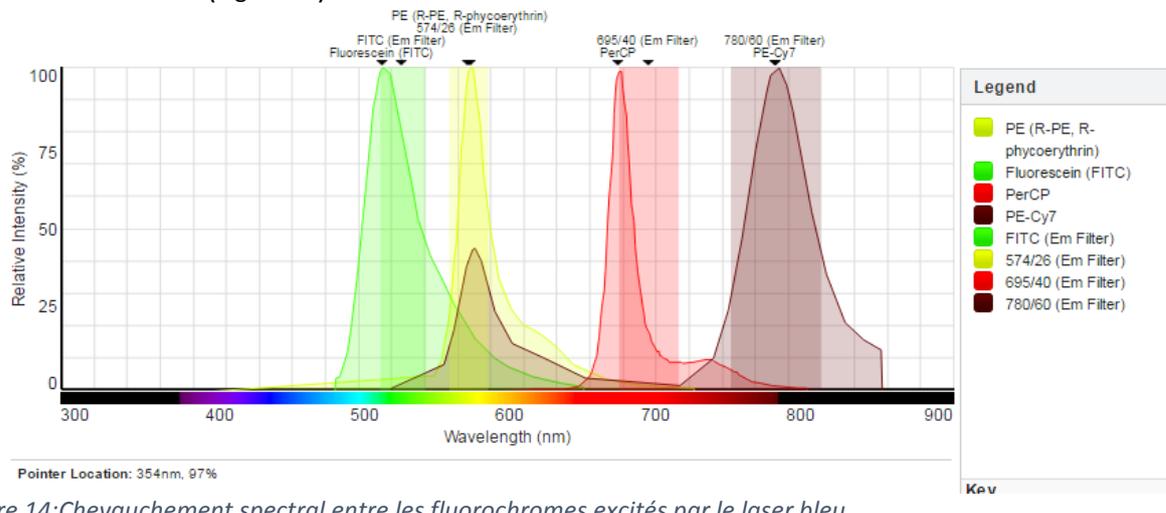


Figure 14: Chevauchement spectral entre les fluorochromes excités par le laser bleu

Les spectres d'émissions de quatre fluorochromes (FITC, PE, PerCp et PE-C7) avec les filtres des quatre canaux de récupération de leurs fluorescences sont représentés ci-dessus. On note qu'une partie de la lumière FITC passe dans le canal du PE et un petit pic d'émission du PE-C7 passe dans le canal du PE. Le filtre 574/26nm (jaune) permet de récupérer 53,7% de la fluorescence émise par le PE dans son propre canal, mais également 10,2% de la fluorescence FITC et 11,7% du PE-C7.

Réalisé par l'application « spectraviewer, Thermofisher™ »

La compensation est une étape de l'analyse qui a pour but de calculer le débordement de chaque fluorochrome dans les canaux des autres fluorochromes utilisés au même temps en marquage multiparamétrique, et ensuite à l'aide d'une formule mathématique, une correction de l'intensité de fluorescence est effectuée⁽³²⁸⁾.

(3) Système électronique

Le système électronique assure la conversion de la lumière collectée et triée par le système optique, en un signal électrique numérisé⁽³³⁴⁾. La lumière est récupérée par des photodétecteurs, qui peuvent être soit des photodiodes ou bien des photomultiplicateurs (PMT), ces derniers sont les plus utilisés. Les PMT transforment la lumière en une pulsation de voltage électrique caractérisée par trois paramètres en relation directe avec la quantité de la lumière reçue : la hauteur (H), la largeur (W) et l'aire sous la courbe (A) (Figure 15). Le paramètre le plus utilisé en analyse courante est l'aire sous la courbe, car il représente la combinaison de la hauteur et la largeur, par ailleurs la hauteur est également très utile dans certaines situations. Les PMT sont alimentés par un courant électrique d'un voltage variable, l'augmentation du voltage PMT implique l'augmentation de sa sensibilité à la lumière, la pulsation électrique sera donc plus grande en aire sous la courbe pour la même quantité de lumière reçue, si on augmente le voltage du PMT et vice versa⁽³³⁵⁾.

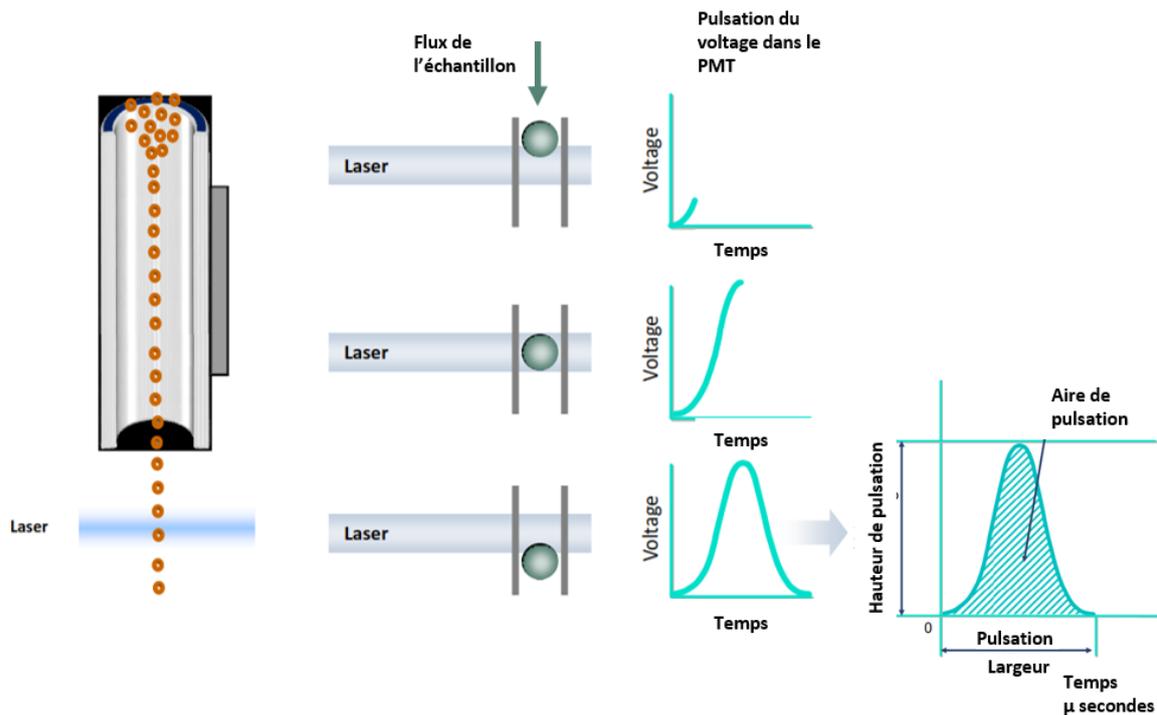


Figure 15: Transformation de la lumière en un signal électrique par les PMT
Attune® Acoustic Focusing Cytometer USER GUIDE

2. Technique PAIg par cytométrie en flux

La recherche des PAIg, par cytométrie en flux, est une technique rapide, très simple et moins coûteuse par rapport aux autres techniques. Elle offre également la possibilité d'analyse directe même dans le cas des thrombopénies sévères, une situation très fréquente dans le cas des PTI surtout en phase aiguë, mais elle nécessite un appareillage spécifique et un personnel qualifié.

En raison de sa facilité et rapidité, elle a fait l'objet de nombreuses publications et modifications, depuis les années 70 jusqu'à nos jours, elle consiste à l'utilisation d'un anticorps anti-immunoglobuline humaine fluorescente dirigé contre une suspension de plaquettes lavées du patient PTI pour le test direct. Pour le test indirect, le sérum du patient est incubé avec des plaquettes normales, et puis la révélation des PAIg sérique se fait par une antiglobuline humaine fluorescente^(316, 336, 337). L'Ac le plus fréquemment utilisé est le (Goat anti-human immunoglobulin), anti-IgG couplé à l'FITC, seul ou en association avec GAH IgM.

Bien que la majorité des PAIg sont d'isotype IgG seul ou en association avec IgM ou IgA^(316, 338, 339) les formes IgM seule et plus rarement IgA seule ont été rapportées. Rosenfeld et al⁽³⁴⁰⁾ ont démontré que sur 44 patients PTI, 16% étaient positifs à IgM uniquement, la sensibilité du test en utilisant l'IgG seul était de 75%, tandis qu'en associant la recherche d'IgM avec l'IgG la sensibilité atteint 90,9%.

L'association l'anti-IgG, l'anti-IgM et l'anti-IgA permet le dépistage des formes IgM ou IgA isolées. En outre il semble que chez les enfants le taux des PAIg de type IgM est plus élevé que l'IgG, néanmoins l'isotype de l'anticorps (IgG ou IgM) n'influence pas la présentation clinique de la pathologie⁽³³⁶⁾. L'utilisation des anticorps monoclonaux antiglobuline humaine, peut détecter seulement 60% des IgG présents à la surface des plaquettes, l'utilisation d'une antiIgG polyclonale, donne un signal plus puissant, par détection d'un nombre plus élevé des Ig de surface⁽³³⁹⁾, ceci s'explique par le fait que les anticorps monoclonaux reconnaissent un seul épitope sur la molécule IgG, cet épitope n'est pas toujours accessible pour l'Ac monoclonal. Les anticorps polyclonaux sont plus utiles et plus pratiques, car ils reconnaissent plusieurs épitopes sur l'immunoglobuline.

Les résultats de cette technique sont exprimés soit en intensité moyenne de fluorescence (MFI) de la population plaquettaire^(316, 336, 339, 341, 342), ou bien en pourcentage des plaquettes positives^(336, 338, 340, 343). Cependant on note une grande divergence des résultats obtenus par les différents auteurs, ceci est en rapport avec le nombre d'échantillons analysés, les anticorps utilisés, le mode de préparation de l'échantillon, la méthode d'analyse des résultats et de détermination du seuil de positivité appliquée et les critères diagnostiques utilisés par chaque auteur. Une bonne corrélation entre la sévérité du PTI, la diminution des plaquettes et l'intensité de la MFI obtenue, a été mise en évidence par plusieurs auteurs, par ailleurs la MFI du contrôle négatif augmente également lorsque le taux de plaquette diminue⁽³⁴²⁾. Bien que la recherche directe ou indirecte des PAIg par cytométrie en flux, soit une technique très sensible avec une excellente valeur prédictive négative qui peut atteindre 100%, elle reste très peu spécifique, en raison du taux élevé des PAIg retrouvés dans les thrombopénies non immunologiques, et même chez les sujets normaux. Cette mauvaise spécificité est inacceptable, et rend ce test inapproprié au diagnostic du PTI, à moins qu'il soit associé à d'autres techniques spécifiques comme la MAIPA ou l'ELISA^(4, 338, 342, 344), ou bien d'autres modifications et améliorations soient apportées pour le rendre plus spécifique.

3. FCIA (flow cytometric immunobead assay),

FCIA est un test développé récemment, il associe la rapidité, la reproductibilité, la précision et la sensibilité de la recherche des PAIg par cytométrie en flux, avec la spécificité de la MAIPA, par la possibilité d'identification des GP plaquettaires cibles des auto-anticorps.

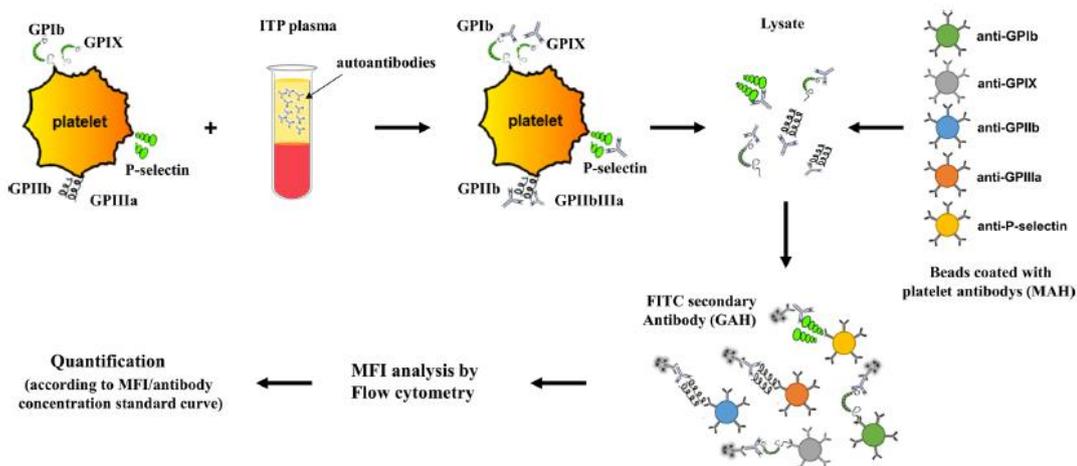


Figure 16: Principe de la FCIA (334)

Le principe de la FCIA est basé sur l'utilisation des microbilles en polystyrène sensibilisées par des Ac anti-GP plaquettaires. Les Ac fixés sur les microbilles sont l'anti-GP : IX (SZ1), Ib(SZ2), IIIa(SZ21), IIb(SZ22) et P-selectine (SZ51). Les billes, préparées et lavées, peuvent être conservées à +4 °C pendant plusieurs mois⁽³⁴⁵⁾. La recherche est effectuée soit sur les plaquettes du patient pour l'épreuve directe, ou bien en utilisant des plaquettes normales, sensibilisées par le sérum du patient, pour l'épreuve indirecte.

Les plaquettes lavées et sensibilisées par des anti-GP à leurs surfaces, sont solubilisées par le Triton X-100 ce qui permet de récupérer le lysat plaquettaire. Les billes marquées par les anti-GP sont incubées avec le lysat plaquettaire. Après le lavage, la révélation est faite par un FITC mouse anti-human IgG. L'intensité de la fluorescence MFI est mesurée et comparée à la population témoin.

Une modification de la technique FCIA, est apportée afin de permettre en plus de l'identification des GP cibles, une quantification des ces Ac. L'utilisation de microbilles possédant plusieurs niveaux de fluorescence (5 à 8) permet le traçage d'une courbe d'étalonnage (concentration IgG vs MFI)^(5, 346, 347).

La FCIA est une technique d'identification et quantification des auto-anticorps antiglycoprotéines plaquettaires. Bien que la majorité de ces anticorps sont dirigés contre la GPIbIX et la GPIIbIIIa, l'association de 5 anticorps différents anti-GP Ib, IX, IIb, IIIa et P-sélectine, augmente la spécificité du test (entre 75 et 81%). Néanmoins l'utilisation des deux anticorps anti CD41 et anti CD42, semble être suffisante aussi (se=73% sp=95%)⁽³⁴⁸⁾, par contre l'utilisation du CD41 seul, diminue la sensibilité du test jusqu'à 66%.

Tableau 6: principales caractéristiques des études de FCIA.

Auteur	Microbilles	Anticorps couplés aux billes	Anticorps de détection	Contrôle	Sensibilité	Spécificité
Zhai ⁽³⁴⁶⁾ 250 PTI	04 um 08 niveaux de fluorescence	GPIX, GPIb, GPIIb, GPIIIa, P-sélectine	FITC Goat anti-humain IgG	FITC goat anti-mouse IgG	73,13%	81,98%
He ⁽⁵⁾ 50 PTI	04 um 08 niveaux de fluorescence	GPIX, GPIb, GPIIb, GPIIIa, P-sélectine	FITC Goat anti-humain IgG	FITC goat anti-mouse IgG	96%	80,9%
Zhao ⁽³⁴⁷⁾ 71 PTI	04 um Plusieurs intensités	GPIX, GPIb, GPIIb, GPIIIa, P-sélectine	FITC Goat anti-humain IgG	FITC goat anti-mouse IgG	78,3%	75%
Liu ⁽³⁴⁸⁾ 123 PTI	15,3 um	GPIIbIIIa (CD41) GPIbIX (CD42)	Polyclonal PE Goatanti-humain IgG	-	73%	95%
Tomer ⁽³⁴⁵⁾ 62 PTI	20 um	GPIIbIIIa	FITC Goat anti-humain IgG	FITC goat anti-mouse IgG	66%	93%

PARTIE PRATIQUE

I. OBJECTIFS

A. Objectif principal

L'objectif principal est la mise au point et la validation de la technique de mise en évidence des auto-anticorps antiplaquettes, d'isotype IgG et/ou IgM, par cytométrie en flux,

B. Objectifs secondaires :

Ils concourent à :

- La quantification des PAIg, à l'aide d'une courbe d'étalonnage réalisée à base d'une série de billes recouvertes par des quantités connues, d'un anticorps couplé au FITC.
- Le suivi du titre d'anticorps chez les patients présentant un PTI.
- L'identification des GP plaquettaires ciblées par les auto-anticorps, réalisée en utilisant des billes de capture d'immunoglobuline de souris..

II. MATÉRIELS ET MÉTHODES :

A. Type de l'étude

Il s'agit d'une étude cas-témoins, où les cas sont les patients présentant un PTI répondant aux critères diagnostiques de l'ASH 2011. Les témoins sont répartis en deux groupes : un premier groupe, comporte les sujets normaux sains, donneurs de plaquettes par cytophérèse, le deuxième groupe sera celui des patients présentant une thrombopénie non PTI. La proportion cas/témoins est de 1/3 (pour chaque cas, deux témoins, un normal et un thrombopénique).

Une petite étude de suivi des patients a été réalisée en parallèle de l'étude principale. Il s'agit d'une surveillance du taux d'anticorps antiplaquettes.

B. Populations étudiées

1. Population des patients

Notre population étudiée est constituée de 102 patients présentant un purpura thrombopénique immunologique, qu'il soit nouvellement diagnostiqué, une forme chronique ou bien persistante, remplissant les critères diagnostiques fixés par l'ASH 2011⁽¹⁾.

Les patients inclus dans cette étude proviennent des structures hospitalières suivantes :

- Pour les adultes le recrutement s'est fait principalement au niveau des services d'hématologie de : l'hôpital militaire régional universitaire de Constantine HMRUC et le CHU Ben Badis Constantine.
- Pour les enfants, nous avons un seul lieu de recrutement : service de pédiatrie de l'HMRUC.

Le recrutement des patients s'est étalé sur la période de décembre 2018 à octobre 2021, soit une durée totale de 35 mois.

a) Critères d'inclusion

Il a été inclus dans cette étude, les patients des deux sexes, sans limites d'âge, remplissant les critères suivants :

- Patients présentant une thrombopénie < 100 G/L, isolée (taux de GB, GR et Hb normaux).
- La thrombopénie est confirmée sur un frottis sanguin.
- Patients répondant aux traitements de première intention (corticoïde et IVIg).
- Thrombopénie persistante (plus de 6mois) sans réponse au traitement et sans autre étiologie évidente.

- Patients sous traitement immunosuppresseur : corticoïdes, gammaglobulines ou anti-CD20, tant que le taux de plaquettes est inférieur à 100 G/L (La persistance de la thrombopénie signifie que le mécanisme de destruction immunologique est encore actif malgré le traitement immunosuppresseur).

b) Critères d'exclusion

Il a été exclu de cette étude tous patients présentant :

- Taux de plaquettes > 100 G/L, ou bien une thrombopénie associée à une anémie, leucopénie ou hyperleucocytose.
- Une pseudothrombopénie, par présence d'agrégats plaquettaires au frottis sanguin.
- Frottis sanguin révélant la présence d'une poïkilocytose (principalement les schizocytes), une myélemie ou toute autre anomalie morphologique leucocytaire.
- Patients sous traitement à base de Quinidine ou Héparine.
- Pathologies hépatiques, alcoolisme, splénomégalie, adénopathies, anomalies neurologiques et rénales.

2. Population des témoins

Cette population est constituée de 204 sujets indemnes du PTI, le but de cette population est d'établir les valeurs normales ; fixer le seuil de positivité du test et comparer ses résultats avec la population des patients. Les témoins sont divisés en deux groupes, le premier est constitué de 162 sujets sains indemnes de toute pathologie et sans antécédents, aptes pour le don du sang total ou bien d'aphérèse. Dans le deuxième groupe, on trouve 42 patients présentant une thrombopénie non immunologique dont le mécanisme majoritaire de destruction plaquettaire est connue non immunologique, cette sous population témoins a été rajoutée pour les raisons suivantes :

- Éliminer une éventuelle influence de la thrombopénie elle-même sur le résultat du test.
- S'assurer que l'augmentation de la MFI des patients PTI est spécifique à la présence d'anticorps antiplaquettes.

Cette étude a été menée afin d'optimiser un test utile pour le diagnostic de la thrombopénie immunologique. Donc il va être appliqué dans le cas d'une thrombopénie afin de confirmer ou éliminer une origine immunologique, dans ce cas il est plus pertinent de comparer nos patients à une population thrombopénique, pour mieux évaluer les performances de cette technique dans les conditions réelles.

C. Matériels

1. Cytomètre en flux Attune™ Nxt (life technologie)

C'est un cytomètre muni de deux lasers spatialement séparés (deux points d'interrogation de cellules).

- Un laser bleu 488 nm/50 mW, avec 04 canaux de détection de fluorescence BL1 (530/30), BL2 (574/26), BL3 (595/40), BL4 (780/60) et un canal SSC 488/10
- Un laser rouge, 637 nm/100 mW, avec trois canaux RL1 (670/14), RL2 (720/30) et RL3 (780/60).



Figure 17: Cytomètre Attune Nxt.
Attune® Acoustic Focusing Cytometer USER GUIDE

Le système fluide de l'Attune Nxt est un système de focalisation hydrodynamique, piloté par un système acoustique pour une meilleure précision ; en effet, les cellules restent dans un alignement serré même à des taux d'échantillonnage plus élevés, ce qui permet un passage plus rapide (grande vitesse d'acquisition) avec moins de variation de signal et une meilleure qualité des données.

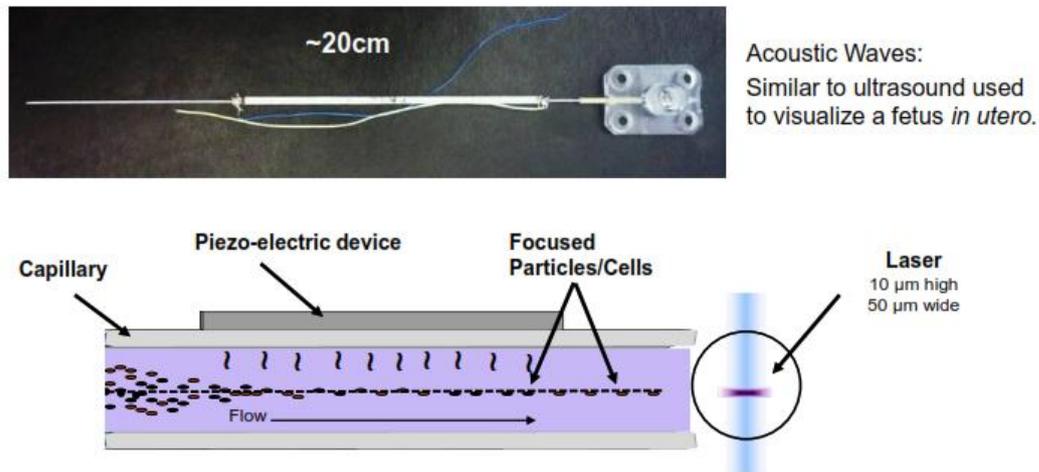


Figure 18: Système acoustique de l'Attune NxT
Attune® Acoustic Focusing Cytometer USER GUIDE

2. Analyseur d'hématologie Beckman Coulter DxH500

C'est un analyseur d'hématologie qui procure une numération plaquettaire précise et des résultats précis dès le premier passage. Le comptage des plaquettes se fait simultanément avec celui des globules rouges par impédance électrique.



Figure 19: Analyseurs d'hématologie Beckman Coulter DxH500

3. Autres matériels

- Centrifugeuses de paillasse : Thermo CR3i
- Une ultracentrifugeuse : Thermo GR2022, vitesse max 30.000 tr/min.
- Un microscope optique/fluorescence : Leica LM2000.
- Lames et lamelles.
- Bain-marie.
- Vortex.
- Micropipettes.
- Tubes EDTA.
- Tubes secs.
- Embouts jaunes et bleus à usage unique.
- Réfrigérateur/Congélateur.

4. Réactifs

Dans l'élaboration de notre étude, nous avons utilisé les réactifs suivants :

Tableau 7: liste des réactifs

Réactif	Marque	Référence
F(ab') ₂ -Goat anti-Human IgG, FITC 1ml	Invitrogen™	H10101C
F(ab') ₂ -Goat anti-Human IgM, FITC 1ml	Invitrogen™	H15101
CD 41a Monoclonal Antibody (HIP8), PE	e-bioscience™	12-0419-42
CD 42a Monoclonal Antibody (GRP-P) , PE	e-bioscience™	MA5-166998
CD 42b Monoclonal Antibody (HIP1), PE	e-bioscience™	12042942
CD 61 Monoclonal Antibody (VI-PL2), PE	e-bioscience™	12-0619-42
CD62p Monoclonal Antibody	Invitrogen™	37525
Blocker™ BSA (10X) in PBS	Thermo Scientific™	37525
BupH™ Phosphate buffered Saline Packs	Invitrogen™	28372
Attune focusing fluid 1x10 L	Invitrogen™	A24904
Attune wash solution	Invitrogen™	A24974
Attune shutdown solution.	Invitrogen™	A24975
AbC™ Anti-Mouse Bead Kit	Invitrogen™	A10344
Flow Cytometry Size Calibration Kit	Invitrogen™	F13838
Mouse anti-Human CD4 FITC	Invitrogen™	

D. Méthodes

1. Phase préanalytique

a) *Fiche de renseignement*

L'anamnèse médicale est réalisée selon une fiche mentionnant les informations d'identification du patients, l'historique, les signes cliniques, les enseignements cliniques et biologiques (voir annexe 1)

b) *Recueil et préparation d'échantillons*

5 à 10 ml du sang frais, prélevé sur 1 à 2 tubes contenant l'EDTA-K2, sont obtenus par ponction veineuse franche, méthode «**Vacutainer**». La préparation et l'analyse des plaquettes ont été effectuées dans les deux heures après le prélèvement. Une numération des plaquettes au préalable, est réalisée sur l'automate DxH500.

Après homogénéisation du prélèvement par retournements successifs, une centrifugation à faible vitesse 200 g/min (1100 tr/min) pendant 10 minutes, permettra l'obtention d'un plasma riche en plaquettes (PRP). Ensuite une forte centrifugation du PRP à une vitesse de 900 g/min (2300 tr/min) pendant 5 minutes permettra l'obtention d'un culot plaquettaire au fond du tube et un surnageant constitué de plasma pauvre en plaquettes (PPP). Le PPP est enlevé et conservé dans un autre tube à -20 °C, ou bien utilisé immédiatement pour la recherche des anticorps antiplaquettes solubles, tandis que le culot plaquettaire est lavé 5 fois par 4 ml de SAGM/EDTA préalablement chauffé à 37°C, afin d'obtenir un concentré de plaquettes lavées, pour la recherche immédiate des PAIg.

La solution du SAGM (saline adénine glucose mannitol), est une solution utilisée pour la conservation des PSL, elle a été récupérée à partir des poches du don de sang triple. La dissolution de l'EDTA en poudre dans la solution de SAGM est une opération laborieuse, elle nécessite certaines conditions de pH (acidité) et de température ce qui risque de modifier les caractéristiques de notre solution de lavage. Afin de préparer cette solution de lavage on a utilisé les tubes vacutainer EDTA-K2 comme source de l'EDTA, ces tubes ont été remplis par 4ml de solution de SAGM et ensuite incubés au bain marie à 37°C.

Quant aux témoins du groupe de sujets normaux, le concentré plaquettaire a été obtenu à partir des prélèvements sanguins sur un tube EDTA des donneurs du sang, et on a préparé le PPP et les plaquettes lavées de la même manière décrite ci-dessus.

Une numération plaquettaire, après la préparation du PPP, et des plaquettes lavées, est indispensable. Le taux des plaquettes lavées doit être ajusté par dilution au SAGM/EDTA à environ 10 G/l avant l'analyse, en revanche le taux des plaquettes résiduelles dans le PPP doit être < 0,1 G/l.

Les échantillons du sang veineux ont été recueillis sur des tubes EDTA-K2. L'EDTA est un anticoagulant complexant du calcium, mais également un inhibiteur des plaquettes. Il est très important de garder les plaquettes à l'état inactif durant toutes les étapes de préparation de l'échantillon, l'activation plaquettaire est responsable d'une fixation non spécifique des anticorps à la surface des plaquettes et par conséquent une fausse augmentation de la fluorescence obtenue, en outre, le changement morphologique des plaquettes avec l'émission des pseudopodes au cours de l'activation augmente la surface membranaire et par conséquent le taux de bruit de fond de fluorescence enregistré. Le citrate de sodium peut être également utilisé^(336, 349), mais il permet l'activation plaquettaire et diminue le rendement de récupération des plaquettes. Selon les recommandations publiées en 2012 par le sous-comité scientifique d'immunologie plaquettaire de l'ISTH (*International Society on Thrombosis and Haemostasis*)⁽³⁵⁰⁾, l'acide citrate dextrose solution-A (ACD-A), est l'anticoagulant de choix pour l'étude des anticorps plaquettaires car, il permet la conservation des plaquettes pendant plusieurs jours. L'analyse de nos échantillons a été effectuée dans un délai de 24 heures au maximum après le prélèvement, cependant selon Christopoulos et al⁽³³⁹⁾ la conservation du prélèvement EDTA plus de 24h, n'affecte pas le taux des PAIg chez les sujets normaux.

Les plaquettes, préparées par centrifugation, doivent être lavées plusieurs fois avant le marquage. Afin d'obtenir le moins de bruit de fond possible et le meilleur « stain index » (MFI Pos/MFI nég), cinq lavages successifs ont été effectués. La solution de lavage doit être additionnée par l'EDTA afin d'éviter l'activation plaquettaire ; cependant même en présence de l'EDTA les plaquettes peuvent s'activer en cas d'une agitation vigoureuse durant la préparation⁽³⁵¹⁾ ; l'utilisation du vortex est alors strictement proscrite, la remise en suspension durant les lavages doit se faire délicatement à l'aide d'une pipette. Au cours de la phase d'optimisation de cette technique dans notre laboratoire, on a préparé nos plaquettes par la solution de lavage communément utilisée (PBS/EDTA 1%), cependant on a remarqué une variation inquiétante des résultats à chaque changement du lot du PBS ou une nouvelle préparation de la solution. L'utilisation de la solution SAG-M qui est une solution de conservation des PSL, pour la préparation des plaquettes lavées après adition de l'EDTA, a apporté plus de stabilité et de reproductibilité des résultats.

2. Recherche des PAIg : (dépistage)

a) Méthode directe

100 ul du concentré de plaquettes lavées, est marqué par une quantité de 2ul du «F(ab')₂-Goat anti Human IgG FITC » dans un tube, et par 1,5 ul de « F(ab')₂-Goat anti Human IgM FITC » dans un autre tube, on ajoute 1ul d'anticorps antiglycoprotéine plaquettaire (CD42b APC ; CD42 b PE ; CD41a PE ou CD61 PE) dans les deux tubes. Après le temps d'incubation (15 à 20 min) à l'abri de la lumière et à une température ambiante ; on rajoute 0,5 ml du SAGM/EDTA dans chaque tube avant le passage au cytomètre (Figure 20).

Pour une partie de notre population (patients et témoins), nous avons effectué un marquage supplémentaire sur un autre tube, par le CD62p/PE associé à l'anti CD61/FITC.

b) Méthode indirecte

Incubation pendant 1 heure, de 1000ul de plasma pauvre en plaquettes de notre échantillon, avec 200ul du concentré plaquettaire lavé d'un témoin normal isogroupe ABO. Après 5 lavages par 4 ml du SAGM/EDTA à 37°C et une vitesse de 900 g/min pendant 5 minutes ; le marquage est effectué de la même manière décrite dans la méthode directe (antiglobuline IgG ou IgM + antiglycoprotéine plaquettaire) (Figure 20).

Les témoins de la méthode indirecte sont préparés par incubation de 200ul du même concentré des plaquettes témoin avec 1000ul du plasma d'un autre témoin normal isogroupe ABO.

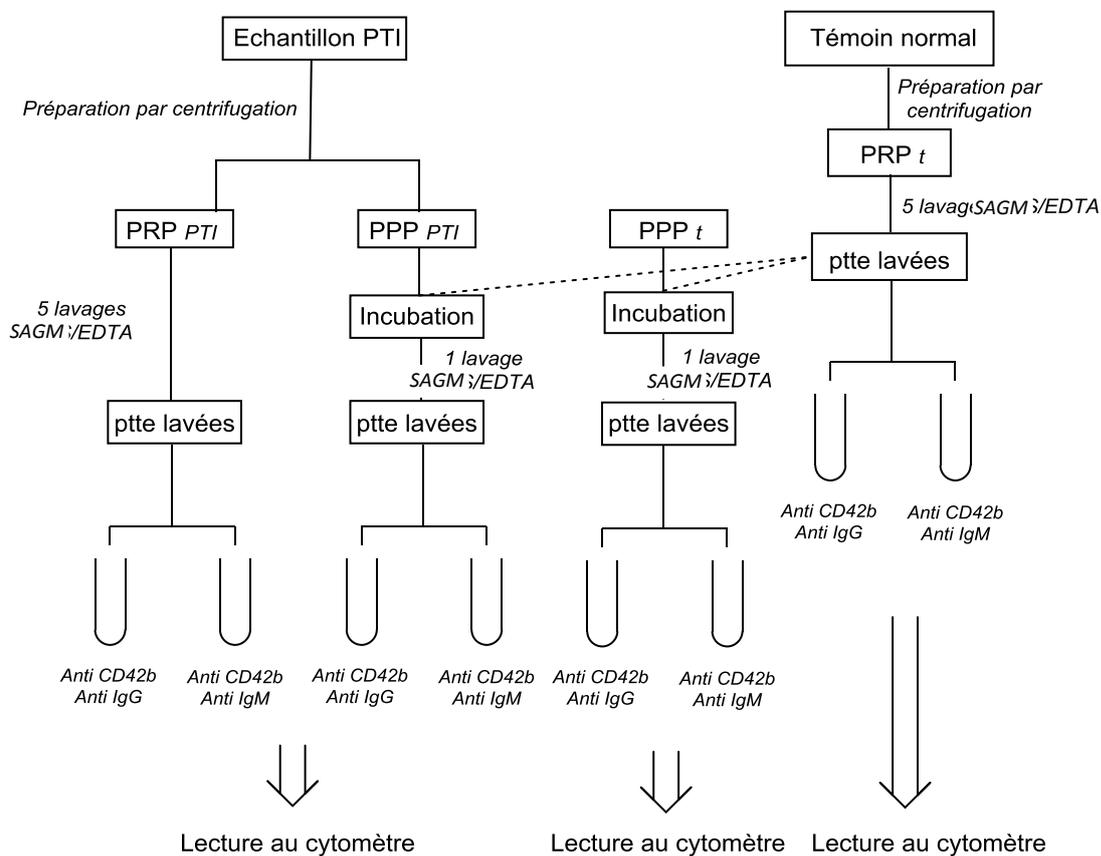


Figure 20: Procédure de préparation d'échantillons pour la recherche des PAIG.

PRP : plasma riche en plaquettes PPP : plasma pauvre en plaquettes Ptte: plaquette

c) **Suivi des patients PTI**

La recherche des PAIg par méthode directe a été effectuée pour l'ensemble de nos patients et témoins, en revanche la méthode indirecte a été appliquée pour seulement une partie de la population (43 patients et 52 témoins).

Par ailleurs un suivi du taux de PAIg d'isotype IgG et/ou IgM a été réalisé pour certains patients dont les conditions de surveillance étaient favorables. Il s'agit de 12 patients dont le dépistage a été répété au moins deux fois jusqu'à 8 fois dans des conditions cliniques et thérapeutiques différentes :

- **Phase aigüe/rémission/rechute** : pour les nouveaux patients PTI qui arrivent en phase aigüe, un dépistage de PAIg a été réalisé dans la phase thrombopénique. Après la mise sous traitement de première ligne on obtient une normalisation du taux de plaquettes, à ce moment un deuxième dépistage de PAIg a été effectué et un autre dans le cas d'une rechute avec baisse du taux de plaquettes.
- **Thrombopénie sévère/thrombopénie modérée** : essentiellement dans les formes chroniques et persistantes du PTI, on enregistre un taux de plaquettes très variable avec des moments de thrombopénies sévères et d'autres de thrombopénies modérées. Le dépistage des PAIg a été appliqué dans ces différentes situations et puis les résultats ont été comparés.
- **Début du traitement/arrêt du traitement/changement du traitement** : Afin d'évaluer la réponse des patients aux différents traitements, un dépistage de PAIg a été effectué avant/après l'instauration du traitement et après son arrêt. En cas du changement du traitement un autre dépistage est réalisé et les résultats ont été comparés par la suite.

3. **Quantification des PAIg**

La quantification des PAIg, est possible après traçage d'une courbe d'étalonnage, cette dernière a été réalisée en fixant des quantités connues d'un mouse IgG FITC sur un nombre connu de billes de latex « AbC™ Anti-Mouse Bead, Invitrogen™ », et puis en mesurant la MFI de chaque proportion.

Mode opératoire :

- Détermination de la concentration des billes par méthode volumétrique sur le cytomètre Attune NXT™ : ajouter 50 ul de billes de capture à 1 ml de tampon PBS et passage au cytomètre ensuite placer les billes dans l'histogramme FSC/SSC et vérifier la stabilité du débit sur l'histogramme count/time, en fin calculer la concentration des billes en prenant en considération le facteur de dilution (x21) (Figure 21).

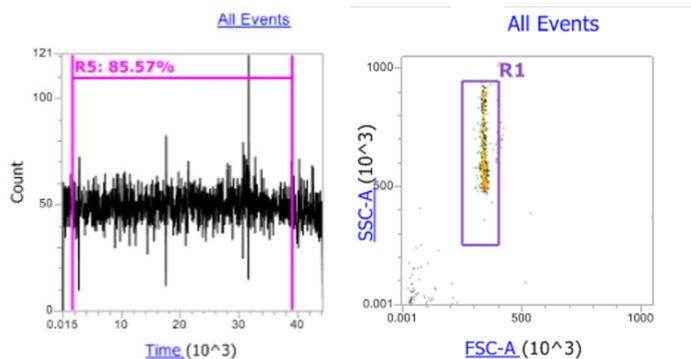


Figure 21: Concentration des billes de capture

Sélections des billes de capture sur l'histogramme FSC-A/SSC-A et vérification de la stabilité du débit dans le temps

- Réalisation des dilutions de l'anticorps par le PBS comme suit : 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/256, 1/512.
- Incubation de 5ul de chaque dilution avec 25 ul de billes de capture de l'immunoglobuline pendant 20 min à l'abri de la lumière.
- Ajout de 1000 ul de PBS dans chaque tube et passage au cytomètre.
- Calcul de la quantité moyenne d'anticorps par bille, et détermination de la MFI correspondante.
- Traçage de la courbe d'étalonnage.

4. Identification des auto-Ac antiplaquettes (FCIA)

La FCIA (flow cytometric immuno-beads assay) a été réalisée par

- Méthode directe : en utilisant des plaquettes lavées du patient.
- Méthode indirecte : en utilisant des plaquettes normales lavées, préalablement incubées avec le sérum du patient.

Elle s'est déroulée selon les étapes suivantes :

La première étape consiste à incuber 100 ul du concentré de plaquettes lavées avec 2ul des anticorps d'origine de souris, dirigés contre les GP plaquettaires : anti CD41a (GP IIb), anti CD42a (GP IX), anti CD42b (GP Ib), et anti CD61 (GP IIIa). Après 30 min d'incubation à l'abri de la lumière, on effectue un lavage avec 4 ml de PBS/EDTA pour éliminer les anticorps non fixés (Figure 22).

La deuxième étape consiste à la solubilisation de 100 ul des plaquettes préparées à l'issue de la première étape, par 100 ul de Triton 1%. Le surnageant est ensuite récupéré après une ultracentrifugation à une vitesse de 8500 tr/min pendant 20 min (Figure 22).

Dans la troisième étape, 25 μ l de billes de capture et 2 μ l de l'anti-IgG FITC, tous sont incubés avec 100 μ l du surnageant pendant 15 min à l'abri de la lumière, enfin on rajoute 0,8 ml de PBS et on mesure la MFI obtenue dans les canaux FITC et PE (Figure 22).

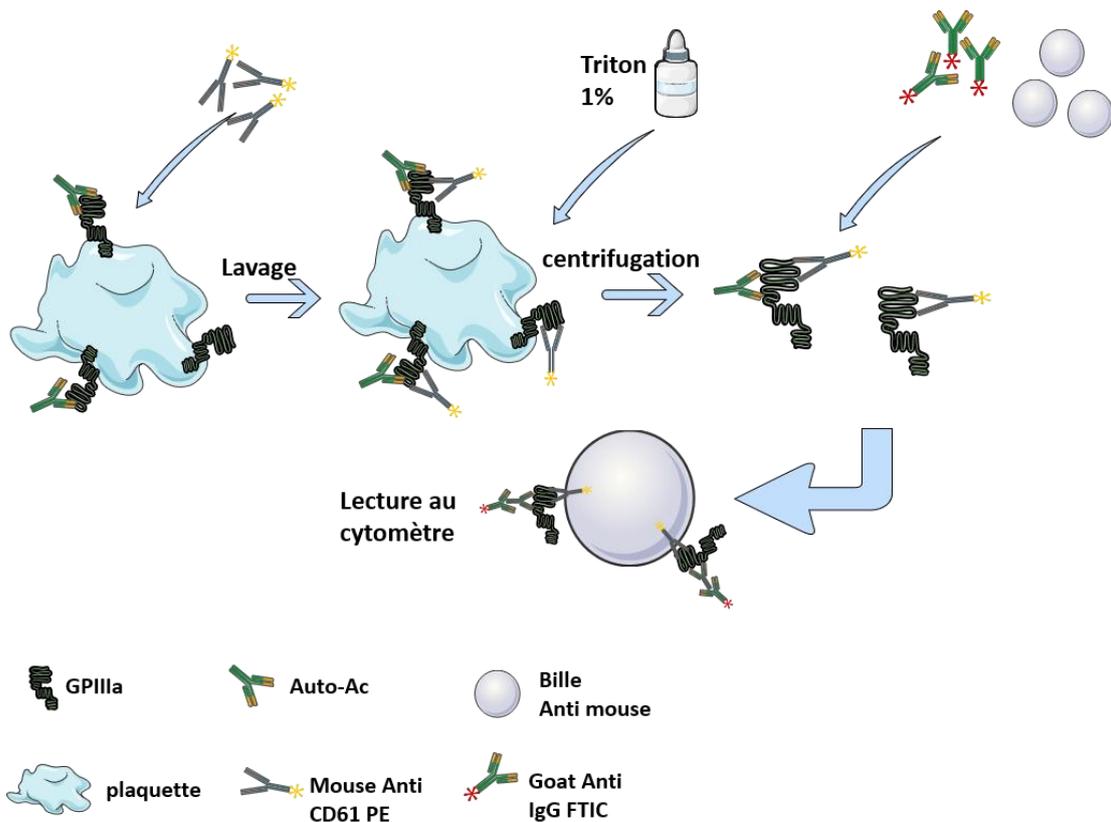


Figure 22: Technique FCI

Des parties de la figure ont été dessinées en utilisant des images de « Servier Medical Art ». Servier Medical Art par Servier est autorisé en vertu d'une licence Creative Commons Attribution 3.0 Unported (<https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

5. Mesure de la taille cellulaire

La détermination de la taille des particules en « μ m » par cytométrie en flux, est possible après conversion de l'intensité du signal FCS. En effet, la lumière du laser diffusée vers l'avant est proportionnelle à la taille de la cellule qui le traverse. L'utilisation du kit « Flow Cytometry Size Calibration Kit » composé de six billes de latex de différentes tailles : 1 μ m, 2 μ m, 4 μ m, 6 μ m, 10 μ m et 15 μ m dans les mêmes conditions et réglages (voltage PMT) utilisés pour l'acquisition de la population d'intérêt, permet de tracer une courbe d'étalonnage et de déterminer la taille de la population plaquettaire par extrapolation.

6. Analyse cytométrique

Les données ont été obtenues par le cytomètre Attune sur le logiciel Attune™NxT Software, ensuite elles ont été analysées par le logiciel Kaluza™ Analysis Software2.1 (Beckman Coulter).

a) Acquisition des données

Pour l'acquisition des plaquettes, nous avons utilisé les paramètres suivants :

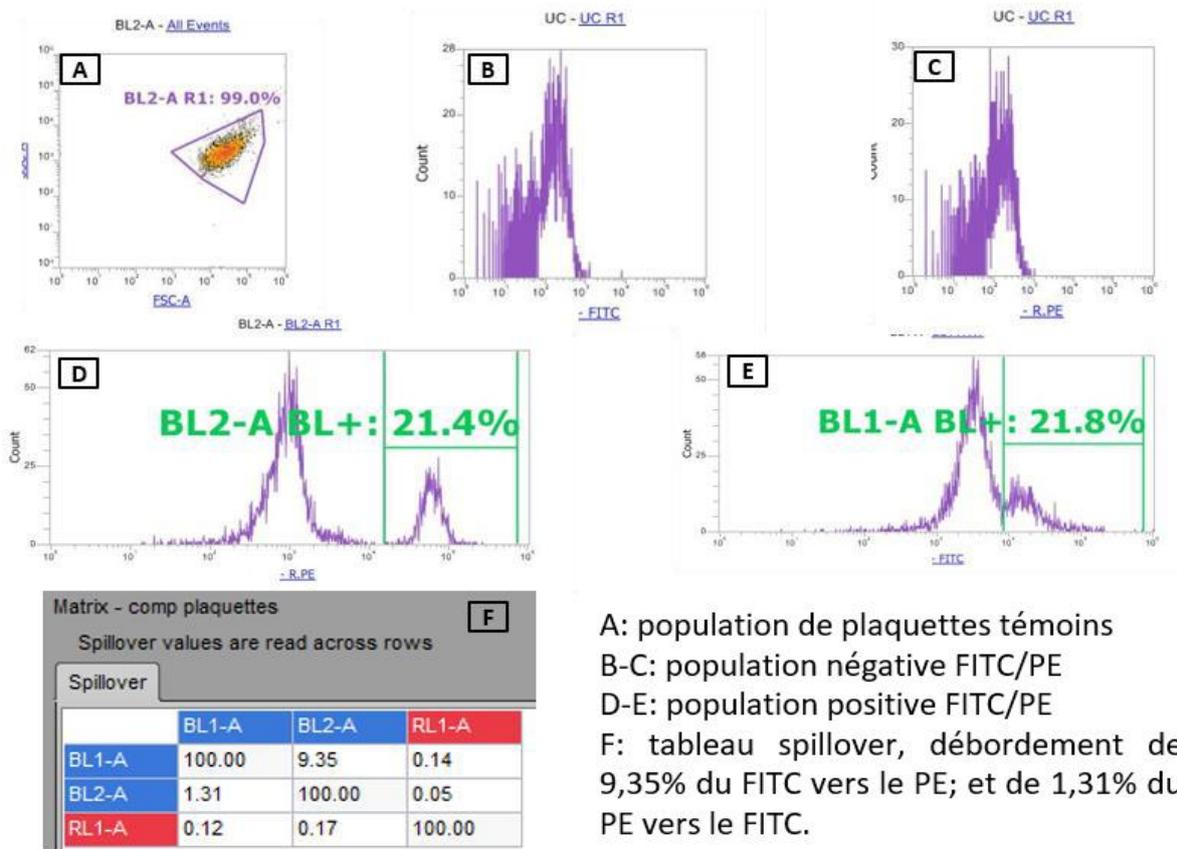
- Voltage FSC=260, SSC=330 en utilisant une échelle logarithmique avec un seuil (treshold) FSC très faible à 5.
- Une vitesse d'acquisition 100ul/minutes
- Nombre de plaquettes analysées dans le « gate » final est de 5000 à 7000.

b) La compensation

Toutes nos expériences ont été réalisées avec un marquage à deux couleurs FITC/PE ou bien FITC/APC. Les chevauchements des spectres d'émission des divers fluorochromes utilisés en cytométrie nécessitent l'emploi de compensations électroniques de fluorescences afin de soustraire la superposition des deux signaux de fluorescences (Figure 23).

Mode opératoire : Préparation de plaquettes témoins lavées selon le protocole décrit dans la partie II.D.1.b, et puis on prépare 4 tubes :

- Dans le 1^{er} tube UC (unstained contrôle), on met 100ul des plaquettes lavées non marquées.
- Dans le 2^{ème} tube : on met 100ul des plaquettes lavées témoins avec 2ul d'AC anti CD61 FITC.
- Dans le 3^{ème} tube : on met 100ul de plaquettes lavées témoins avec 2ul d'AC anti CD41a PE.
- Dans le 4^{ème} tube : on met 100ul de plaquettes lavées témoins avec 2ul d'AC anti CD42b APC
- Incubation des tubes n°2, 3 et 4, pendant 20 min à l'abri de la lumière.
- Réaliser 2 lavages successifs par PBS/EDTA pour éliminer l'excès d'anticorps non fixés, ensuite éliminer le surnagent complètement.
- Rajouter dans les tubes n°2, 3 et 4, 50ul des plaquettes témoins lavées (afin d'obtenir une population négative).
- Rajouter 500 ul de PBS/EDTA et passage des 4 tubes dans le cytomètre.
- Dans le logiciel du cytomètre choisir le menu de compensation.
- Passer le premier tube pour régler les voltages BL1(FITC) et BL2 (PE) afin de fixer les MFI des populations négatives au-dessous de 10^3 .
- Passer les tubes n°2,3 et 4 et enregistrer la MFI des plaquettes positives dans le canal BL1, BL2 et RL1 respectivement.
- Vérifier le tableau SPILOVER de la compensation.



A: population de plaquettes témoins
 B-C: population négative FITC/PE
 D-E: population positive FITC/PE
 F: tableau spillover, débordement de 9,35% du FITC vers le PE; et de 1,31% du PE vers le FITC.

Figure 23: Compensation plaquettaire BL1/BL2, sur l'Attune™ NxT

c) Stratégie de gating des plaquettes et mesure de la fluorescence IgG/IgM

- D'abord sur un cytogramme biparamétrique Log FSC/SSC on visualise les évènements totaux au moment de l'acquisition.
- Sur un deuxième histogramme biparamétrique (CD41, CD61 ou CD42b)/SSC, on identifie et on sélectionne les plaquettes, après élimination des débris, des GR et des GB résiduels.
- Sur un histogramme FSC-A/FSC-H, on élimine les doublets.
- Ensuite la population des plaquettes est analysée sur un autre histogramme FSC/SSC afin de vérifier la taille et on enregistre la MI-FSC.
- Enfin, on mesure l'intensité de fluorescence moyenne (MFI) obtenue dans le canal IgG-FITC ou IgM-FITC des plaquettes sur un histogramme monoparamétrique. Les paramètres enregistrés sont : Nombre, MFI et CV (Figure 24).

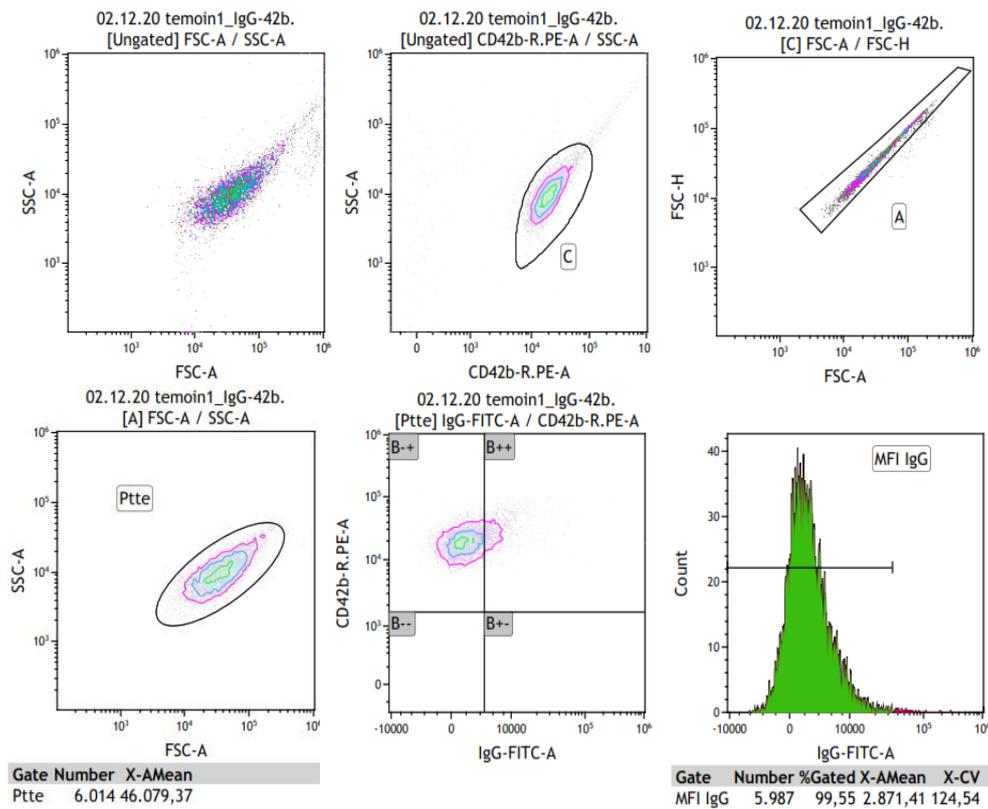


Figure 24: Stratégie de gating

7. Analyse statistique

a) Taille de l'échantillon

Le calcul du nombre d'échantillon, prend en considération la prévalence de la pathologie dans la population d'étude, il est déterminé par la formule suivante⁽³⁵²⁾

$$N = \frac{t^2 \cdot p \cdot (1 - p)}{e^2}$$

N : taille attendue de l'échantillon.

t : niveau de confiance déduit du taux de confiance (traditionnellement 1,96 pour un taux de confiance de 95%)

p : prévalence de la pathologie étudiée, pour le PTI la prévalence est estimée à 50 cas/ 10^5 , soit $p = 0,0005$ ⁽³⁵³⁾

e : marge d'erreur, ou bien le degré de précision (habituellement fixé à 1%).

Pour un niveau de confiance à 1,96 (risque $\alpha=5\%$), et une marge d'erreur à 1%, le nombre minimal d'échantillons requis, est de $N= 19$, ce qui représente un nombre relativement diminué par rapport à ce qui a été rapporté dans la littérature. Afin d'améliorer la précision de notre étude d'une part, et pour que nos variables suivent une loi normale d'autre part, on a augmenté la taille de notre échantillon à 102 patients PTI, donc la marge d'erreur est à 0,4 (moins de 1%), ce qui représente une très bonne précision.

b) Statistiques descriptives

Les différents résultats ont été saisis sur le logiciel Microsoft Excel19 puis transférés et analysés par le logiciel IBM SPSS V.22.

Des effectifs et des pourcentages ont été calculés pour les variables qualitatives.

Les moyennes, écarts types et intervalles de confiances ont été calculés pour les variables quantitatives.

c) Performances du test diagnostique

Les performances d'un test biologique dans le diagnostic d'une pathologie donnée sont divisées en performances intrinsèques qui représentent les propriétés intrinsèques du test lui même, et les performances extrinsèques qui sont les caractéristiques et les résultats obtenues lorsque le test est appliqué en pratique courante dans le diagnostic de la pathologie étudiée. Une mauvaise performance intrinsèque implique forcément une mauvaise performance extrinsèque mais l'inverse n'est pas valide. Un test avec une excellente performance intrinsèque peut avoir une mauvaise performance extrinsèque selon les conditions de son application, il est indispensable donc d'étudier les différents paramètres statistiques permettant l'évaluation du test et la compréhension de ses conditions d'application et ses limites :

- Performances intrinsèques : la performance intrinsèque est évaluée par deux paramètres, la sensibilité (probabilité que le test soit positif si la pathologie est présente) et la spécificité (probabilité que le test soit négatif si la pathologie est absente). Ces deux paramètres sont calculés après le choix d'une valeur seuil et l'interprétation du test, les deux populations (patients et témoins) sont réparties sur un tableau de contingence en quatre catégories (vrai positif, vrai négatif, faux positif et faux négatif), la sensibilité est la proportion des vrais positifs dans la population des patients et la spécificité est la proportion des vrais négatifs dans la population des témoins. Ces deux paramètres sont influencés par la valeur seuil choisi et varient en sens inverse, le choix de la valeur seuil doit assurer le meilleur compromis entre sensibilité et spécificité. Si la distribution des données de la population témoins suit une loi normale, la valeur (moyenne+2DS) représente un seuil au dessous duquel on trouve 97,7%⁽³⁵⁴⁾ de la

population tandis que la valeur (moyenne+3SD) est un seuil pour 99,8%, ces deux taux sont en réalité la spécificité du test en choisissant ces valeurs seuils, la sensibilité reste à calculer, mais à la valeur de moyenne+2SD on obtient une sensibilité meilleur que celle du moyenne+3SD. La courbe ROC (receiver operating characteristic) est plus difficile à réaliser surtout dans les cas des pathologies à très faible prévalence, mais elle offre la possibilité de choisir la valeur seuil qui donne le meilleur compromis sensibilité et spécificité. Dans notre étude on a toutes les données nécessaires pour établir la courbe ROC et la comparer aux résultats de la moyenne+2SD de la population témoin⁽³⁵⁵⁾.

- Performances extrinsèques : une bonne sensibilité et spécificité ne sont pas suffisante pour l'évaluation des performances diagnostiques d'un test biologique. Ces deux paramètres représentent les caractéristiques intrinsèques propres du test, mais les résultats attendus lorsqu'il est appliqué sur le terrain sont variables selon les conditions d'application, donc avoir un bon test diagnostique avec des excellentes performances intrinsèques et l'appliquer dans des mauvaises conditions donne des mauvais résultats. Les paramètres extrinsèques, en particulier les valeurs prédictives vont répondre directement aux questions des cliniciens « quelle est la probabilité que le patient soit réellement malade si le test est positif » ce paramètre est la valeur prédictive positive (VPP), et « quelle est la probabilité que le patient soit indemne si le test est négatif » ce paramètre est la valeur prédictive négative (VPN). Cependant ces deux paramètres sont influencés par la prévalence de la pathologie, dans le cas d'une épidémie par exemple avec une prévalence très élevée, la VPP augmente considérablement mais avec très peu de gain diagnostique, tandis que la VPN diminue considérablement et inversement. Donc afin de mieux évaluer les performances extrinsèques d'un test diagnostique on calcul un paramètre non influencé par la prévalence de la pathologie, qui mesure le gain diagnostique apporté par le test (différence entre la probabilité pré-test et post-test), ce paramètre est le rapport de vraisemblance (LR=Likelihood Ratio). Le LR+ est le gain apporté dans le diagnostic positif de la pathologie si le test est positif, le LR- est le gain apporté dans l'élimination du diagnostic de la pathologie si le test est négatif. En fin le traçage des nomogrammes de Fagan va permettre une représentation globale des performances du test (sensibilité, spécificité, VPP, VPN LR+ et LR-)^(356, 357).

Cette évaluation (intrinsèque et extrinsèque) a été appliquée pour l'IgG seul, IgM seul, et la combinaison IgG + IgM.

d) Comparaison des variables

Il est très important de confirmer la différence de moyennes attendue, entre les MFI des patients et celles des témoins. Pour cela on a utilisé un test d'hypothèses, notre hypothèse nulle « H_0 » est : H_0 = les valeurs de MFI des deux séries (patients/témoins) ne sont pas différentes. Contre l'hypothèse alternative H_1 = les deux séries de valeurs sont différentes. Le seuil de risque α , pour le rejet de l'hypothèse nulle, est fixé à 0,05 (5%).

Le test le plus adapté à notre cas, est le test paramétrique « t » de Student, pour comparaison des moyennes sur deux séries non appariées. Cependant avant l'application de ce test il faut d'abord vérifier que toutes les conditions sont réunies dont :

- Vérification de la normalité des données : lorsque la taille de l'échantillon est suffisamment grande $n > 30$, on peut ignorer le test de normalité sans problème majeur, En revanche, pour être rigoureux, la normalité a été vérifiée d'une part, par l'inspection visuelle des histogrammes Q-Q plot et des courbes de Gausse, d'autre part par l'application d'un test de normalité (Kolmogorov-Smirnov ou bien Shapiro-Wilk).
- Vérification de l'égalité des variances : l'égalité des variances sur IBM SPSS, est effectuée en appliquant le test de Levene, ensuite la P valeur est calculée différemment selon l'égalité des variances ou non.

Dans le cas où la distribution des données, ne suit pas une loi normale (P valeur du Shapiro-wilk $< 0,05$), le test paramétrique de Student, ne peut être appliqué, et on utilise le test non paramétrique de Wilcoxon.

Le test de Khi deux est appliqué pour la comparaison des variables qualitatives binomiales. Le seuil de signification a été fixé à 0,05 (5%) pour conclure une différence significative entre les variables comparées.

III. RÉSULTATS

A. Description des populations étudiées

Les différents tests décrits ci-dessus ont été appliqués sur 204 échantillons, dont 102 provenant des patients atteints de thrombopénie immunologique diagnostiquée par exclusion (considérée comme gold standard) selon les critères ASH 2011⁽²⁹⁸⁾ et les mises à jour de 2018⁽²⁹⁹⁾ et 2019⁽¹³⁾; 162 échantillons des témoins sains et 42 témoins thrombopéniques. La proportion de nos patients est de 1/3 soit 33% de la population générale.

B. Description de la population des patients

1. Répartition des patients selon l'âge et le sexe

Tableau 8: statistiques descriptives de l'âge des patients

	Effectif	Minimum	Maximum	Moyenne	Écart type	IC 95%
Âge	102	1 mois	80 ans	30,1	20,7	26 34,2

La moyenne d'âge de nos patients était de 30,1 ans, avec des extrémités allons de 1mois jusqu'à 80 ans.

Tableau 9: Répartition des patients selon la catégorie d'âge

	Nombre	Pourcentage %
Nourrisson ≤1an	5	4,9%
Enfant 1 à 15 ans	25	24,5%
Adulte 16 à 50 ans	49	48,0%
Adulte âgé > 50 ans	23	22,5%

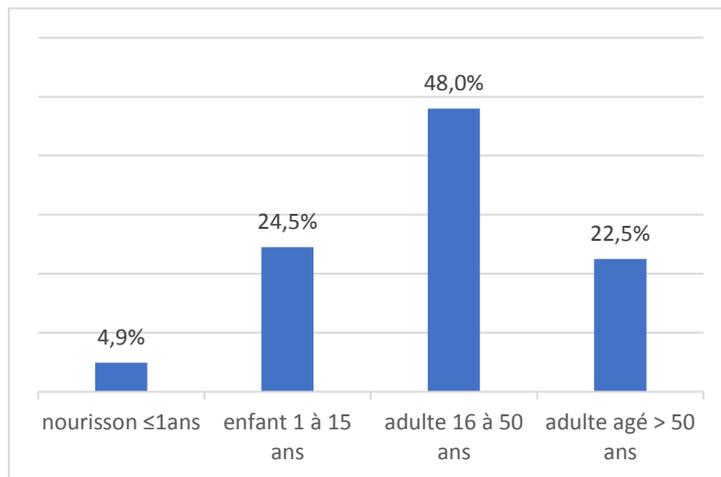


Figure 25: Répartition des patients en catégories d'âges

La catégorie d'âge prédominante est celle de l'âge adulte entre 16 et 50 ans qui représente près de la moitié de notre population (48%), les nourrissons et les nouveau-nés représentent 4,9% de notre population.

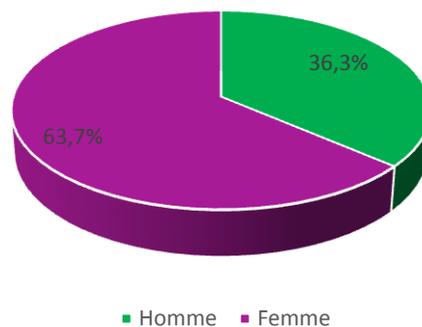


Figure 26: répartition des patients selon le sexe

On note une prédominance féminine avec 65 patientes de sexe féminin (63,7%) contre 37 patients de sexe masculin (36,3%), soit un sexe-ratio femme/homme= 1,75

2. Données cliniques et thérapeutiques des patients

a) Répartition des patients selon le type du PTI

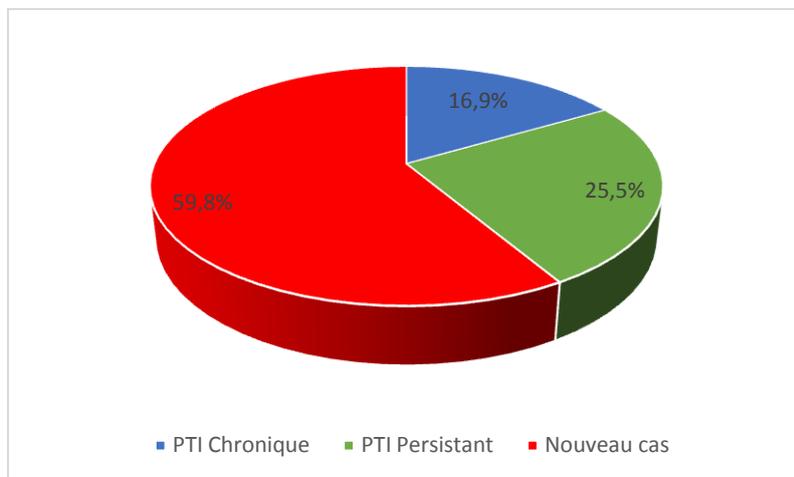


Figure 27: Répartition des patients, nouveaux/anciens cas

61 patients présentaient un PTI nouvellement diagnostiqué à moins de 3 mois, soit un pourcentage de 59,8% ; 26 patients (25,5%) présentaient un PTI persistant de 3 à 12 mois et 15 patients avaient un PTI chronique de plus de 12 mois⁽¹³⁾.

b) Répartition des patient selon l'expression hémorragique

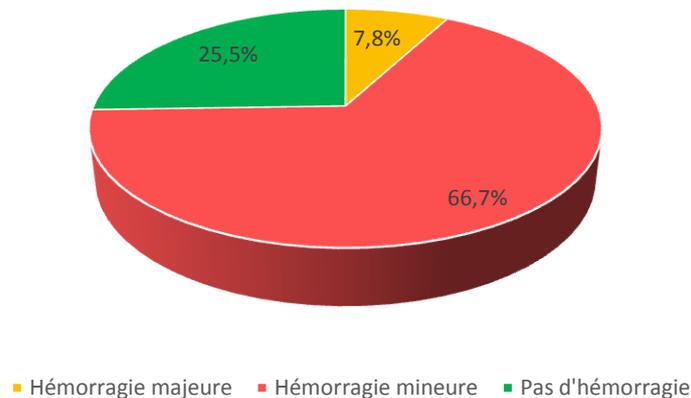


Figure 28: Présence de syndrome hémorragique dans la population des patients

76 patients (74,5%) présentaient un syndrome hémorragique dans la période où le dépistage a été effectué. Dont 8 patients (7,8%) présentaient un syndrome hémorragique majeure, grade 3 ou 4 par le score OMS⁽³⁵⁸⁾ ou bien grade 2 par le score IBLS (*ITP Bleeding Scale*)⁽³⁵⁹⁾ ; 68 patients (66,7%) avaient un syndrome hémorragique mineure (grade 1 ou 2 OMS ou bien grade 1 IBLS).

26 patients (25,5%) n'avaient pas d'hémorragies au moment de l'analyse.

c) Répartition des patients selon la stratégie thérapeutique

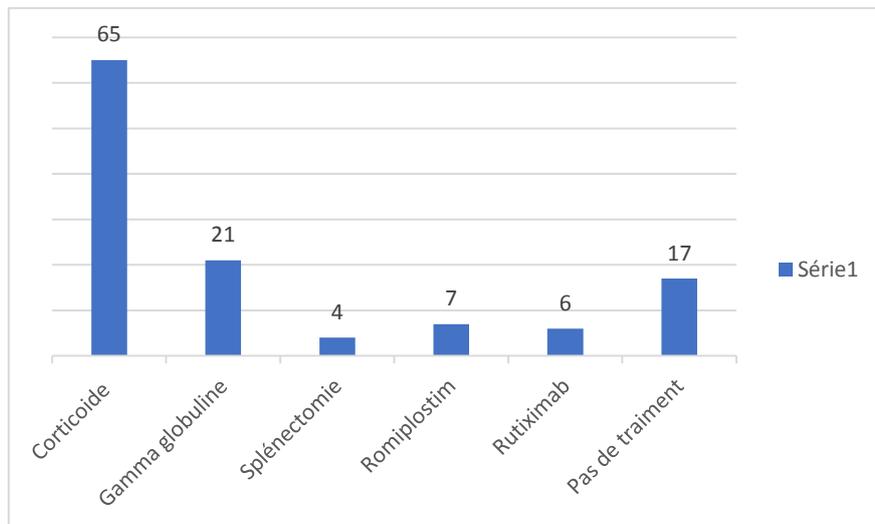


Figure 29: Traitements de la population des patients

65 patients (63,7%) ont été mis sous traitement à base de corticoïdes (prednisone ou dexaméthasone). 21 patients (20,5%) tous des enfants de moins de 15 ans ont été mis sous gamma globuline. En outre nous avons dans notre série 17 patients (14,1%) qui ont été mis sous surveillance seulement.

d) Répartition des patients selon la réponse aux traitements

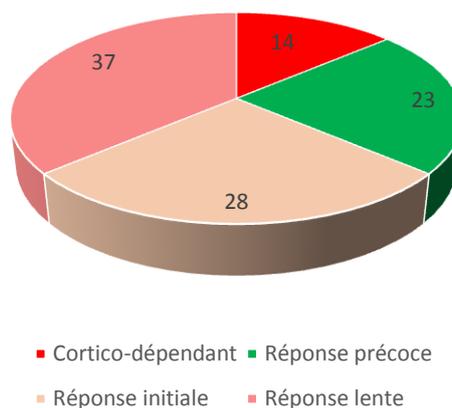


Figure 30: La réponse des patients aux traitements

- Une réponse précoce au traitement a été observée chez 23 patients (22,5%) Taux de plaquette ≥ 30 G/L et dédoublement de taux de plaquettes de base en une semaine au moins
- Une réponse initiale au traitement a été observée chez 28 patients (27,4%) Taux de plaquette ≥ 30 G/L et dédoublement de taux de plaquettes de base en un mois au moins.

- Une réponse tardive au traitement a été observée chez 37 patients (36,2%) *Taux de plaquette ≥ 30 G/L et dédoublement de taux de plaquettes de base en 6 mois au moins.*
- Une cortico-dépendance a été observée chez 14 patients (13,7%) *besoins continus de prednisonne (ou équivalents) ou bien des traitements fréquents afin de maintenir le taux de plaquettes ≥ 30 G/L et/ou pour éviter les saignements⁽¹³⁾.*

3. Données biologiques des patients

Tableau 10: Taux de plaquettes, VPM et Hb des patients

	Effectif	Minimum	Maximum	Moyenne	Écart type	IC 95%	
Plaquettes (G/L)	102	3	93	31,36	25,37	27,9	40,3
VPM (fL)	102	5	13,7	10,17	1,69	9,75	10,8
Hb (g/dl)	102	6,1	14,7	11,4	2,08	10,7	11,7

Le taux moyen des plaquettes était 31,36 G/L IC95% [27,9-40,3], avec une moyenne du volume plaquettaire moyen à 10,17 fL IC95% [9,75-10,8].

La moyenne du taux d'hémoglobine était 11,4 g/dl IC95% [10,7–11,7].

On note également qu'un médullogramme a été réalisé pour 18 patients, il a révélé une richesse normale en mégacaryocytes dans 12 cas et une forte richesse dans 6 cas.

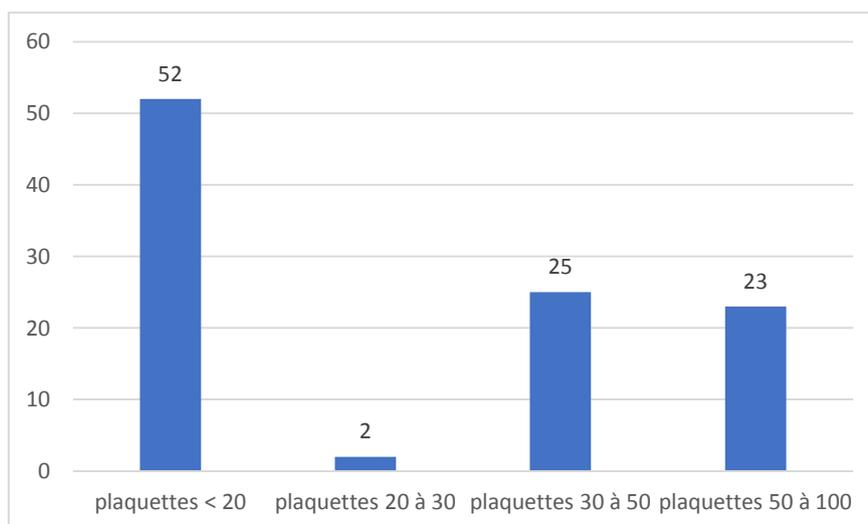


Figure 31: Répartition des patients selon la sévérité de la thrombopénie

52 patients (50,9%) présentaient une thrombopénie sévère à moins de 20 G/L ; 48 patients avaient un taux de plaquettes supérieur à 30 G/L dont 23 avec un taux entre 50 et 100 G/L.

C. Description de la population des témoins normaux

162 témoins normaux ont été recruté dans notre étude, ce sont tous des sujets sains aptes pour le don de sang, sans antécédents pathologiques ni de prise médicamenteuse. Tous nos témoins normaux ont effectué un don de sang (simple ou d'aphérèse) au niveau du CTS de l'hôpital militaire régional universitaire de Constantine. Les principales caractéristiques de cette population sont décrites ci-dessous :

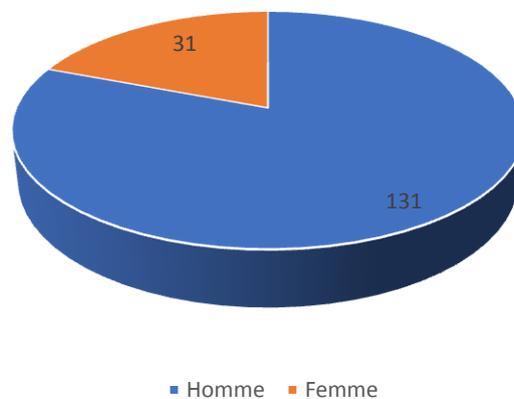


Figure 32: Répartition des témoins normaux selon le sexe

131 témoins (80,8%) étaient des hommes, et 31 (19,1%) étaient des femmes. (Le sexe-ratio homme/femme= 4,22).

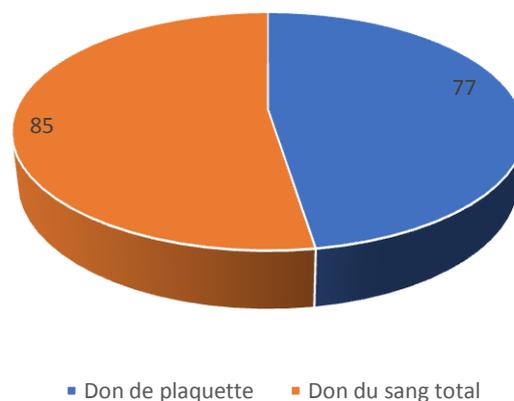


Figure 33: Répartition des témoins normaux selon le type de don

77 témoins (47,5%) ont effectué un don de plaquettes par cytophérèse, et 85 (52,4%) ont effectué un don de sang total.

Tableau 11: Taux de plaquettes, VPM et Hb des témoins normaux

	Effectif	Minimum	Maximum	Moyenne	Écart type	IC 95%	
Plaquettes (G/L)	162	205	395	251	142,62	229	273
VPM (fL)	162	6,1	10,2	8,75	1,54	8,52	8,98
Hb (g/dl)	162	11,52	16,33	14,1	4,15	13,47	14,73

Le taux moyen des plaquettes de nos témoins était à 251 G/L IC95% [229-273], avec une valeur moyenne du VPM à 8,75 fL IC95% [8,52-8,98].

La moyenne du taux d'hémoglobine était à 14,1 g/dl IC95% [13,47–14,73].

D. Description de la population des témoins thrombopéniques

Il a été inclus dans cette étude 42 patients présentant une thrombopénie (<100G/L) d'origine connue non immunologique. Ces patients présentaient les pathologies suivantes :

Tableau 12: Les pathologies des témoins thrombopéniques

Pathologie	Nombre	Pourcentage %
Leucémie aiguë	12	28,5%
Syndrome myélodysplasique	03	7,1%
Aplasie médullaire	04	9,5%
Insuffisance hépatocellulaire IHC	14	33,3%
CIVD	03	7,1%
Purpura thrombotique thrombopénique PTT	03	7,1%
Maladie de Bernard-soulier (non transfusé)	01	2,4%
Sepsis	01	2,4%
Anémie mégaloblastique	01	2,4%

La plupart de nos témoins thrombopéniques présentaient des hémopathies malignes ou bien des IHC. On note également 6 cas de thrombopénies périphériques (03 PTT et 03 CIVD).

Tableau 13: Taux de plaquettes, VPM et Hb des témoins thrombopéniques

	Effectif	Minimum	Maximum	Moyenne	Écart type	IC 95%	
Plaquettes (G/L)	42	1	85	45	56,32	28	62
VPM (fL)	42	5.6	11.8	8.62	6,01	6,82	10,42
Hb (g/dl)	42	7,1	15,2	10,2	6,62	8,2	12,2

Le taux moyen des plaquettes de nos témoins thrombopéniques était 45 G/L IC95% [28-62], avec une valeur moyenne du VPM à 8,62 fL IC95% [6,82-10,42].

La moyenne du taux d'hémoglobine était 10,2 g/dl IC95% [8,2–12,2].

E. Recherche des PAIg par méthode directe

1. Gating des plaquettes par un marqueur plaquettaire

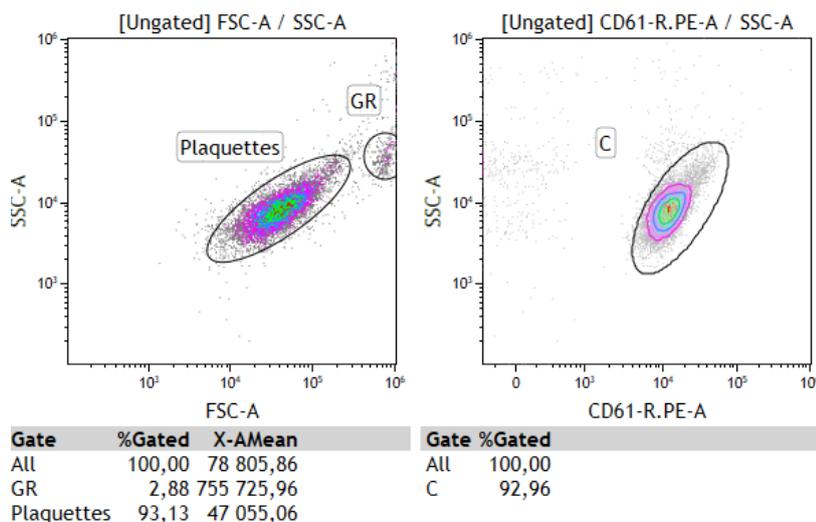


Figure 34: Aspect des plaquettes témoin sur les scattergramme

À l'acquisition des données, l'aspect obtenu chez les témoins normaux est représenté ci-dessus. Sur l'histogramme FSC/SSC deux populations se sont individualisées, les plaquettes et les globules rouges résiduels. Les événements exprimant le CD61 sont représentés dans le gâte C, leur taux dans la population générale est environ 93% dans cet exemple. L'intensité moyenne MI-FSC dans ce cas était 47.10^3 , elle correspond à la taille moyenne des plaquettes, le VPM sur la NFS était à 7,2 fL.

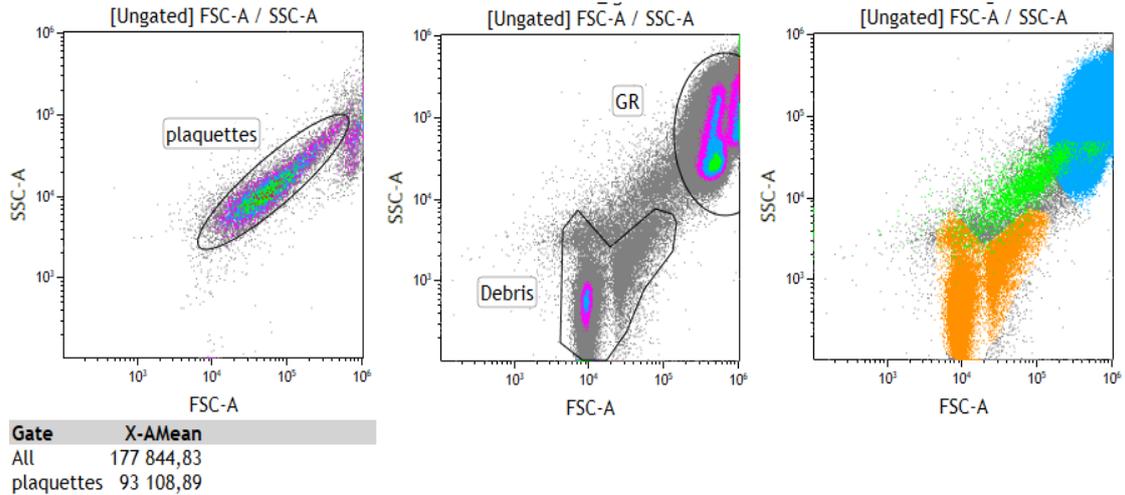


Figure 35: Aspect des plaquettes patients PTI

Sur l’histogramme FSC/SSC ci-dessus à gauche, la MFI FSC des plaquettes d’un patient PTI est à 93.10^3 , elle correspond à des plaquettes de grande taille VPM=12,1 fL. Sur les deux autres histogrammes sont représentées les plaquettes d’un autre patient PTI, avec une thrombopénie sévère à 5 G/L. les évènements CD41a positif sont colorés en vert, les débris cellulaires en orange et les globules rouges en bleu.

2. Taux d’évènements CD41/CD61 positifs chez les patients et les témoins

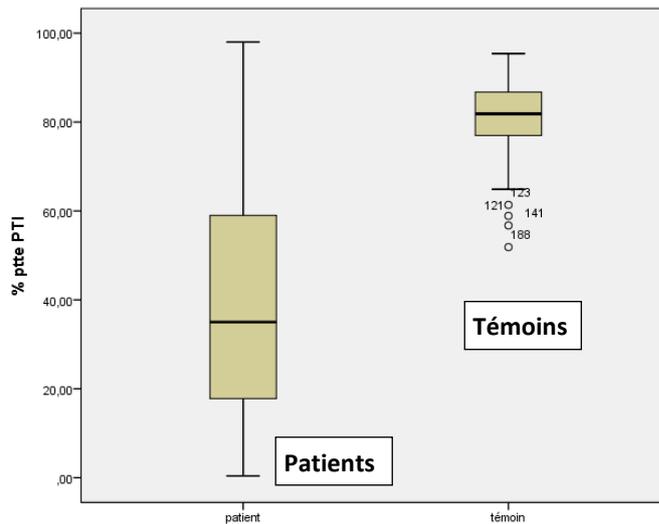


Figure 36: Pourcentage d’évènements CD41/CD61 positifs

Le pourcentage d'évènements CD41/CD61 positifs dans la population générale, montre un taux nettement plus élevé dans la série de témoins normaux par rapport aux patients PTI (Figure 36).

Tableau 14: Comparaison taux d'évènement CD41/CD61 positifs patients/témoins

	Effectif	Minimum	Maximum	Moyenne	Écart type	P-valeur T test
Patients	102	0,4	98,2	38,6	25,8	2,8.10 ⁻³⁰
Témoins normaux	162	51,8	95,8	81,3	8,25	

Le taux moyen d'évènements positifs par fenêtrage sur la population exprimant (CD61 ou CD41a) est de 81,3% chez les témoins normaux ; il est beaucoup plus bas chez les patients PTI à environ 38,6%. Cette différence est statistiquement significative, P-valeur du test T très inférieur à 0,05 (Tableau 14).

Tableau 15: Comparaison taux d'évènement CD41/CD61 positifs (témoins normaux/témoins thrombopéniques)

	Effectif	Minimum	Maximum	Moyenne	Écart type	P-valeur T test
Témoins normaux	162	51,8	95,8	81,3	8,25	6,6 .10 ⁻⁷
Témoins thrombopéniques	42	4,8	90,9	57,9	24,7	

Le taux moyen d'évènements CD41/CD61 positifs est de 57,9% chez les témoins thrombopéniques, nettement inférieur à celui des témoins normaux, cette différence est statistiquement significative, P-valeur du test T très inférieur à 0,05 (Tableau 15).

En outre, en divisant les témoins thrombopéniques selon l'étiologie de la thrombopénie en deux sous-groupes (thrombopénies périphériques et thrombopénies centrales), on obtient les résultats suivants :

Tableau 16: Taux de vraies plaquettes dans les thrombopénies centrales et périphériques

	Effectif	Minimum	Maximum	Moyenne	Écart type	P-valeur T test
Thrombopénies centrales	36	14,2	90,9	64,1	21,4	0,000028
Thrombopénies périphériques	06	4,8	39,9	20,7	14,8	
	Test Kolmogorov-Smirnova			test de Levene		
	0,106 > 0,05			0,24 > 0,05		

Le taux moyen d'évènements CD41/CD61 positifs dans le cas d'une thrombopénie centrale est de 64,1% nettement supérieur à celui des thrombopénies périphériques à 20,7%.

Cette différence est statistiquement significative avec une P-valeur du test T de Student à 0,000028. On note que l'effectif du sous-groupe «thrombopénie périphérique» était très réduit à six seulement, la normalité de la distribution des valeurs des deux sous-groupes et l'homogénéité des variances ont été vérifiées par le test de Kolmogorov-Smirnova et le test de Levene respectivement (Tableau 16).

3. Étude des paramètres de la taille plaquettaire MI-FSC et VPM

a) Comparaison de la MI-FSC patients/témoins normaux

Tableau 17: MFI-FSC patients/témoins

	Effectif	Minimum	Maximum	Moyenne	Écart type	P valeur
Patients	102	12422	129730	61997	27637	2.10 ⁻¹²
Témoins	162	10875	88362	38706	15863	

La moyenne de la MI-FSC des plaquettes de nos patients était = 61,9.10³, nettement plus grande que celle des témoins normaux à 38,7.10³

La P-Valeur du test T de Student pour échantillons indépendants (cas d'inégalité des variances) était très inférieure à 0,05. La différence entre la MI-FSC des patients et celle des témoins normaux est statistiquement très significative.

b) Détermination de la taille des plaquettes

La taille des plaquettes en (µm), a été déterminée après une calibration de la taille par des billes «Invitrogen Flow Cytometry Size Calibration Kit» (Tableau 18).

Tableau 18: MFI FSC des billes de calibration

Taille de la bille	1 µm	2 µm	4 µm	6 µm	10 µm	15 µm
MI FSC 10 ³	11,8	19,7	89,8	213,9	552	1037,8

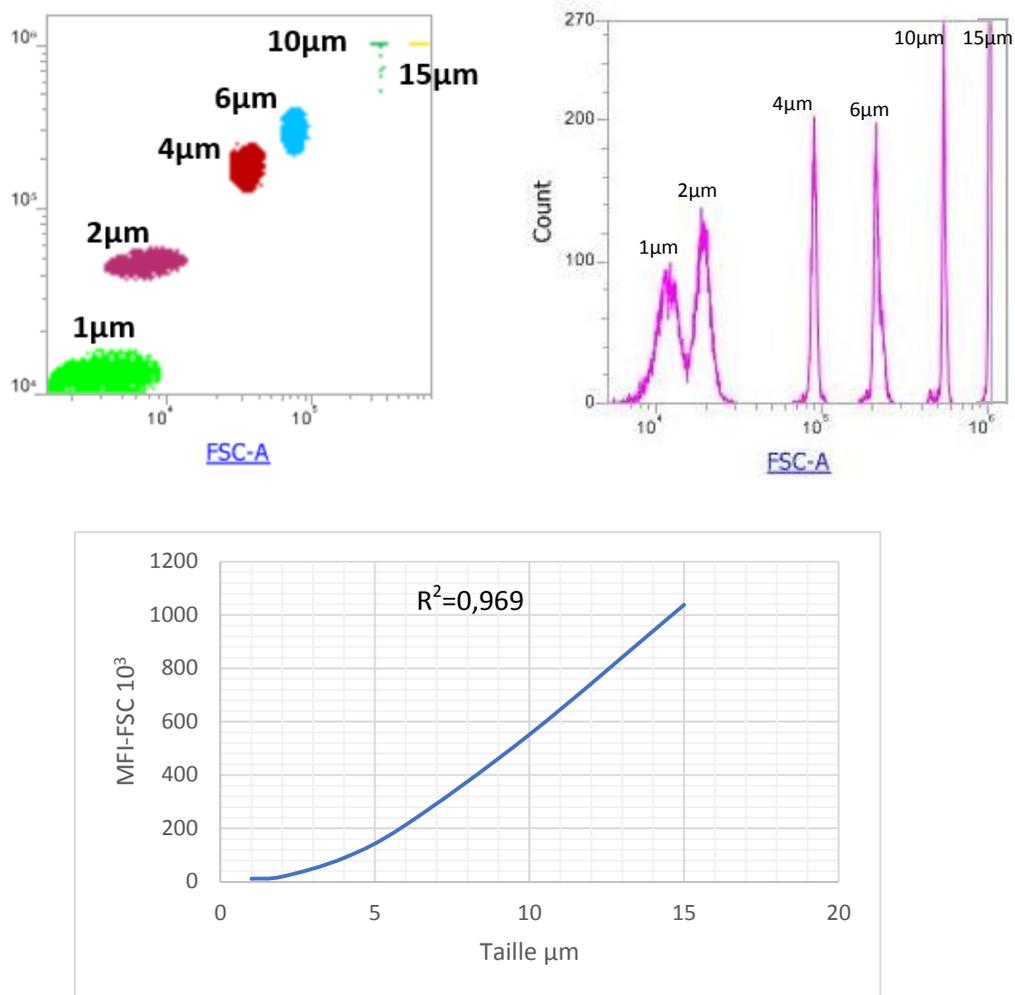


Figure 37: Calibration de la taille plaquettaire

Le passage des billes de calibration de la taille au cytomètre montre une augmentation progressive de la MI-FSC selon la taille de la bille, le traçage de la courbe montre un excellent coefficient de détermination à 0,969 très proche de 1 (Figure 37).

Tableau 19: Tailles des plaquettes patients et témoins

	Effectif	Minimum	Maximum	Moyenne	Écart type
Patients	102	1,1 µm	5,4 µm	3,6 µm	2,45
Témoins	162	0,96 µm	3,9 µm	2,8 µm	1,60

La taille moyenne des plaquettes obtenue après extrapolation des MI-FSC sur la courbe de calibration est de 2,8 µm chez les témoins normaux et nettement plus élevée à 3,6 µm chez les patients.

c) Corrélation entre la MI-FSC et le VPM

Tableau 20: Corrélation de Pearson MI-FSC/VPM

	Effectif	Moyenne	Écart type	Corrélation de Pearson	Sig (bilatérale)
MI-FSC (10^3)	306	63,91	27,16	0,34	0,002
VPM (FI)	306	10,17	1,69		

La normalité de la distribution des deux variables a été vérifiée par le test de Kolmogorov-Smirnova. Le coefficient de corrélation de Pearson était faible à 0,34, cependant la P-valeur de signification à $0,002 < 0,05$, témoignant de l'existence d'une corrélation entre les deux variables.

4. MFI IgG/IgM, témoins/patients

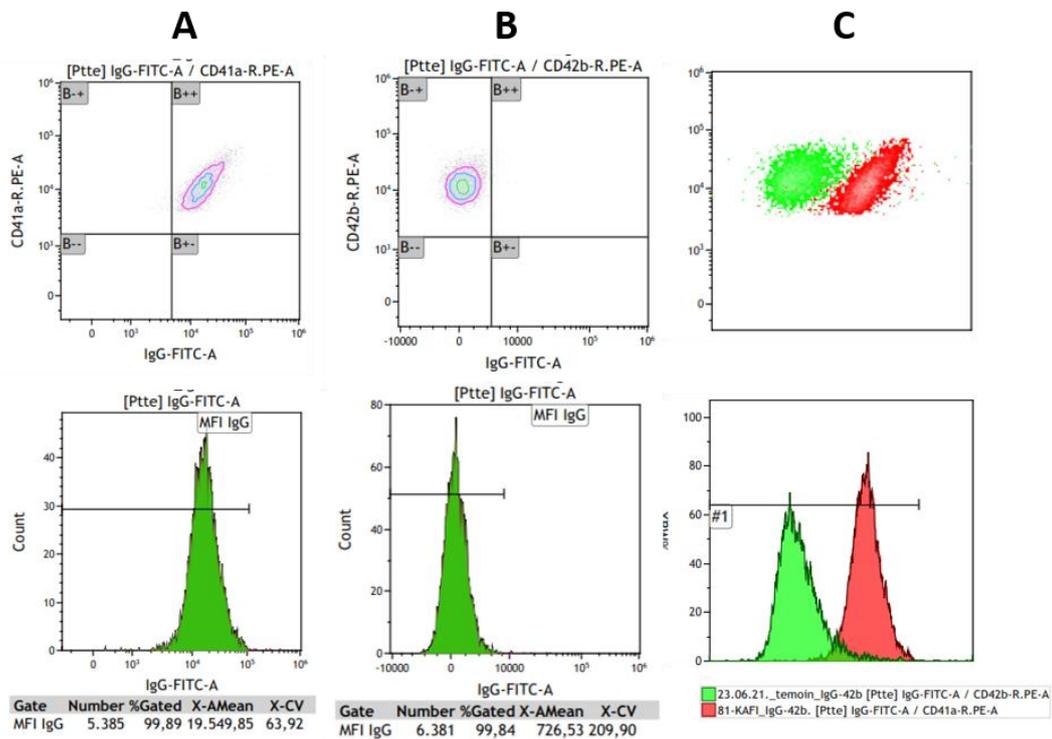


Figure 38: Patient positif IgG

- A : Patient PTI présentant une forte expression des IgG à la surface plaquettaire MFI= $19,5 \cdot 10^3$
- B : Témoin normal, MFI= $0,7 \cdot 10^3$
- C : Overlay patient (rouge) vs témoin (vert).

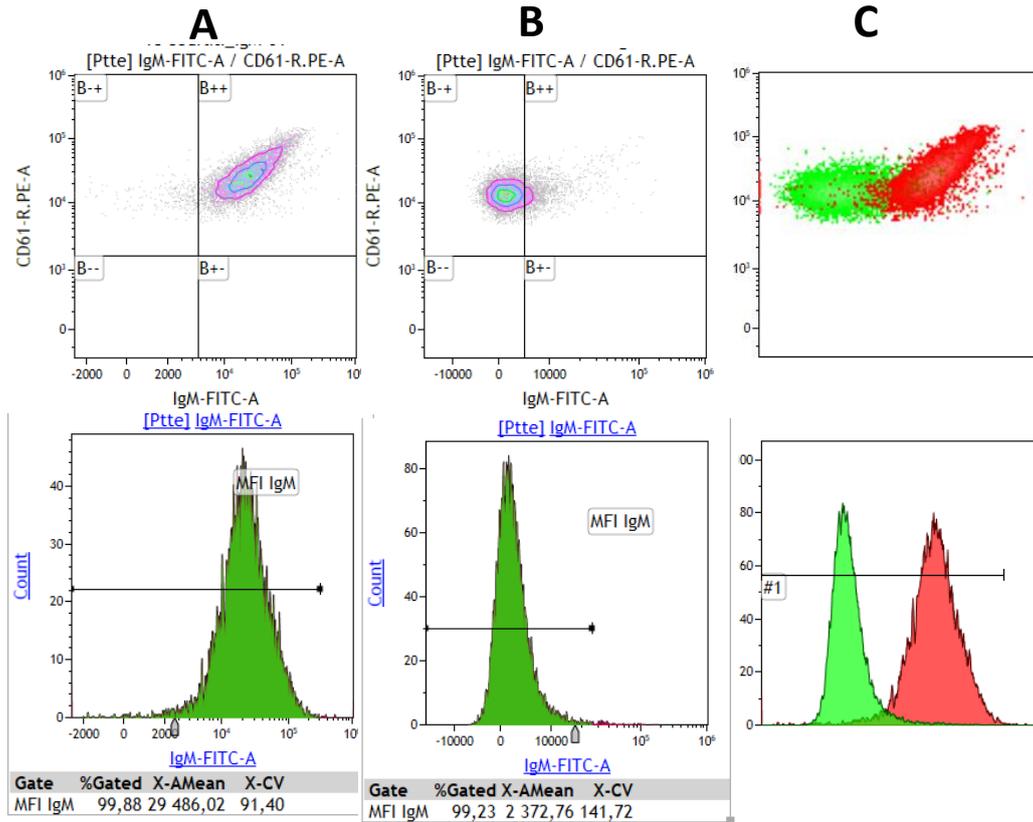


Figure 39: Patient positif IgM et overlay patient/témoin

A : MFI IgM patient = $29,4 \cdot 10^3$

B : MFI IgM témoin = $2,3 \cdot 10^3$

C : Overlay patient (rouge) vs témoin (vert).

Deux cas des patients présentant des PTI aiguës sont présentés ci-dessus, le premier est positif en IgG «Figure 38» tandis que le deuxième est positif IgM «Figure 39» à une forte intensité. Dans les deux cas la MFI de l'antiglobuline humaine fluorescente dans le canal BL1 était très élevée chez le patient PTI par rapport au témoin. Par l'overlay sur l'histogramme monoparamétrique count/BL1 on remarque un pic du patient en rouge bien séparée à celui du témoin en vert et décalée vers la droite, et de même pour l'histogramme SSC/BL1 où les nuages des deux populations (patient et témoin) sont bien séparés.

5. MI-FSC et MFI-IgG/IgM

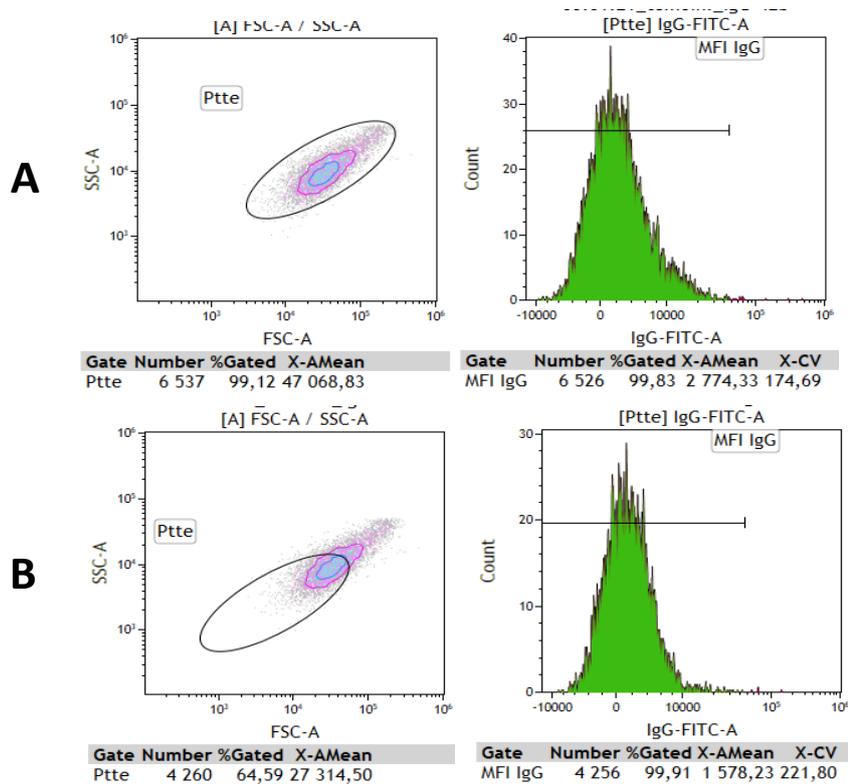


Figure 40: MFI-IgG selon la MFI_FSC

Lorsqu'on analyse la totalité des plaquettes CD61 positif en traçant un gate qui englobe toute la population plaquettaire (Figure 40-A), la MI-FSC est à 47.10^3 (ce qui correspond à une taille plaquettaire moyenne de $3,2 \mu\text{m}$) et la MFI-IgG à $2,7.10^3$.

Lorsqu'on prend uniquement les plaquettes de petite taille (en plaçant le gate sur la population FSC et SSC bas) environ 64% des plaquettes CD61 positif (Figure 40-B), la MI-FSC diminue à $27,3.10^3$ (ce qui correspond à une taille plaquettaire moyenne de $2,4 \mu\text{m}$) et la MFI-IgG diminue également à $1,5.10^3$.

Les MFI IgG obtenues en sélectionnant des populations plaquettaires de tailles croissantes chez trois témoins normaux ont été enregistrés. Les résultats sont illustrés sur la (Figure 41).

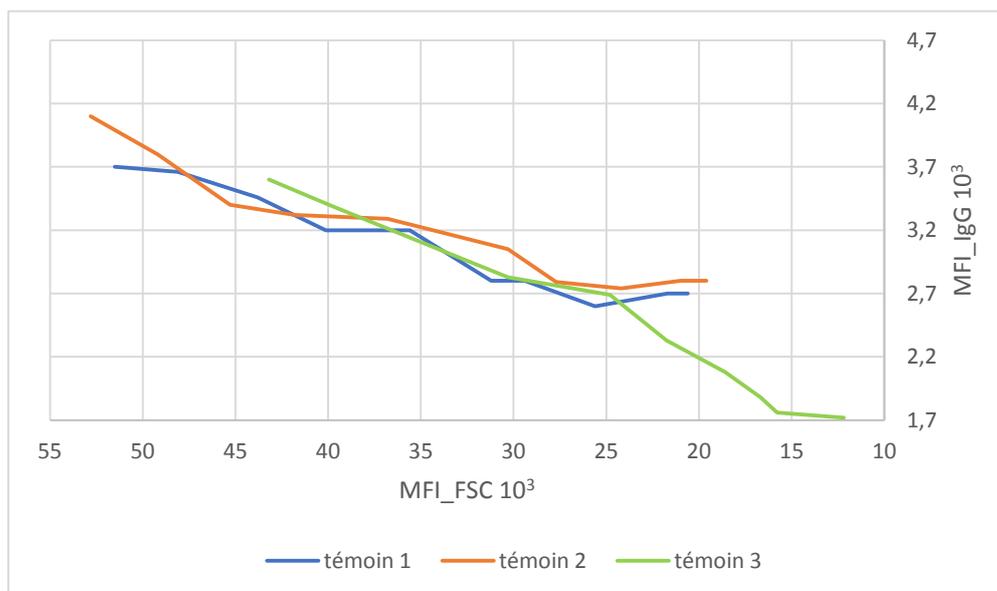


Figure 41: Variation de la MFI-IgG selon la MFI-FSC

On observe chez les 3 témoins normaux une courbe croissante (Figure 41), donc plus que la taille des plaquettes analysées est grande (MI-FSC), plus que la MFI-IgG est élevée.

Tableau 21: Corrélation de Pearson entre MI-FSC et MFI-IgG

	Effectif	Moyenne MI-FSC 10 ³	Taille moyenne des pte	Moyenne MFI-IgG 10 ³	Corrélation de Pearson	Sig (bilatérale)
Témoin 1	10	34,76	2,7 µm	3,08	0,966	0,000005
Témoin 2	10	34,86	2,7 µm	3,20	0,953	0,00002
Témoin 3	10	24,75	2,3 µm	2,53	0,990	0,000000

10 mesures différentes de la MFI-IgG selon la MI-FSC ont été réalisées chez 3 témoins normaux, on note une parfaite corrélation entre les deux variables, où le coefficient de corrélation de Pearson était supérieur à 0,9 dans les trois cas avec une p-valeur très inférieur à 0,05 (Tableau 21).

« La normalité de la distribution des trois variables a été vérifiée par le test de Kolmogorov-Smirnova ».

6. Comparaison des résultats de la MFI et CV IgG/IgM

Tableau 22: Statistiques des MFI IgG/IgM et CV

		Effectif	Moyenne	Minimum	Maximum	Sig T test
MFI IgG 10^3	Patients	102	15,91	0,89	250,7	0,00004
	Témoins	204	2,20	0,36	6,88	
MFI IgM 10^3	Patients	102	6,94	0,82	40,08	10^{-10}
	Témoins	204	2,19	0,31	4,72	
CV IgG %	Patients	102	138,2	47,9	353,2	0,00009
	Témoins	204	186,8	70,4	1007,8	
CV IgM %	Patients	102	152,3	63,1	911,1	0,013
	Témoins	204	193,1	74,9	1444	

Les moyennes des MFI IgG et IgM obtenues chez les patients sont à 15,91 et 6,94. 10^3 respectivement, nettement supérieurs aux MFI IgG et IgM des témoins qui sont à 2,2 et 2,19 respectivement. Cette différence est statistiquement très significative, la P-valeur du test T est très inférieure à 0,05 pour les deux paires IgG et IgM (Tableau 22).

Les moyennes des CV des fluorescences IgG et IgM chez les patients sont à 138,2% et 152,3% respectivement. Elles sont inférieures aux moyennes des CV IgG et IgM des témoins qui sont à 186,8% et 193,1% respectivement. Cette différence est statistiquement significative, les P-valeurs du test T sont inférieures à 0,05 (Tableau 22).

La comparaison des séries des valeurs MFI-IgG et IgM des patients et témoins représentées par des boîtes à moustaches (Figure 42), montre une hausse des deux séries patients (en rouge) par rapport aux séries témoins correspondantes (en vert). En revanche, pour les CV IgG et IgM, on note une baisse de séries patientes par rapport aux séries témoins.

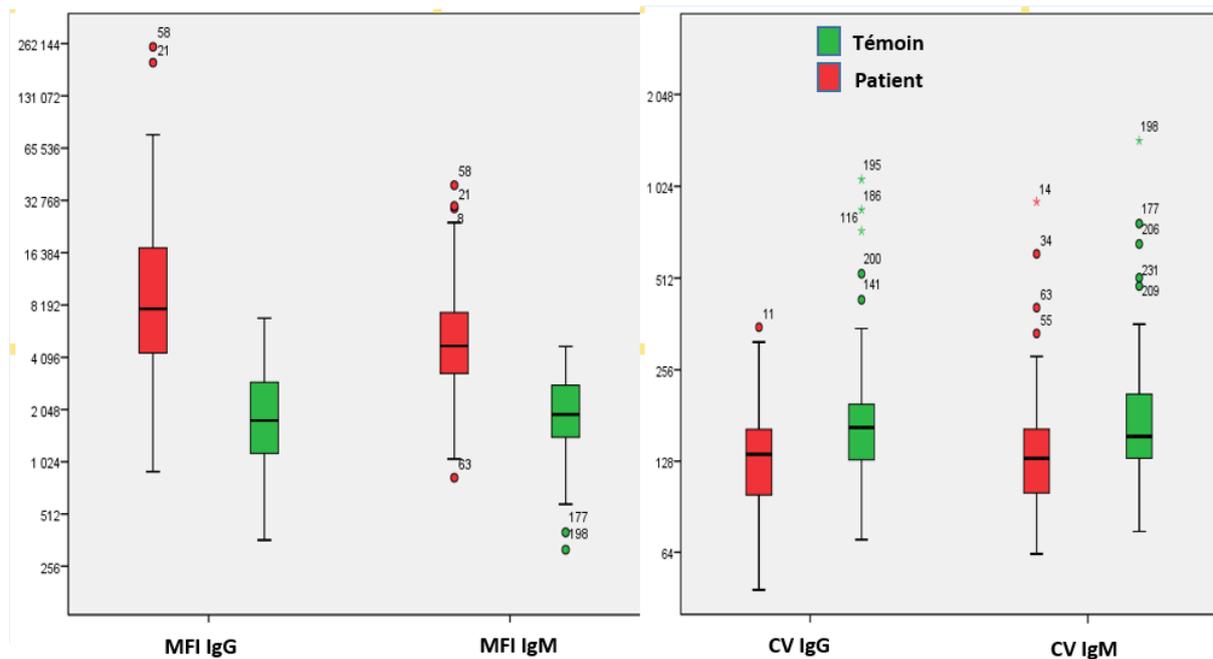


Figure 42: Distribution des valeurs MFI IgG/IgM et CV IgG/IgM

7. Détermination des valeurs intrinsèques du test

a) Courbes ROC

Les courbes ROC tracées dans la (Figure 43), sont déterminées sur la base des valeurs MFI (IgG ou IgM) obtenues chez les témoins (normaux et thrombopéniques) et les patients. Les témoins représentent la population PAIg négative, tandis que les patients répondant à nos critères de sélection représentent la population positive (gold standard).

La troisième catégorie IgG+IgM est obtenue en prenant à chaque fois la valeur MFI la plus élevée entre IgG et IgM (un test est considéré comme positif si l'une des valeurs IgG ou IgM est supérieur à la valeur seuil). On remarque que la meilleure courbe est celle de l'IgG+IgM (en rouge) suivi de la courbe IgG seul (en bleu) et en fin la courbe IgM seul (en vert) (Figure 43).

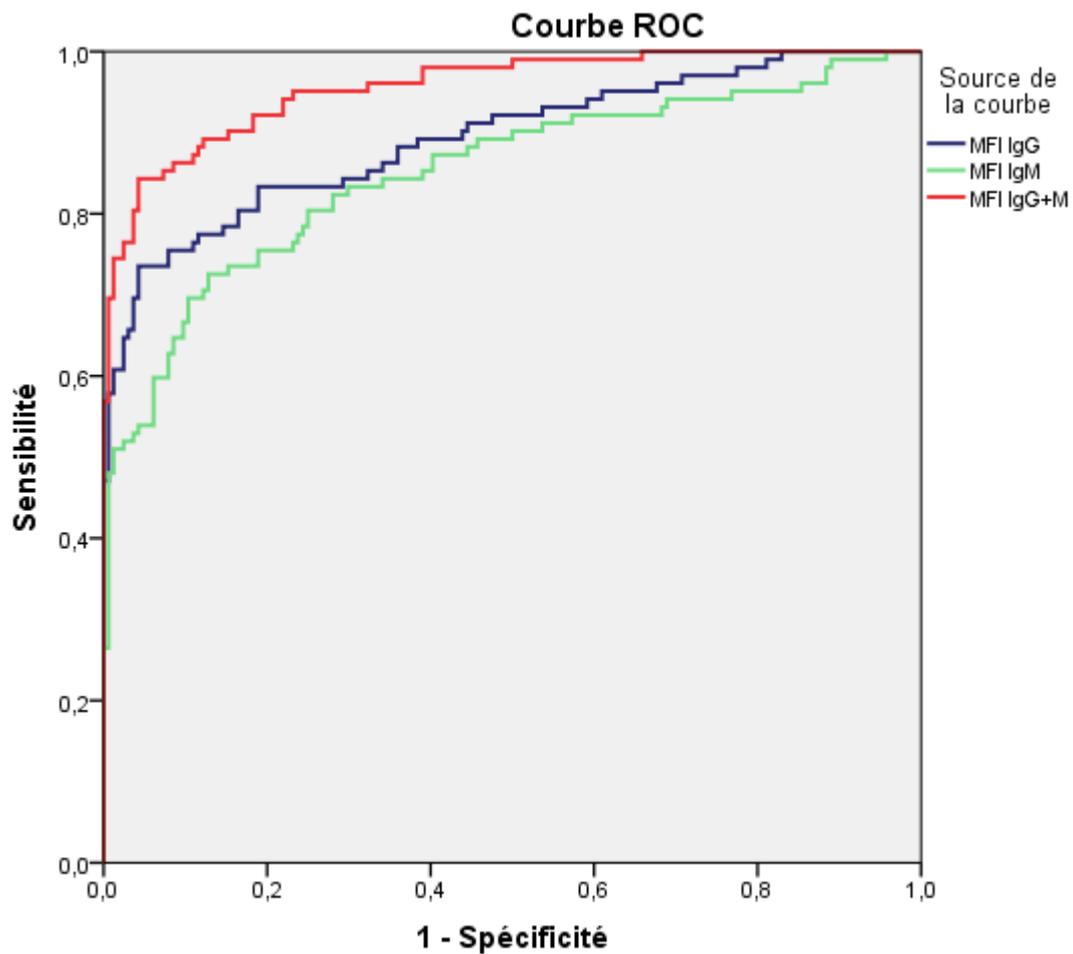


Figure 43: Courbes ROC, IgG ; IgM et IgG+IgM

Tableau 23: Surfaces sous les courbes ROC

	Surface sous la courbe	Intervalle de confiance à 95%	
MFI-IgG	0,893	0,850	0,936
MFI-IgM	0,851	0,800	0,902
MFI IgG+IgM	0,956	0,933	0,980

La surface sous la courbe ROC IgM est la plus faible à 0,851, celle de l'IgG est à 0,893. Par ailleurs on note une excellente valeur de l'IgG+IgM avec une valeur de 0,956 (très proche de 1) et avec un intervalle de confiance très significatif de (0,933 à 0,980) (Tableau 23).

b) Valeurs seuils, sensibilités et spécificités du test

À partir de la courbe ROC les valeurs seuils ont été choisies, d'une façon à obtenir le meilleur compromis sensibilité vs spécificité du test en utilisant l'IgG seul ; l'IgM seul et enfin la combinaison IgG+IgM.

Tableau 24: Répartition de la population générale selon l'expression de l'IgG

		Patients PTI	Témoins	Total
MFI-IgG > 4800	Positif	75	9	84
MFI-IgG ≤ 4800	Négatif	27	195	222
	Total	102	204	306

La valeur seuil de positivité de l'IgG choisie est égale à 4800.

75 patients vrais positifs ont une valeur MFI-IgG>4800 contre 27 faux négatifs, soit une sensibilité à 73,5%.

195 témoins vrais négatifs ont une valeur MFI-IgG<4800 contre 9 témoins faux positifs, soit une spécificité à 95,5% (Tableau 24).

Tableau 25: Répartition de la population générale selon l'expression de l'IgM

		Patients PTI	Témoins	Total
MFI-IgM > 4500	Positif	55	7	62
MFI-IgM ≤ 4500	Négatif	47	197	244
	Total	102	204	306

La valeur seuil de positivité de l'IgM choisie est égale à 4500.

55 patients vrais positifs ont une valeur MFI-IgM>4500 contre 47 faux négatifs, soit une sensibilité à 53,9%.

197 témoins vrais négatifs ont une valeur MFI-IgM<4500 contre 7 témoins faux positifs, soit une spécificité à 96,5% (Tableau 25).

Tableau 26: Répartition de la population générale selon l'expression de l'IgM et/ou IgG

		Patients PTI	Témoins	Total
MFI-IgG et/ou IgM > 4800	Positif	86	9	95
MFI-IgG et/ou IgM ≤ 4800	Négatif	16	195	211
	Total	102	204	306

La valeur seuil de positivité du test en combinant l'IgG et l'IgM est égale à 4800.

86 patients vrais positifs ayant une valeur IgG et/ou IgM supérieure à 4800, contre 16 faux négatifs, soit une **sensibilité à 84,3%**.

195 témoins vrais négatifs ont des valeurs IgG et IgM inférieurs à 4800 contre 9 témoins faux positifs, soit une **spécificité à 95,5%** (Tableau 26).

c) Relation entre le type du PTI et les tests faux négatifs

Tableau 27: Répartition des cas faux négatifs selon le type du PTI

		PTI chronique	Nouveau cas ou PTI persistant	Total
Méthode directe IgG+IgM	Vrai positif	06	80	86
	Faux négatif	09	07	16
	Total	15	87	102

Sur le tableau de contingence ci-dessus (Tableau 27) on note une fréquence des résultats faux négatifs à 60% (9 cas sur 15) chez les patients présentant un PTI chronique, contre seulement 08% (7 cas sur 87) chez les patients présentant une forme nouvelle ou persistante. Cette différence est statistiquement significative, la P valeur du test Khi-2 = 10^{-7} , ainsi que l'estimation du risque montre un risque relatif des faux négatifs à 17,1 avec un intervalle de confiance significatif [4,7 – 62,2]

8. Détermination des valeurs extrinsèques du test

Tableau 28: Rapports des vraisemblances (Likelihood ratio)

	Prévalence	LR+	LR+ IC95%	LR-	LR- IC95%
Recherche IgG seul	0,33	17	[8,71-32]	0,28	[0,20-0,38]
Recherche IgM seul	0,33	16	[7,42-33]	0,48	[0,39-0,59]
Recherche IgG et IgM	0,33	19	[10-36]	0,16	[0,10-0,26]

On note un excellent rapport de vraisemblance positive LR+ (>10), pour les trois types de recherche de PAIg (IgG, IgM et IgG+IgM), cependant l'association IgG+IgM est la seule qui possède un intervalle de confiance à 95% significativement supérieur à 10 [10-36] (Tableau 28).

Les rapports des vraisemblances négatives (LR-) sont modérés pour les deux tests, IgG seul et IgM seul. Cependant le (LR-) de l'association IgG+IgM, montre une performance acceptable à 0,16 avec un intervalle de confiance de [0,10-0,26] (Tableau 28). Les valeurs des rapports LR+ et LR-, habituellement retenues pour caractériser un test diagnostique, sont rapportées dans l'annexe2 (page174).

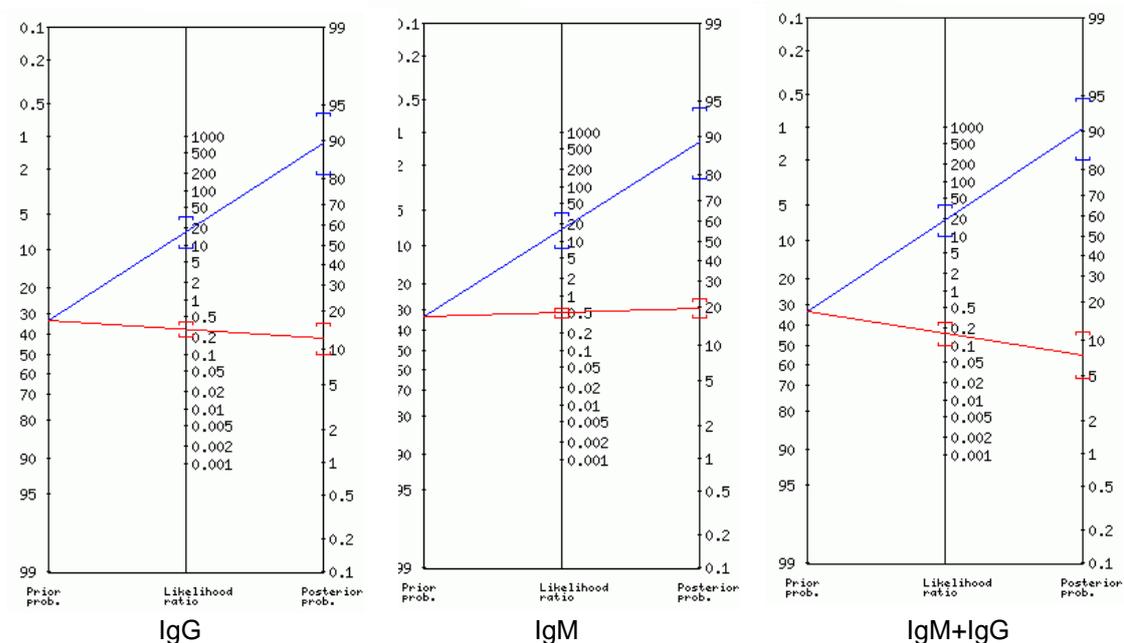


Figure 44: Nomogrammes de Fagan

Sur les nomogrammes de Fagan des tests PAIg (Figure 44), le point de départ de la droite est la probabilité pré-test qui est à 33,3% et elle représente la prévalence de nos patients dans

la population générale (il y'a un patient pour deux témoins dans notre population), la droite passe ensuite par les rapports LR+ et LR- pour obtenir les valeurs prédictives positives et négatives (les probabilités poste test) :

Tableau 29: VPP et VPN

	Prévalence	VPP	VPP IC95%	VPN	VPN IC95%
Recherche IgG seul	0,33	89%	81-94%	88%	84-91%
Recherche IgM seul	0,33	89%	79-94%	81%	77-84%
Recherche IgG et IgM	0,33	90%	83-95%	93%	88-95%

Le test PAIg appliqué dans les conditions expérimentales de notre étude, et aux valeurs seuils choisies sur la courbe ROC, possède une excellente valeur prédictive positive à 89%, 89% et 90% en utilisant l'IgM seul, l'IgG seul et la combinaison IgG+IgM respectivement avec un intervalle de confiance légèrement plus significatif pour l'association IgG+IgM (Tableau 29).

Quant aux valeurs prédictives négatives, l'association IgM+IgG possède nettement la meilleure VPN par rapport à l'IgG seul ou l'IgM seul.

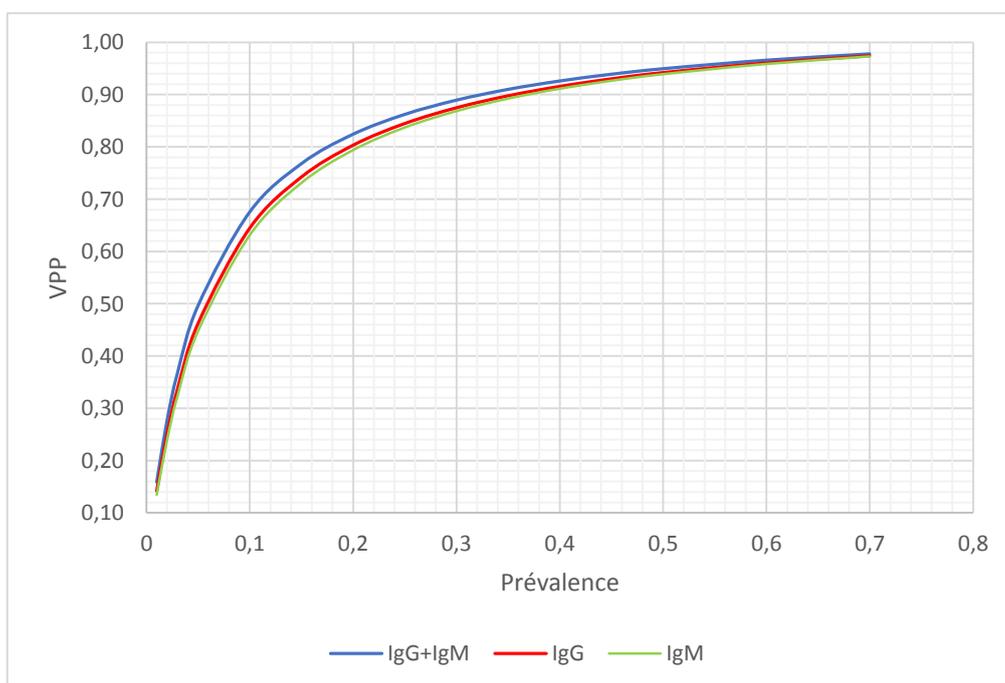


Figure 45: Variation de la VPP selon la prévalence du PTI

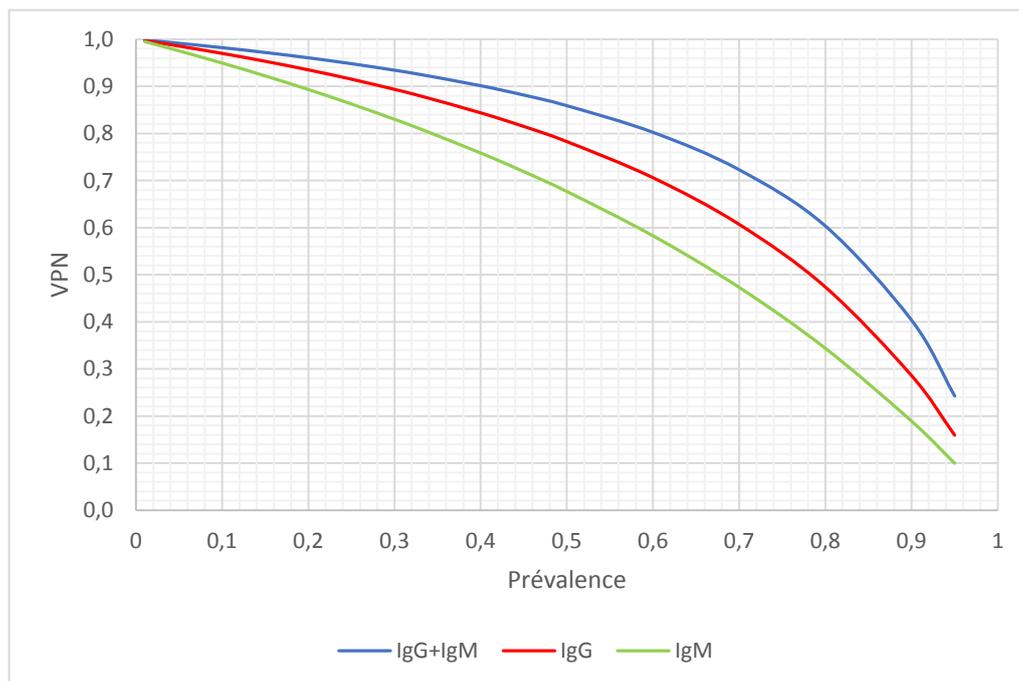


Figure 46: Variation de la VPN selon la prévalence du PTI

La variation des VPP et VPN selon la prévalence du PTI, montre des VPP très similaires entre les trois tests (Figure 45), en revanche, la VPN la plus élevée est obtenue dans l'association IgG+IgM, et elle est très modérée en cas d'utilisation de l'IgM seul (Figure 46).

9. Analyse des résultats selon les valeurs seuils fixées

En fixant la valeur seuil de la MFI à 4800 pour l'IgM et l'IgG, les résultats obtenus sont les suivants :

Tableau 30: Répartition des patients selon l'isotype de l'anticorps antiplaquettes

		Nombre	Pourcentage%	% cumulé
Patients PTI	Positifs IgG seul	36	35,2%	35,2%
	Positifs IgM seul	11	10,7%	46%
	Positifs IgG et IgM	39	38,2%	84,3%
	Faux négatifs	16	15,6%	100%
	Total	102		

35,2% des patients expriment l'IgG seul et seulement 10% expriment uniquement l'IgM. Par ailleurs le pourcentage le plus élevé est celui de l'expression simultanée de l'IgG et l'IgM observée dans 38,2% des cas.

a) Relation isotype de l'Ac ; âge et sexe

Tableau 31: Isotype de l'anticorps selon l'âge

	Enfants Nbr (%)	Adultes Nbr (%)	Âge moyen	Min	Max	IC95%
IgG seul	10 (35,7%)	26 (44,8%)	28,6 ans	6 mois	68 ans	[22-35]
IgM seul	3 (10,7%)	8 (13,7%)	38,5 ans	6 mois	80 ans	[20-56]
IgG + IgM	15 (53,5%)	24 (41,3%)	27,3 ans	1 mois	72 ans	[20-34]

L'âge moyen est très similaire entre les deux groupes des patients : positifs IgG seul et positifs IgG+IgM. L'âge moyen des patients positifs IgM seulement est légèrement plus élevé et beaucoup plus hétérogène (IC95% plus large) (Tableau 31).

La fréquence des différents isotypes est très similaire entre les enfants de moins de 15 ans et les adultes (Figure 47). L'association IgG+IgM est mise en évidence chez 53,5% des enfants et 41,3% des adultes. L'isotype IgG seul est retrouvé chez 35,7% des enfants et 44,8% des adultes.

On note également une fréquence très similaire des différents isotypes d'Ac, chez les hommes et les femmes (Figure 48).

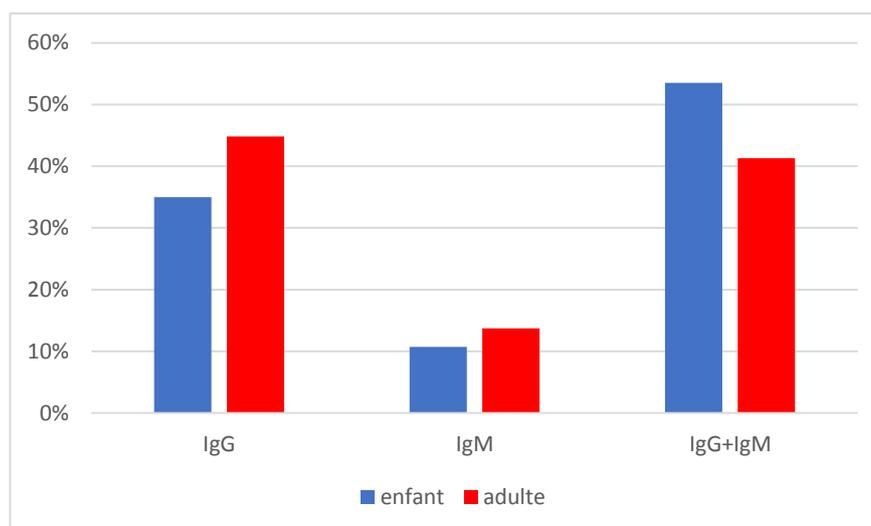


Figure 47: fréquence des isotypes de l'Ac selon la catégorie d'âge

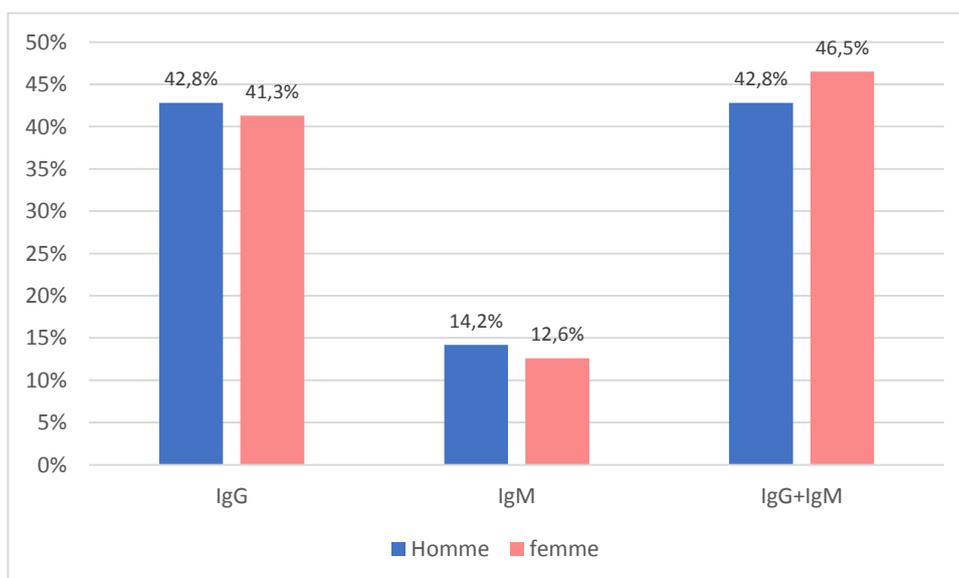


Figure 48: Fréquence des isotypes de l'Ac selon le sexe

b) Variation du taux de plaquettes selon l'isotype de l'Ac

Tableau 32: Statistiques du taux de plaquettes selon l'isotype de l'Ac

	Effectif	Moyenne taux de pte G/L	Min G/L	Max G/L	Écart type	IC95%
IgG seul	36	38,2	5	93	28,7	[28-48,5]
IgM seul	11	27,3	5	71	23,1	[11,7-42,8]
IgG + IgM	39	23,1	3	89	20,7	[16,1-30]
Faux négatifs	16	38,4	10	85	24,8	[25,2-51,6]

On observe un taux de plaquettes plus bas en cas d'association IgG+IgM par rapport aux cas de l'IgG seul ou l'IgM seul (Tableau 32). La différence du taux de plaquettes entre le groupe IgG+IgM et le groupe IgG seul est statistiquement significative, P-valeur du test T de Student=0,016. La différence entre les deux groupes IgM seul et IgG seul, et les groupes IgG+IgM et IgM seul n'est pas significative, P-valeur du test T sont respectivement 0,26 et 0,57.

Les valeurs du taux des plaquettes des différentes séries sont représentées en boîte à moustache dans la (Figure 49)

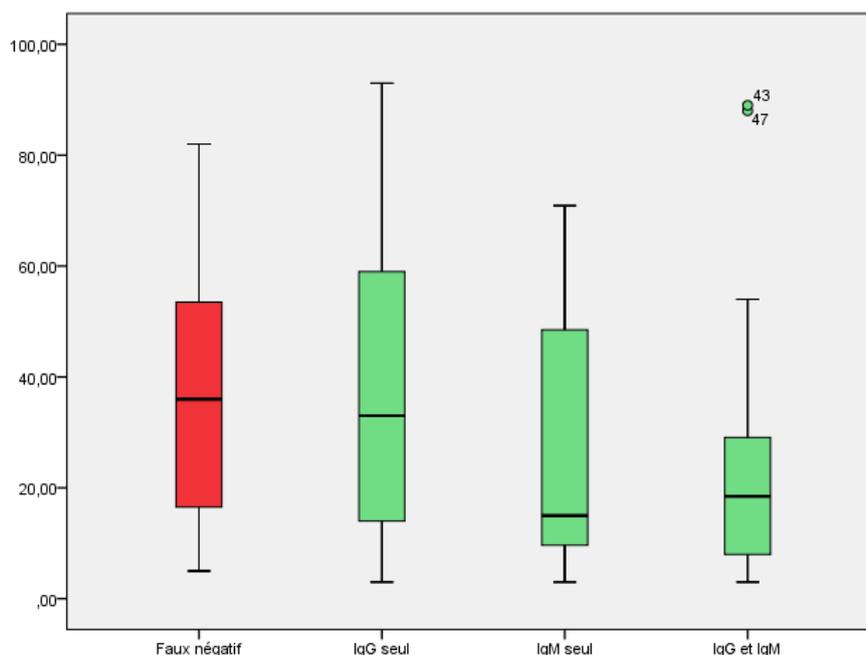


Figure 49: Variation du taux de plaquettes selon l'isotype de l'Ac

c) Corrélation entre MFI-IgG/IgM et le taux de plaquettes

Tableau 33: Corrélation MFI_IgG et/ou IgM et le taux de plaquettes

	Effectif	Moyenne	Écart type	Corrélation de Pearson	Sig (bilatérale)
MFI-IgG et/ou IgM (10^3)	86	19,8	34,3	0,38	<u>0,00043</u>
Plaquettes (G/L)	86	31,3	25,3		

La normalité de la distribution des deux variables a été obtenue après leur transformation, et vérifiée par le test de Kolmogorov-Smirnova. L'effectif des patients inclus dans cette analyse est de 86, après l'élimination des faux négatifs. Le coefficient de corrélation de Pearson était faible à 0,38, cependant on note une P-valeur de signification à $0,00043 < 0,05$, témoignant de l'existence d'une corrélation entre les deux variables (Tableau 33).

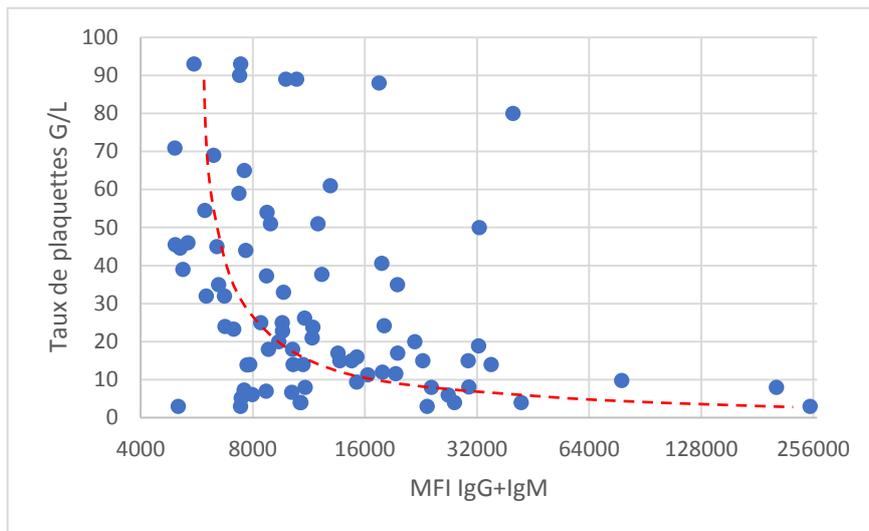


Figure 50: Corrélation taux de plaquettes vs MFI IgG et/ou IgM

86 patients vrais positifs (les faux négatifs sont exclus), sont représentés ci-dessus (Figure 50). On note une corrélation négative entre le taux des plaquettes et la MFI IgG+IgM, exprimée par une augmentation progressive de la MFI accompagnant la diminution du taux de plaquettes suivant la ligne rouge discontinue.

d) MFI IgG/IgM et risque de thrombopénie sévère

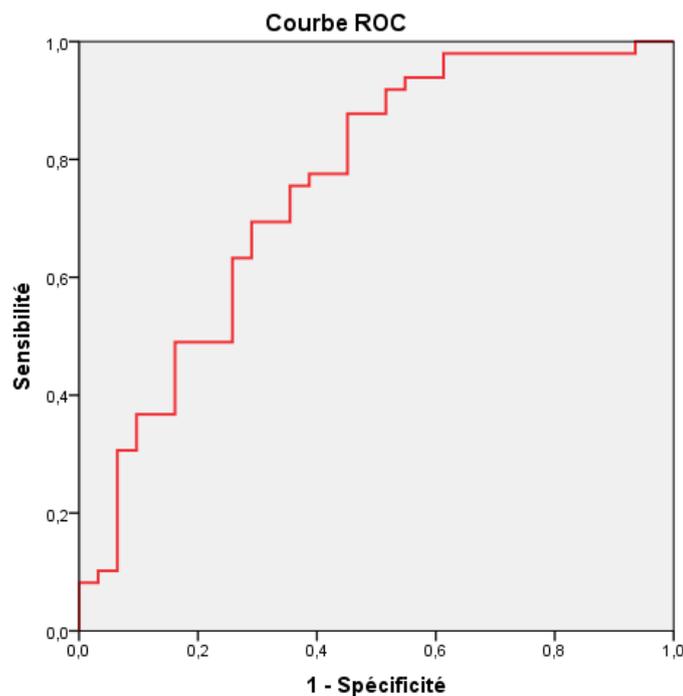


Figure 51: Courbe ROC MFI_IgG+IgM vs taux des plaquettes <30 G/L

La courbe ROC ci-dessus (Figure 51), est tracée à la recherche d'une valeur seuil de MFI déterminant un risque hémorragique important pour le patient.

Les sujets ayant un taux de plaquettes >30G/L parmi les 86 patients vrais positifs sont considérés comme une population à faible risque hémorragique (négatifs), tandis que les sujets ayant un taux de plaquettes <30G/L représente la sous population des patients vrais positifs à haut risque hémorragique (positifs), les MFI des deux populations ont été comparées et la courbe ROC a été tracée (Figure 51).

La surface sous la courbe ROC est de 0,754 et la valeur seuil choisie est une MFI>18.10³ donnant une Se=36% et Sp=91%.

Tableau 34: Tableau de contingence taux de plaquettes vs MFI

		Taux de plaquettes		Total
		<30 G/L	>30 G/L	
MFI_IgG et/ou IgM	>18.10 ³	19	03	22
	<18.10 ³	34	30	64
Total		53	33	86

Parmi les 86 patients vrais positifs, 53 (61,6%) présentant un taux de plaquettes inférieur à 30 G/L et 33 (38,4%) ont un taux supérieur à 30 G/L.

Parmi les 22 patients présentant une MFI du test direct PAIg supérieure à 18.10³, 19 ont un taux de plaquettes <30 G/L soit un pourcentage de 86,3%.

Tableau 35: Relation entre les paramètres biologiques : Ptte <30G/L et MFI> 18.10³

Effectif	Sig Khi deux	V de Cramer	Odds ratio	
			Valeur	IC 95%
86	0,012	0,28	4,95	1,31 - 18,71

La P_valeur du test Khi deux est à 0,012 (<0,05), confirmant la présence d'une relation significative entre la MFI à plus de 18.10³ et l'expression d'une thrombopénie sévère à moins

de 30G/L. Néanmoins l'indice V de Cramer est à 0,28 (<0,3), en faveur d'une relation de faible puissance entre les deux variables.

L'estimation du risque de thrombopénie sévère à moins de 30G/L en cas d'une MFI supérieure à 18.10^3 , montre un Odds ratio à 4,95 avec un intervalle de confiance très large, mais significativement supérieur à 1 (Tableau 35).

10. Marqueur d'activation plaquettaire CD62p

Tableau 36: Expression des P-sélectines et corrélation avec la MFI IgG/IgM

		Effectif	Moyenne	Écart type	Sig T test	Corrélation de Pearson MFI_IgG+IgM	
						Coefficient	P_Value
MFI CD62p (10^3)	Patients	26	3,7	2,5	0,73	-0,32	0,109
	Témoins	32	4,4	10			

Un marquage par le CD62p est réalisé pour 26 patients PTI et 32 témoins. Les deux séries des MFI CD62p n'étaient pas différentes, P valeur du test T de Student était à $0,73 > 0,05$.

Il n'y a pas de corrélation entre le niveau d'expression des P-sélectines et la MFI IgG et/ou IgM obtenues. Le coefficient de corrélation de Pearson est très faible à -0,32 et la P-valeur à $0,109 > 0,05$.

F. Recherche des PAIg par méthode indirecte

1. Résultats MFI IgG/IgM et CV

Tableau 37: Statistique de la méthode indirecte

		Effectif	Moyenne	Minimum	Maximum	Sig T test
MFI IgG+M 10^3	Patients	44	13,42	1,86	90,57	0,00015
	Témoins	44	2,06	0,89	5,78	
CV IgG+M %	Patients	44	138,4	87	217	0,006
	Témoins	44	185,7	77,8	730,9	

La moyenne de la MFI IgG+IgM obtenue par des plaquettes incubées avec du plasma patient était à $13,4.10^3$, nettement supérieurs à la MFI IgG+IgM des mêmes plaquettes incubées avec un plasma témoin qui était à $2,06.10^3$. Cette différence est statistiquement très significative, la P-valeur du test T pour échantillons appariés était à 0,00015 très inférieure à 0,05 (Tableau 37).

La moyenne des CV des fluorescences IgG+IgM chez les patients est à 138,4%. Elle est inférieure à la moyenne des CV IgG+IgM des témoins qui est à 185,7%. Cette différence est statistiquement significative, la P-valeurs du test T pour échantillons appariés est à 0,006, inférieure à 0,05 (Tableau 37).

2. Interprétation des valeurs MFI obtenues

Tableau 38: Sensibilité et spécificité de la méthode indirecte

		Patients PTI	Témoins	Total
MFI-IgG ou IgM > 4800	Positif	36	07	43
MFI-IgG ou IgM ≤ 4800	Négatif	08	37	45
Total		44	44	88

La valeur seuil de positivité du test en combinant l'IgG et l'IgM choisie est égale à 4800.

36 patients vrais positifs ont une valeur IgG et/ou IgM supérieure à 4800, contre 08 faux négatifs, soit une sensibilité à 81,8%. (Tableau 38)

37 témoins vrais négatifs contre 07 témoins faux positifs soit une spécificité à 84%.

Tableau 39: Rapports des vraisemblances de la méthode indirecte

	Prévalence	LR+	LR+ IC95%	LR-	LR- IC95%
Recherche IgG et IgM	0,5	5,14	[2,38-11]	0,22	[0,12-0,39]

Le rapport de vraisemblance positive montre une forte performance du test (LR+ >5), mais avec un intervalle de confiance à 95% très large, non significatif [2,38-11], allons d'une performance modérée à forte (Tableau 39).

Le rapport de vraisemblance négative (LR-) montre une performance modérée (LR- >0,2).

Tableau 40: répartition des patients selon l'isotype de l'Ac par méthode indirecte

		Nombre	Pourcentage%	% cumulé
Patients PTI	Positifs IgG seul	11	25%	25%
	Positifs IgM seul	10	22,7%	47,7%
	Positifs IgG et IgM	15	34%	81,8%
	Faux négatifs	08	18,1%	100%
	Total	44		

25% des patients expriment l'IgG et 22,7% expriment uniquement l'IgM. Par ailleurs le pourcentage le plus élevé est celui de l'expression simultanée de l'IgG et l'IgM dans 34% des cas (Tableau 40).

3. Comparaison de la MFI des deux méthodes : directe et indirecte

Tableau 41: MFI IgG+IgM par les deux méthodes

		Effectif	Moyenne	Écart type	Sig T test
MFI IgG+M 10 ³	Directe	44	15,23	30,4	0,736
	Indirecte	44	13,42	18,1	

La recherche des PAIg par méthode directe et indirecte a été effectuée simultanément pour 44 patients PTI.

Les moyennes des MFI IgG/IgM obtenues sont très similaires, à 15,23 et 13,42 par la méthode directe et la méthode indirecte respectivement.

La P_valeur du test T de Student pour échantillons appariés est à 0,736 > 0,05, donc les deux séries des valeurs ne sont pas différentes.

4. Comparaison des résultats des deux méthodes : directe et indirecte

Tableau 42: Expression des IgG par les deux méthodes

MFI IgG		Méthode indirecte		
		Négatif	Positif	Total
Méthode directe	Négatif	05	08	13
	Positif	05	17	22
Total		10	25	35

Tableau 43: Expression des IgM par les deux méthodes

MFI IgM		Méthode indirecte		
		Négatif	Positif	Total
Méthode directe	Négatif	12	11	23
	Positif	06	14	20
Total		18	25	43

Tableau 44: Expression de l'IgG et/ou IgM par les deux méthodes

MFI IgG et/ou IgM		Méthode indirecte		
		Négatif	Positif	Total
Méthode directe	Négatif	02	07	09
	Positif	06	29	35
Total		08	36	44

17 cas étaient positifs IgG et cinq négatifs, sur un total de 35 patients par les deux méthodes, soit un pourcentage de concordance à 62,8%. Cinq cas (14,2%) étaient IgG positifs par la méthode directe et négatifs par l'indirecte, en revanche huit cas (22,8%) étaient positifs par la méthode indirecte et négatifs par la directe (Tableau 42). Le test IgG était non concluant dans 9 cas.

14 cas étaient positifs IgM et 12 négatifs, sur un total de 43 patients par les deux méthodes, soit un pourcentage de concordance à 60,4%. Six cas (13,9%) étaient IgM positifs par la méthode directe et négatifs par l'indirecte, en revanche 11 cas (25,5%) étaient positifs par la méthode indirecte et négatifs par la directe (Tableau 43). Le test IgM était non concluant dans un seul cas.

29 cas étaient positifs IgG et/ou IgM et deux cas négatifs, sur un total de 44 patients par les deux méthodes, soit un pourcentage de concordance à 70,4%. Six cas (13,6%) étaient IgG et/ou IgM positifs par la méthode directe et négatifs par l'indirecte, en revanche sept cas (15,9%) étaient positifs par la méthode indirecte et négatifs par la directe (Tableau 44).

G. Titrage des PAIg

1. Détermination de la concentration des billes

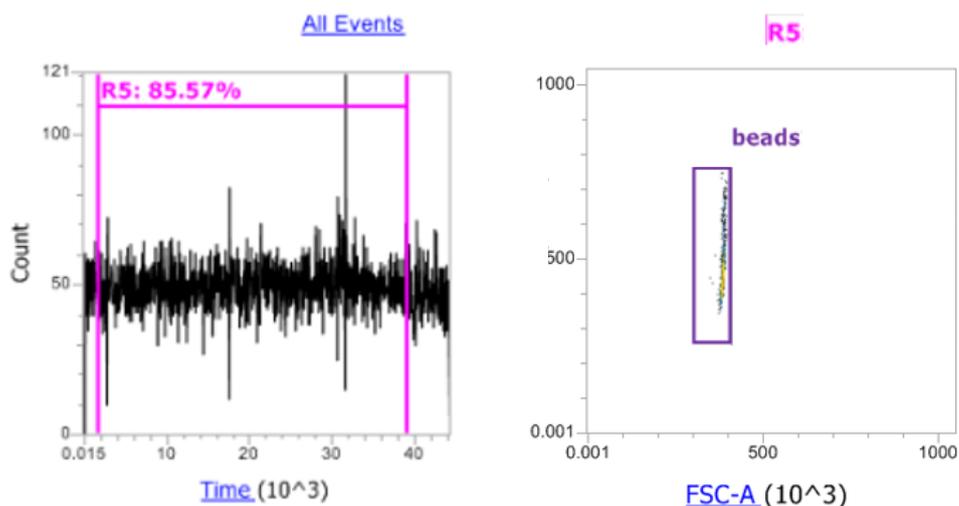


Figure 52: Mesure de la concentration des billes de capture

La concentration des billes de capture « AbC™ Anti-Mouse Bead, Invitrogen™ » a été déterminée par méthode volumétrique sur le cytomètre Attune NXT™ (Figure 52). La concentration des billes était à 2400 billes/ul. Après le dépôt de 25µl la quantité totale des billes dans chaque tube était à 60.10^3 billes (2400x25).

2. Courbe d'étalonnage par les billes de capture

La quantité exacte de l'anticorps « Invitrogene Mouse anti-Human CD4 FITC » par billes a été calculée pour chaque dilution, et les MFI FITC obtenues pour chaque dilution sont reportées dans le Tableau 45 :

Tableau 45: Étalonage par les billes de capture

Dilution	Quantité d'Ac pg/bille	MFI (10^3)	CV%
1/4	85	274,5	17
1/8	43	255,4	21
1/16	21	218,1	16
1/32	10,6	155,4	20
1/64	5,03	90,5	25
1/128	2,67	49	20
1/256	1,33	22,7	22
1/512	0,66	11,8	21
1/1024	0,32	5,21	19

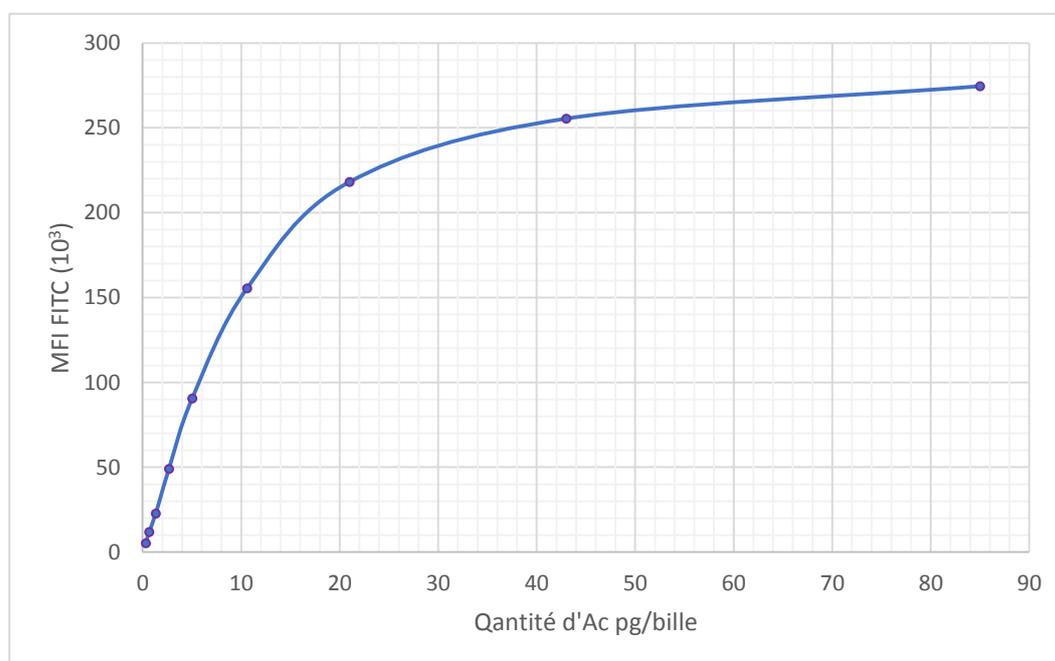


Figure 53: Variation de la MFI-FITC selon la quantité d'anticorps en pg/bille.

Sur la courbe d'étalonnage, les MFI-FITC augmentent d'une façon linéaire pour les faibles quantités d'anticorps, ensuite elle prend une forme hyperbole pour rejoindre enfin un plateau correspondant à la saturation des billes (Figure 53).

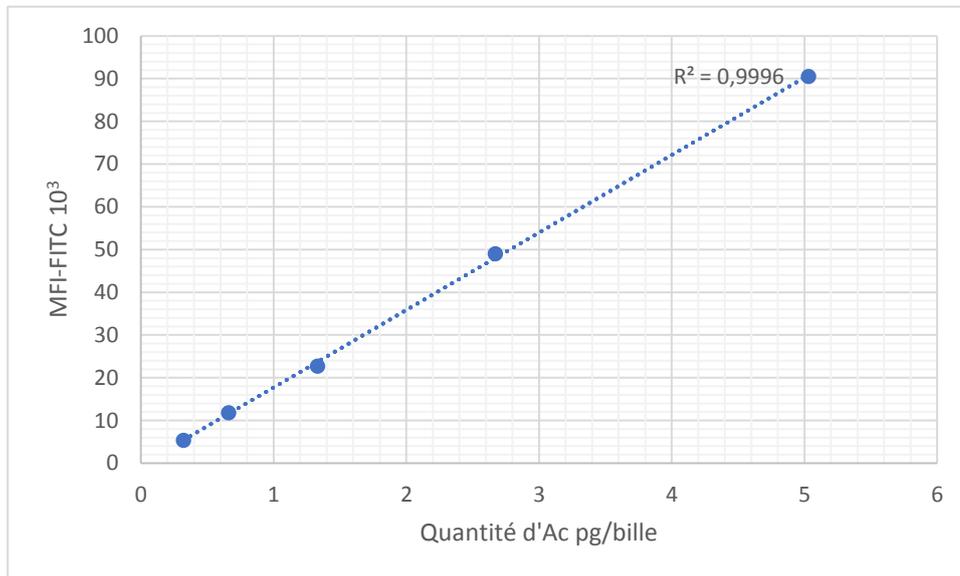


Figure 54: Courbe d'étalonnage par les billes de capture

Pour les cinq dernières dilutions de 1/64 à 1/1024, la quantité d'anticorps fixés par billes varie de 0,32 à 5,03 pg/billes, et les MFI-FITC de 5,21 à 90,5.10³ (Tableau 45). Sur la courbe d'étalonnage de ces points de dilutions, on observe une parfaite linéarité avec un excellent coefficient de détermination $R^2=0,9996$ (Figure 54).

La formule du calcul de la quantité d'anticorps fixée, à partir de la MFI obtenue est la suivante : **Quantité (pg/bille) = [MFI (10^3) x 0,0551] + 0,0263**

Cette formule est valable pour les MFI variant de 5 à 90.10³ (domaine de linéarité).

H. Identification des auto-Ac antiplaquettaires

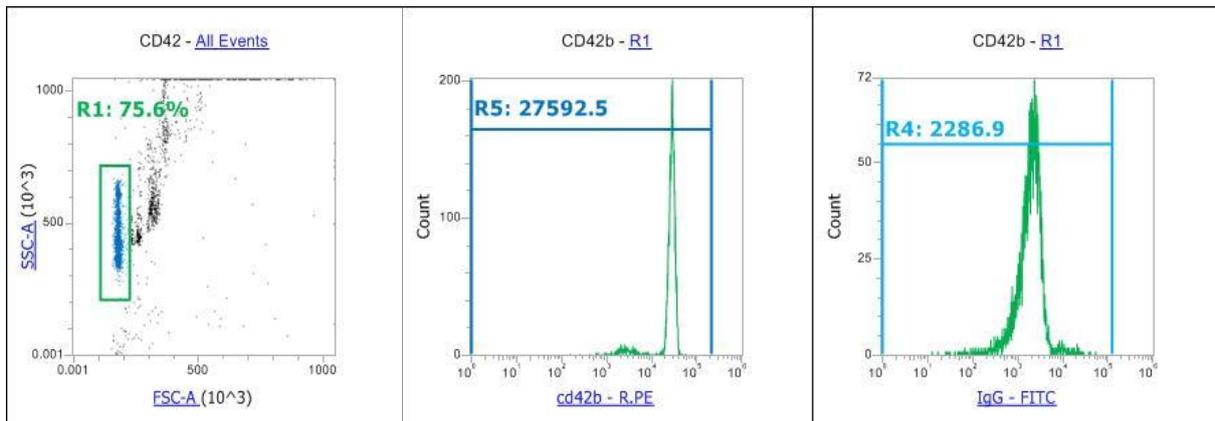


Figure 55: Exemple de recherche directe de l'anti-CD42b (GPIb) chez un témoin

La présence de la fluorescence PE à une intensité de 27592 est le témoin de la bonne solubilisation des plaquettes et la fixation de leur mousse CD42b PE à la surface des billes de capture. La MFI du goat anti-IgG était négative dans ce cas à 2286 (Figure 55).

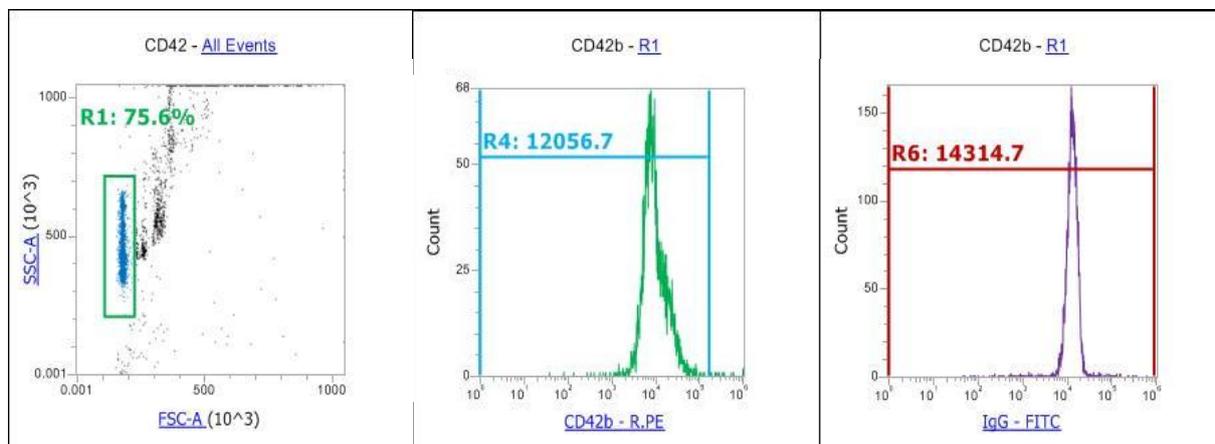


Figure 56: Exemple d'identification de l'anti-CD42b chez un patient PTI

La MFI du signal du CD42b obtenu sur les billes de capture était positive à 12056. La MFI IgG était également positive à 14314, témoignant la présence des anticorps d'isotype IgG fixés à la GPIb plaquettaire du patient.

I. Calibration d'un nouveau lot de réactif

Le même lot de réactif anti-IgG FITC (réactif 1) et anti-IgM FITC a été utilisé pour l'ensemble des patients et témoins inclus dans cette étude. Par ailleurs, durant notre étude un nouveau lot de réactif anti-IgG (réactif 2) a été reçu, ci-dessous les caractéristiques des deux lots :

Tableau 46: caractéristiques des réactifs anti-IgG

	Réactif 1	Réactif 2
Description	Goat F (ab') ₂ anti-Human IgG (gamma) FITC	Goat F (ab') ₂ anti-Human IgG (gamma) FITC
Référence	H10101C	H10101C
Lot	2077094	2243637
Format	Conjugué	Conjugué
Concentration d'Ac	0,4 mg/ml	0,5 mg/ml
Concentration en protéines	4,4 mg/ml	4,5 mg/ml
Marque/origine	Invitrogen-USA	Invitrogen-USA

1. Comparaison des MFI-IgG

Un dépistage direct des PAIg a été réalisé par les deux réactifs, chez 10 témoins normaux, avec les mêmes réglages présentés ci-dessus (page 67).

Tableau 47: MFI-IgG par les deux réactifs

		<i>Effectif</i>	<i>Moyenne</i>	<i>Minimum</i>	<i>Maximum</i>	<i>Sig T test</i>
<i>MFI IgG</i> <i>10³</i>	<i>Réactif 1</i>	10	2,1	0,98	3,1	<i>10⁻¹²</i>
	<i>Réactif 2</i>	10	24,4	12,1	38,6	

La MFI-IgG, obtenue par le nouveau lot (réactif 2), est très élevée par rapport à l'ancien lot (réactif 1). Cette différence est statistiquement très significative.

2. Variation des MFI selon le voltage du PMT

Une étude de la variation de la MFI-IgG selon le voltage du PMT du canal BL1 a été effectuée, en utilisant les deux lots du réactif avec la même suspension plaquettaire d'un témoin normal.

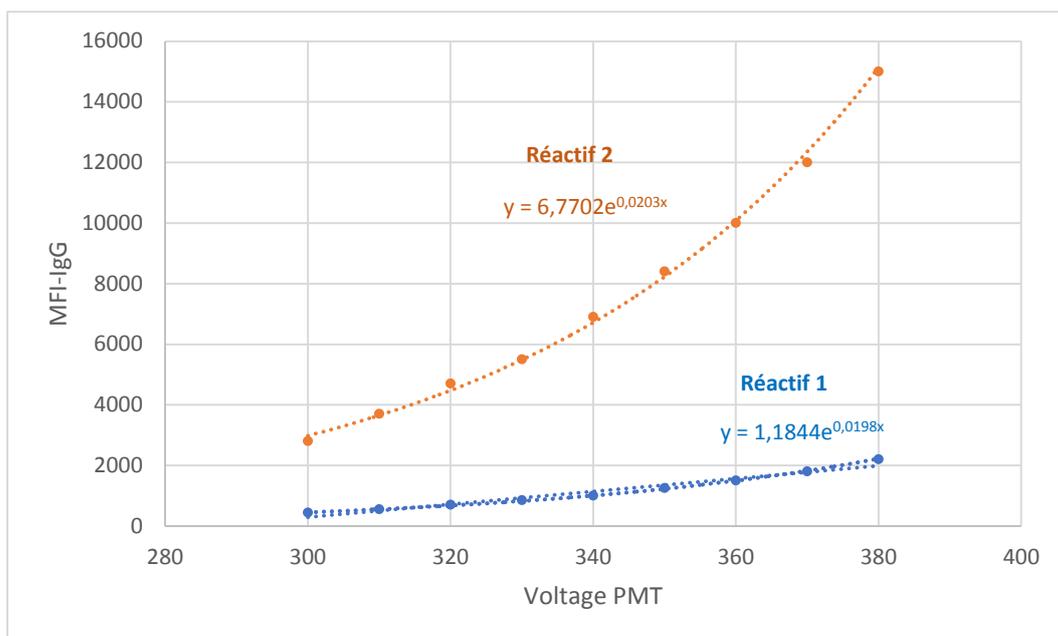


Figure 57: variation de la MFI selon le voltage PMT

Les MFI-IgG augmentent avec l'augmentation du voltage du PMT (BL1) pour les deux réactifs, en suivant une courbe exponentielle, avec un facteur exponentiel très similaire, $e^{0,0198x}$ pour le réactif 1 et $e^{0,0203x}$ pour le réactif 2. Cependant, les valeurs du réactif 2 sont nettement supérieures à celles du réactif 1 (Figure 57).

On rappelle que le voltage PMT-BL1 utilisé avec le réactif 1 dans l'évaluation de la technique PAIg était à 380, à cette valeur la MFI obtenue par le lot1 était à 2200, tandis que la MFI du lot2 était beaucoup plus élevée à 15000 environ (Figure 57).

3. Corrélation entre les deux réactifs

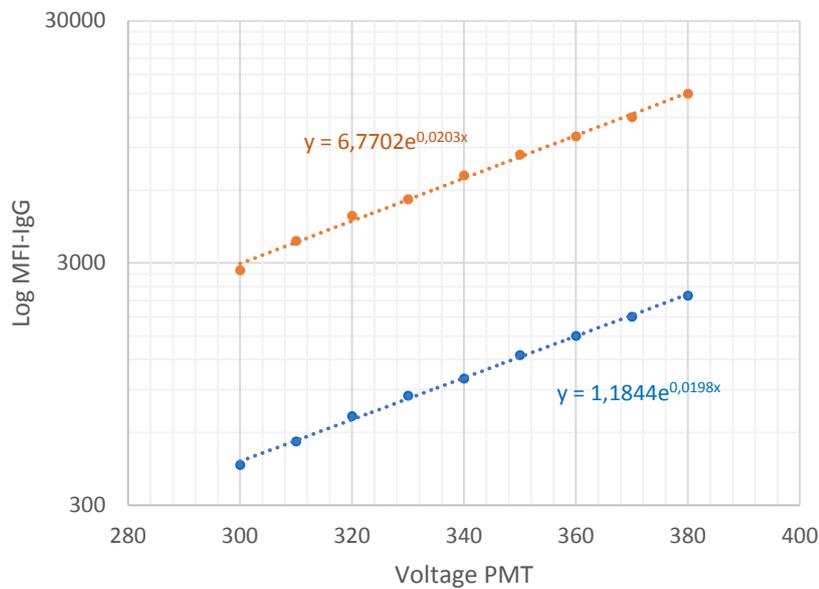


Figure 58: Comparaison MFI des deux réactifs

La représentation graphique des résultats MFI obtenus par les deux réactifs selon le voltage du PMT BL1, sur une échelle Log-MFI, montre deux courbes parfaitement linéaires et parallèles (Figure 58).

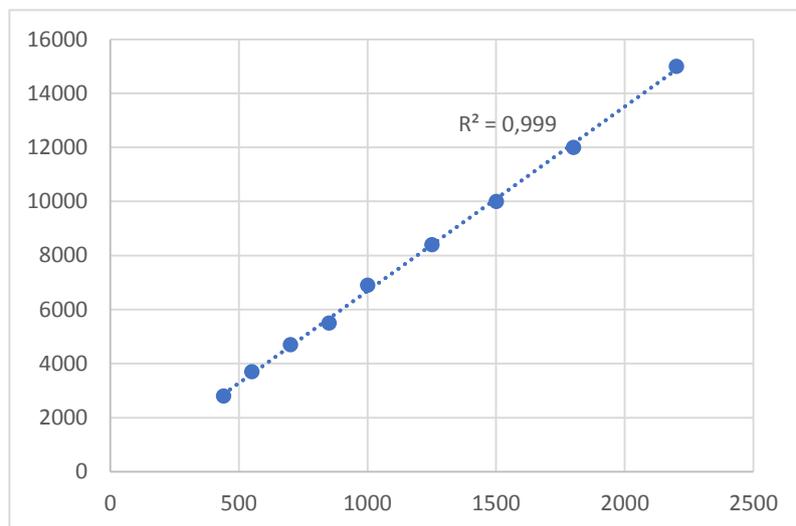


Figure 59: Corrélation entre les valeurs MFI des deux réactifs

On note une parfaite corrélation, entre les valeurs MFI-IgG, obtenues par les deux réactifs selon la variation du voltage PMT. Le coefficient de détermination $R^2=0,999$ (Figure 59).

4. Ajustement du réactif 2

Le voltage du PMT-BL1 a été diminué à 310 pour le réactif 2, tout en gardant les mêmes réglages des autres paramètres de la phase préanalytique et de la préparation de l'échantillon. Le nouveau réglage est appliqué sur une série de 4 patients PTI, 5 témoins thrombopéniques et 6 témoins normaux.

Tableau 48: MFI IgG après calibration du réactif 2

		Effectif	Moyenne	Minimum	Maximum	Sig T test
MFI IgG 10 ³	Réactif 1	15	5,2	1,2	26.4	0,61
	Réactif 2	15	6,4	1,6	32,3	

Les résultats obtenus étaient très similaires entre le réactif 1 utilisé avec un voltage à 380 et le réactif 2 avec un voltage à 310. Les deux séries de valeurs ne sont pas différentes, la P valeur du test T = 0,61.

On note également une concordance totale à 100% entre les deux réactifs : 4 cas positifs IgG (patients PTI) et 11 cas négatifs (témoins).

J. Suivi des patients par la technique PAIg directe

Le test de PAIg par méthode directe a été réalisé à plusieurs reprises chez 11 patients. Tous ces patients présentaient un PTI avec un test PAIg positif au moment du diagnostic. Une à plusieurs d'autres recherches de PAIg ont été effectuées selon l'évolution de la pathologie : rémission, rechute ou persistance de la thrombopénie. Les principales caractéristiques et résultats sont reportés dans le (Tableau 49)

Le test PAIg est considéré comme concordant avec le taux de plaquettes dans les situations suivantes :

- Cas de thrombopénies à moins de 100G/L avec Une MFI IgG et/ou IgM supérieur à 4800.
- Cas de taux de plaquettes supérieur à 100G/L avec une MFI IgG et/ou IgM inférieur à 4800.

Tableau 49: Suivi des patients PTI

Patient	Forme du PTI	Nombre de tests PAIG	Cas de taux des plaquettes		Concordance du taux des plaquettes avec le test PAIG (%)
			Diminué	Normal	
1	PTI aiguë + réponse au TRT	3	2	1	100%
2		2	1	1	100%
3	PTI réfractaire Rechute après plusieurs semaines de rémission	3	2	1	100%
4		5	3	2	100%
5		4	2	2	100%
6		5	2	3	80%
7	PTI Chronique Résistant au TRT	3	3	0	100%
8		5	5	0	80%
9		3	3	0	100%
10		2	2	0	100%
11		4	4	0	100%
Total		39	29	10	94,8%

Les 11 patients PTI bénéficiant d'un suivi par le test PAIg (2 à 5 déterminations) sont répartis en trois principaux groupes (Tableau 49) :

- Deux patients présentant un PTI en forme aiguë : répondant bien au traitement par corticoïdes, où un test diagnostique a été effectué au moment de la phase aiguë et puis une autre détermination après normalisation du taux de plaquettes.
- Quatre patients présentant des PTI cortico-dépendant : Des tests PAIg ont été réalisés durant les phases de thrombopénies et les phases de normalisation du taux de plaquettes.
- Cinq patients présentant des PTI chroniques : résistants aux traitements pour lesquels plusieurs tests PAIg ont été effectués.

Au total, 39 tests PAIg effectués chez les 11 patients. Le taux global de concordance du test avec le chiffre des plaquettes était à 94,8% (Figure 60). Deux tests parmi les 39 étaient non concordants ; le patient N°6 avait un test positif où le taux de plaquettes était à 162 G/L et la MFI était faiblement positive (IgG=2700 IgM=5100) ; le patient N°8 avait un test faux

négatif où le taux de plaquettes était à 62 G/L et la MFI était négative (IgG=1920, IgM=2450) (Figure 60).

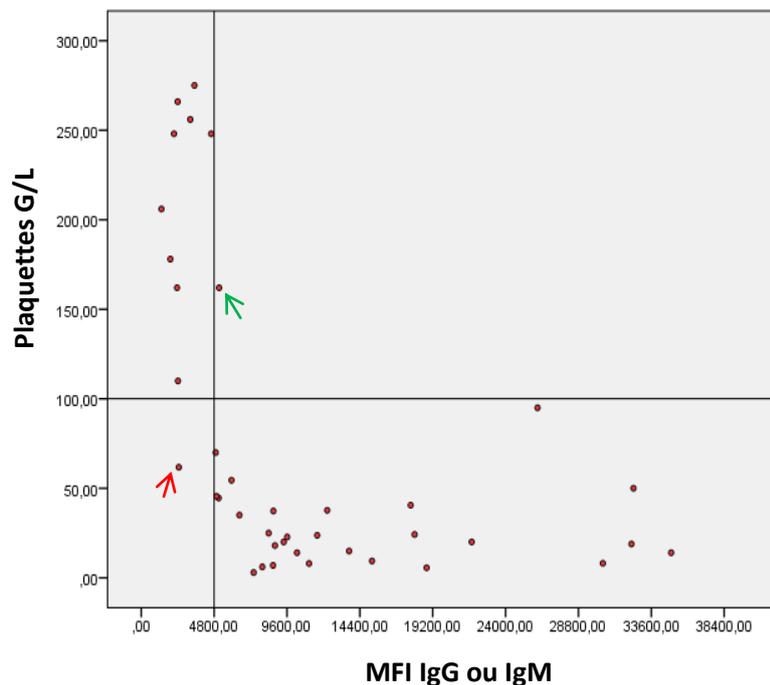


Figure 60: Concordance PAIg et taux des plaquettes

Tous les cas de thrombopénies inférieures à 100G/L présentant une MFI supérieure à 4800 à l'exception d'un seul cas (flèche rouge)

Tous les cas de taux normaux en plaquettes présentant une MFI inférieure à 4800 à l'exception d'un seul cas (flèche verte)

1. Présentation d'un cas de suivi de PAIg

Les résultats de la technique PAIg directe d'un suivi réalisé chez une patiente âgée de 25 ans présentant un PTI réfractaire, est présenté dans la (Figure 61). Le test a été effectué trois fois, la première détermination au moment du diagnostic en septembre 2020, le taux de plaquettes était à 15 G/L (Figure 61-A). La deuxième détermination en octobre 2020, après corticothérapie et normalisation des plaquettes à 162 G/L (Figure 61-B). La troisième détermination en janvier 2021 après une rechute avec un taux de plaquettes à 14 G/L.

Le test était positif en IgG et négatif IgM. La MFI IgG était largement supérieure à 4800 dans les deux cas de thrombopénies, et négative (<4800) dans le cas du taux normal de plaquettes. On note également un aspect des plaquettes altérées sur les histogrammes FSC/SSC dans les deux cas de thrombopénies, en revanche l'aspect des plaquettes est plus intact dans le cas du taux normal.

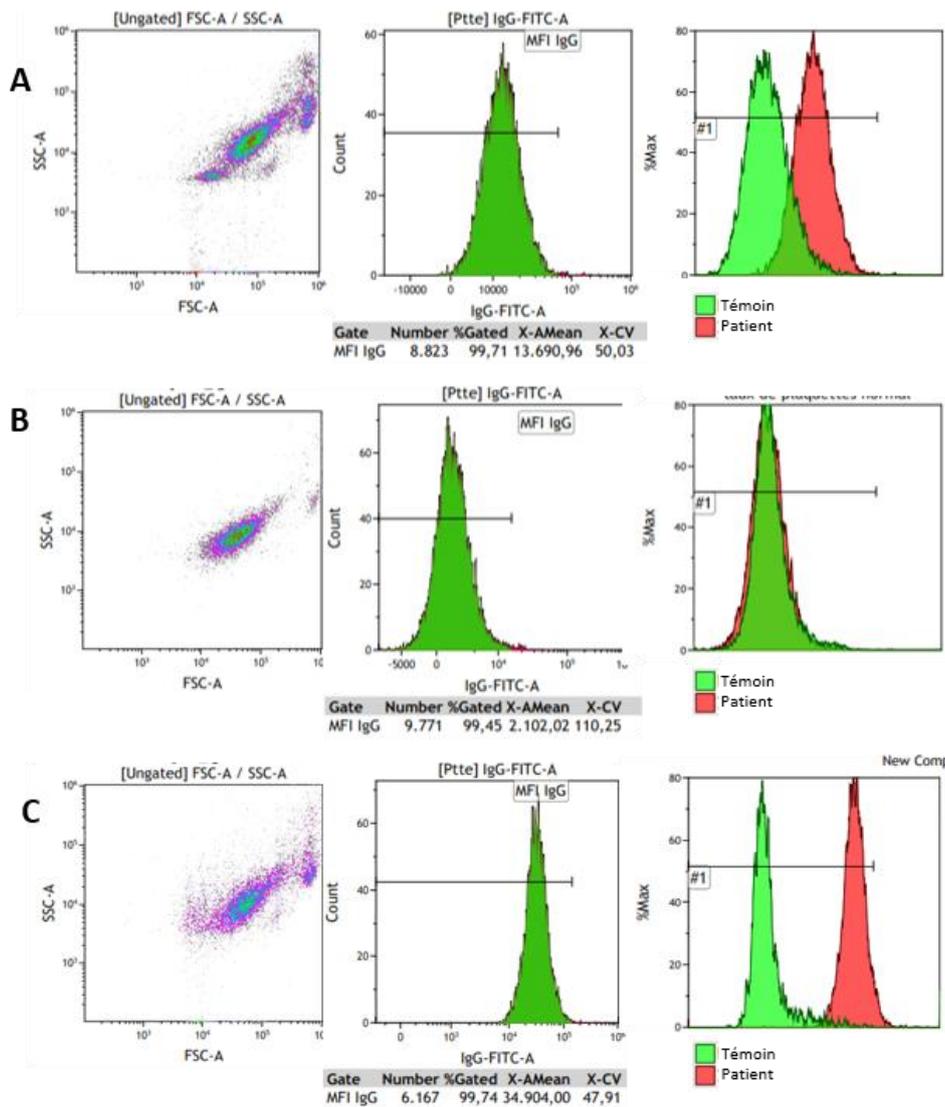


Figure 61: Tests PALg réalisés chez une patiente présentant un PTI réfractaire

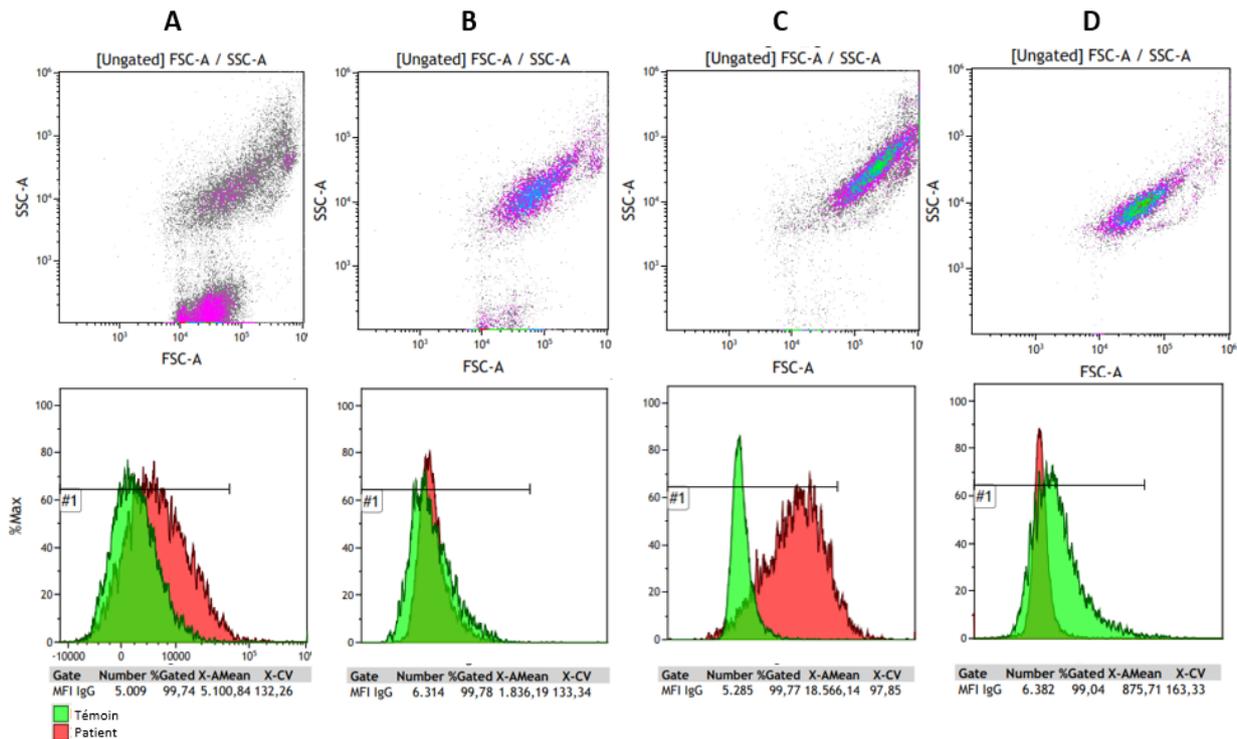


Figure 62: Suivi d'un PTI réfractaire

Sur la (Figure 62), sont présentés les résultats de quatre tests PAIg, d'un enfant de 6 ans présentant un PTI réfractaire.

Le taux de plaquettes à l'admission était à 12G/L, l'enfant a été mis sous gamma globulines, 24 heures après, le taux de plaquettes de contrôle était à 44G/L où nous avons réalisé le test à ce moment-là, il est présenté dans la Figure 62-A, on note un aspect altéré des plaquettes sur l'histogramme FSC/SSC avec une MFI IgG positive à 5100.

48 heures après la prise des gamma globulines, le taux de plaquettes augmente à 110G/L, il est présenté dans la (Figure 62-B), on note une nette amélioration de l'aspect des plaquettes sur l'histogramme FSC/SSC et une MFI IgG négative à 1836.

14 jours après la première prise des gamma globulines, l'enfant revient avec un syndrome hémorragique et un taux de plaquettes à 20G/L. Le test PAIg est présenté dans la figure (Figure 62-C). Sur l'histogramme FSC/SSC, on note la présence des plaquettes de très grande taille, la MI-FSC était à 201000, ce qui correspond à une taille plaquettaire moyenne de 5,7 μ m. On note également la présence de plaquettes géantes dont la taille atteint 13 μ m. La MFI IgG était fortement positive à 18566.

L'enfant a été mis à nouveau sous gamma globulines, et un contrôle a été effectué après 20 jours. Le résultat est présenté dans la (Figure 62-C). Le taux des plaquettes était normal à

206 G/L, et on note sur l'histogramme FSC/SSC un aspect intact des plaquettes avec une taille normale. La MFI IgG était négative à 875.

Par ailleurs, la recherche des IgM était négative dans les quatre tests effectués pour cet enfant.

K. Application de la technique PAIg dans des cas d'allo immunisation plaquettaire

Les techniques de recherche directe et indirecte des PAIg ont été appliquées sur des cas de forte suspicion d'allo-immunisations antiplaquettaires fœto-maternelles. Les résultats des deux cas analysés durant cette étude sont présentés ci-dessous, sachant qu'ils ne sont pas inclus dans la série des patients PTI analysés et présentés ci-dessus.

1. Cas N°1 : Thrombopénie néonatale

Il s'agit d'une nouveau-née à J8, présentant un syndrome hémorragique fait de pétéchies à J2. La NFS objective une thrombopénie à 18 G/L, le frottis sanguin est très pauvre en plaquettes et le médullogramme met en évidence une moelle pauvre en mégacaryocytes. Le bilan infectieux et les sérologies virales sont négatifs.

Dans les antécédents obstétricaux de la maman, on note dans l'ordre chronologique :

- Une fille âgée de 5 ans qui ne présente pas de pathologie.
- Un nouveau-né décédé (hydrocéphalie).
- Un enfant décédé à l'âge de 17 jours, suite à une hémorragie cérébrale sur une thrombopénie sévère, il y a 11 mois.

Les NFS des deux parents sont correctes avec des taux des plaquettes normaux. Un prélèvement de la nouveau-née et un autre de la mère sur des tubes EDTA ont été effectués pour des tests PAIg directs sur les plaquettes des deux prélèvements, et un test indirect sur le prélèvement de la nouveau-née.

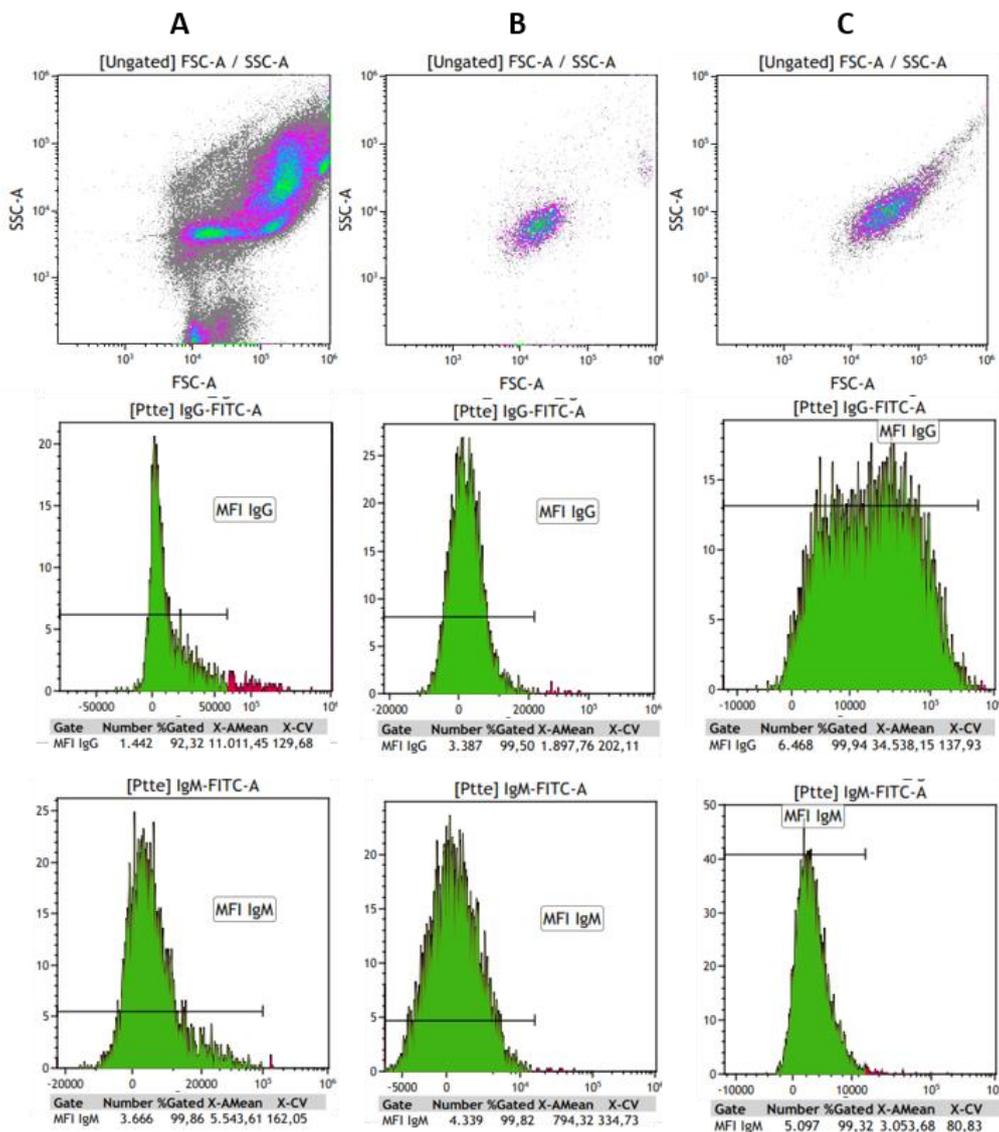


Figure 63: Tests PAIg dans le cas d'une thrombopénie néonatale

Le dépistage direct des PAIg chez la fille (Figure 63-A) montre la présence des anticorps antiplaquettes d'isotype IgG à titre élevé (MFI=11011), et un faible titre d'anticorps d'isotype IgM (MFI=5543).

Le dépistage indirect des PAIg a été réalisé en incubant les plaquettes de la mère (Figure 63-B) d'une part, et des plaquettes d'un témoin isogroupe ABO d'autre part (Figure 63-C), avec le plasma de la fille. On note l'absence d'anticorps dirigés contre les plaquettes de la mère (MFI IgG=1897 IgM=794), en revanche un titre très élevé d'anticorps IgG dirigé contre les plaquettes du témoin. Les anticorps d'isotype IgM étaient négatifs pour les deux.

Un dépistage direct, réalisé également chez la mère, est revenu négatif (absence d'anticorps IgG et IgM fixés).

2. Cas N°2 : Allo-immunisation fœto-maternelle

Il s'agit d'une femme âgée de 33 ans, mère de deux enfants, en bonne santé sans antécédents pathologiques. L'historique des grossesses est le suivant :

- 1^{re} grossesse en 2018 : RAS, enfant de sexe masculin en bonne santé.
- 2^{ème} grossesse en 2020 : décès à J2, syndrome hémorragique + anémie sévère.
- 3^{ème} grossesse en 2020 : naissance avec un syndrome hémorragique (hématome sous-dural), anémie à 4 g/dl + thrombopénie.

Le bilan biologique du deuxième enfant à J20 : Ptte=7 G/L, Hb=12,6 g/dl, rétic=67.10³/mm³. Le médullogramme était riche, objectivant une forte richesse en mégacaryocytes +++, avec un excès de cellules immatures à 08%.

L'enfant a été mis sous traitement : Antibiotique + Gamma globuline + HHC 8 mg/kg/j.

Des prélèvements du sang total sur tubes EDTA ont été effectués pour la patiente et son mari. Le test direct PAIg est réalisé sur les plaquettes de la patiente et son mari. Cinq recherches indirectes des PAIg sont réalisées en incubant dans le plasma de la patiente, les plaquettes de son mari, et les plaquettes de quatre autres témoins normaux isogroupes. La patiente et son mari sont les deux du groupe sanguin O⁺.

Le test direct PAIg chez la patiente était négatif (MFI IgG=1751 IgM=3272) (Figure 64-A), il était également négatif chez son mari (MFI IgG=1218 IgM=1438) (Figure 64-B).

La recherche indirecte des anticorps antiplaquettes sériques, présents au niveau du plasma de la patiente (Figure 64-C), a été réalisée en incubant les plaquettes du mari avec le plasma de la patiente. On remarque le changement de l'aspect des plaquettes du mari sur l'histogramme FSC/SSC après leur incubation avec le plasma de la patiente. En outre, le test indirect était positif, on note une fixation des IgG à la surface des plaquettes du mari (MFI IgG=7416).

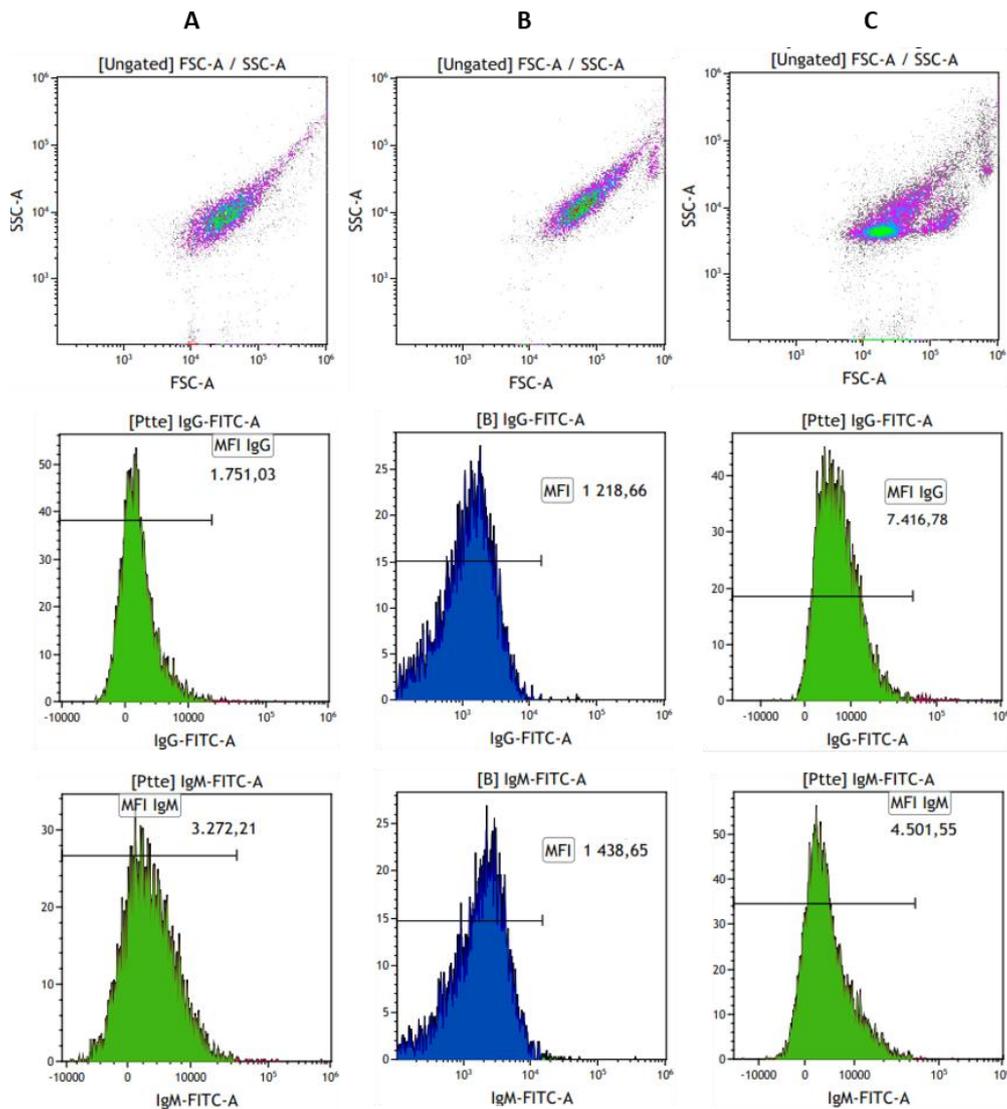


Figure 64: PAIG cas d'allo-immunisation fœto-maternelle

La recherche indirecte des anticorps antiplaquettes a été réalisée également chez le mari. Dans cette épreuve le plasma du mari a été incubé avec les plaquettes de la patiente. Le résultat était négatif.

La recherche des anticorps antiplaquettes sériques par le test PAIg indirect montre la présence d'anticorps sériques d'isotype IgG, réagissant avec les plaquettes de quatre témoins normaux isogroupes (Figure 65). Les MFI IgG obtenues après incubation avec le plasma de la patiente sont très élevées (21 à $34 \cdot 10^3$), cependant les MFI IgG obtenues après incubation avec le plasma d'un témoin 5 isogroupe sont tous négatifs (<4800).

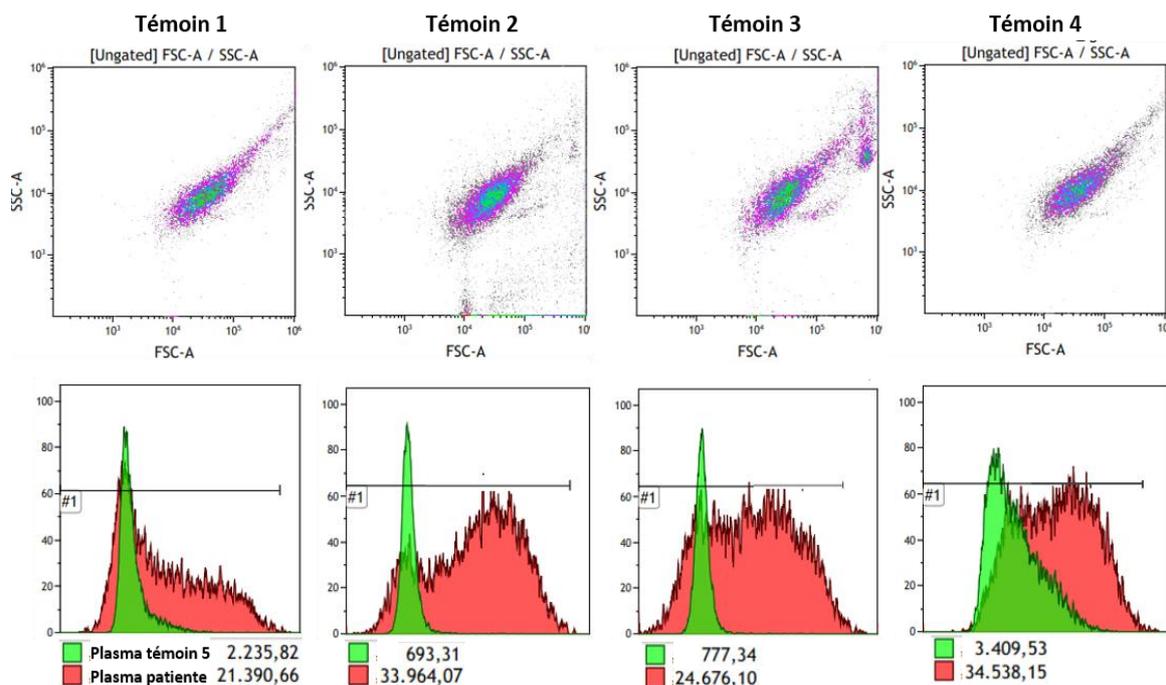


Figure 65: Allo-immunisation fœto-maternelle, dépistage des IgG sériques

En vert : la MFI IgG obtenue en incubant les plaquettes du témoin avec le plasma d'un témoin 5

En rouge : la MFI IgG obtenue en incubant les plaquettes du témoin avec le plasma de la patiente

Les présentes observations et résultats sont en faveur d'une allo-immunisation antiplaquettaire très probable, dont les plaquettes du mari représentent une cible des anticorps sériques de la patiente.

L. Estimation du coût et du temps nécessaire à la réalisation de la technique PAIg par CMF :

Le coût de la réalisation d'une recherche directe ou indirecte des anticorps antiplaquettes par cytométrie en flux (Tableau 50) a été estimé pour un test comportant un échantillon à analyser plus un témoin.

L'évaluation du coût unitaire des réactifs et du consommable, a été faite sur la base des prix figurants sur la facture de notre fournisseur pour l'année 2021.

Tableau 50: Coût des réactifs et consommables utilisés dans le test PAIg par CMF

Réactif/Consommable	Quantité d'une prise d'essai	Cout DA	Nombre de prises d'essais	Total DA
F(ab') ₂ -Goat anti-Human IgG, FITC 1ml	2 µl	231,78	2	463,56
F(ab') ₂ -Goat anti-Human IgM, FITC 1ml	1,5 µl	165,75	2	331,5
CD41a Monoclonal Antibody (HIP8), PE	1 µl	130,64	2	261,28
CD 42b Monoclonal Antibody (HIP1), PE	1 µl	181,21	2	362,42
Consommable :				
- Focussing Fluid				
- Solution Attune Shut down				
- Solution Atunne wash	/	281	/	281
- SAGManitol				
- PBS				
- Tube EDTA				
			Total	1699,76 DA

Le coût total d'un dépistage direct des PAIg pour un seul échantillon est estimé à **1699,76DA**. En cas d'analyse d'une série d'échantillons, le coût sera plus réduit. Par exemple, en cas d'analyse de deux échantillons, on utilise un seul témoin pour les deux, le coût du test global sera estimé à 2550 DA, soit **1275 DA** pour chaque échantillon.

Le temps minimal nécessaire à la réalisation d'un test direct des PAIg, depuis la réception de l'échantillon, est estimé à **75 minutes**. Le test indirect nécessite plus de temps, il est estimé à **130 minutes** au minimum.

IV. DISCUSSION

Le PTI, est une pathologie qui touche toutes les tranches d'âge, il est caractérisé par une chute brutale du taux de plaquettes circulantes dans ses formes aiguës (thrombopénie aiguë), ou bien par une diminution chronique de la numération plaquettaire qui peut persister plusieurs années voire toute la vie.

La symptomatologie est en relation directe avec le taux de plaquettes résiduelles dans la circulation, en général un taux supérieur à 50 G/L est toujours asymptomatique, la découverte de la pathologie dans ce cas est souvent fortuite, lors d'un bilan systématique.

Le mécanisme de destruction des plaquettes dans le cas du PTI, est le même que celui de la destruction des hématies au cours de l'anémie hémolytique auto-immune (AHAI), bien que le test de Coombs direct, représente un examen très simple, sensible, reproductible et adapté à l'usage en routine dans le diagnostic de l'AHAI, il n'a pas son équivalent pour les plaquettes et le PTI. Malgré les nombreux essais du développement d'un test de Coombs plaquettaire, durant ces dernières décennies, aucun d'entre eux n'a rempli tous les critères en matière de : sensibilité, spécificité, simplicité, rapidité et adaptation à l'usage en routine.

Le diagnostic du PTI, en absence d'un test biologique suffisamment puissant pour confirmer la pathologie, reste jusqu'à maintenant, un diagnostic d'exclusion selon les directives de l'ASH de 2011 et la mise à jour de 2019^(13, 298). Il est donc établi par élimination de toutes les autres causes possibles de thrombopénies, qui sont très multiples et divergentes, où le clinicien doit réaliser toute une série d'examens cliniques, radiologiques et biologiques, afin d'arriver au diagnostic final d'un PTI. Ces examens sont parfois invasifs, coûteux et très longs.

A. Les performances du diagnostic actuel du PTI

L'évaluation des performances du diagnostic d'exclusion, montre certaines insuffisances. Le registre du PTI « McMaster », mis en place au Canada, a montré que 36 sur 295 (12,2%) patients adultes initialement diagnostiqués PTI, ont été jugé de ne pas avoir un PTI au cours du suivi ; en outre, 10 patients parmi 310 (3,1%), initialement diagnostiqué avec d'autres causes de thrombopénie ont finalement été reclassées en patients atteints du PTI⁽¹¹⁾. On note également dans une grande cohorte rétrospective sur 10 ans, menée à l'hôpital pédiatrique d'Alabama-USA, sur 492 enfants/adolescents âgés de 0 à 18 ans diagnostiqués initialement PTI, le diagnostic final était différent pour 70 patients (soit 14% des cas)⁽¹²⁾. Il a été également démontré récemment chez des patients suivis et traités pendant plusieurs années pour un PTI réfractaire (7 patients sur 29) qu'ils présentaient un désordre héréditaire touchant des gènes connus pour être associés à la thrombopénie (Ankrd26, ETV6, ITGA2B, TUBB1)⁽³⁶⁰⁾. Dans une autre étude française portée sur les patients atteints de purpura

thrombotique thrombopénique (PTT), sur 423 patients, 43 (10%) avaient un diagnostic initial du PTI ou syndrome d'Evans, ce qui a causé un retard considérable dans l'instauration du traitement adéquat⁽³⁶¹⁾. Dans l'ensemble, ces données montrent que les performances du diagnostic clinique du PTI (exclusion des autres causes) ne sont pas suffisantes, et qu'un test diagnostique plus fiable serait très utile⁽³⁶²⁾.

La cytométrie en flux, après son développement à partir des années 70, et sa large utilisation dans les laboratoires d'analyses médicales actuellement, est considérée comme une technique très prometteuse, dans le domaine de développement d'un test de Coombs plaquettaire. La cytométrie en flux, associée à l'immunofluorescence, peut mettre en évidence les auto-anticorps antiplaquettes, chez les patients PTI, ainsi l'identification de la cible de ces auto-anticorps (GP membranaire), améliore la spécificité de cette technique, donc elle pourra confirmer l'origine auto-immune de la thrombopénie, et permettra l'instauration du traitement le plus tôt possible. La possibilité de quantification des auto-anticorps par la cytométrie en flux est un moyen très fort, qui permettra le suivi de la réponse des patients au traitement.

Dans la présente étude, la technique de dépistage direct et indirect des PAIg par cytométrie en flux a été appliquée et ensuite ses performances analytiques ont été évaluées. Toutes les modifications et les améliorations nécessaires ont été apportées, afin d'optimiser la technique selon les conditions et les spécificités de notre laboratoire et de notre population, dans la perspective d'obtenir une technique performante, rapide, facile, non couteuse et applicable en routine comme un moyen utile dans la démarche diagnostique et de suivi du PTI. En réalité notre étude était divisée en deux principales étapes :

- Une phase d'optimisation de la technique : durant cette phase nous avons ajusté les principaux paramètres préanalytiques et analytiques, pouvant influencer le résultat final à savoir : le mode de recueil des échantillons témoins et patients ; la méthode de préparation des plaquettes ; le choix des anticorps et le mode d'interprétation (nous allons discuter tous ces paramètres ci-dessous).
- Une phase d'application des réglages ; collecte des échantillons et enregistrement des données.

B. Données épidémiologiques

La population des patients inclus dans cette étude est constituée de 102 individus, présentant un PTI remplissant les critères diagnostiques des directives de L'ASH 2011 et 2019 (diagnostic d'exclusion). Il est à noter que durant la phase d'optimisation de la technique 23 patients PTI ont été étudiés, ces patients n'ont pas été analysés dans les mêmes conditions ni par les mêmes réglages que ceux utilisés pour les 102 patients suivants. Donc ils ne sont pas inclus dans l'étude.

La collecte des patients a été faite au niveau de deux services d'hématologie (hôpital militaire et CHU-Constantine) et un seul service de pédiatrie (hôpital militaire). On note une prédominance féminine, le sexe-ratio femme/homme était à 1,75/1. Cette prédominance féminine est décrite en 1999 dans une cohorte danoise avec un sexe ratio femme/homme similaire à 1,7⁽³⁶³⁾, et également chez une population américaine en 2006 avec un sexe ratio à 1,9⁽²⁷¹⁾, et dans une population britannique en 2003 à 1,2⁽³⁶⁴⁾ et dans une autre cohorte plus grande en 2009 à 1,3, mais sans différence significative d'incidence entre les hommes et les femmes dans cette dernière⁽³⁶⁵⁾.

L'âge moyen de nos patients était 30 ans, avec des extrémités allant de 1 mois jusqu'à 80 ans, la répartition de la population en tranches d'âges montre un pic à l'âge adulte (18 à 50 ans) représentant 48% de nos patients. Deux grandes études européennes, l'une française et l'autre britannique, ont révélé une distribution en deux pics, un pic à l'enfance entre 1 et 5 ans, et un autre pic majeur à l'âge supérieur à 60 ans^(272, 365). Nos résultats ne peuvent pas être comparés aux études épidémiologiques de la littérature, vu que la présente est une étude cas témoin, dont la méthode de sélection des patients ne permet pas de tirer des informations épidémiologiques solides sur la répartition de la pathologie selon l'âge et le sexe.

Environ 60% de notre population est constituée de patients nouvellement diagnostiqués, le reste des cas étaient des cas de PTI persistant entre 3 et 12 mois (25,5%) et des cas de PTI chronique de plus de 12 mois (14,5%). Parmi les 61 nouveaux cas de PTI, il y avait 10 cas de passage à la chronicité et 18 cas de réponses précoces ou initiales. Cependant on note l'absence de retour d'information pour les 33 cas restants. Le PTI est une pathologie qui a tendance au passage à la chronicité, dans une méga cohorte française en 2014, sur 2333 cas de PTI primaire nouvellement diagnostiqués, on a observé un passage en forme persistante ou chronique dans 1556 cas (soit 66,7%)⁽²⁷²⁾.

Le groupe international d'étude du PTI (International Working Group IWG), en collaboration avec la société américaine d'hématologie (ASH), ont publié les premières « guideline » du PTI en 2011 et puis des mises à jour en 2018 et 2019^(13, 298, 299), dont le traitement de première ligne consiste à la mise sous corticostéroïdes (prednisone ou dexaméthasone) et/ou les IV-Ig. Dans notre population, on note un taux d'usage des corticostéroïdes à 63,7% (65 patients). En revanche l'utilisation des gamma globulines était à 20,5%, et réservée uniquement aux enfants. Les fréquences de mise sous corticostéroïdes dans deux grandes études, l'une britannique⁽³⁶⁵⁾ en 2009 et l'autre Américaine⁽²⁷¹⁾ en 2006, étaient respectivement à 34,6% et 27%. Cependant dans les études les plus récentes, les fréquences d'utilisation des corticostéroïdes soient seules ou en association avec les IV-Ig étaient similaires à notre population, on cite un taux de 84% selon Grimaldi et al⁽³⁶⁶⁾ en 2016 ; 73% selon Palau et al⁽³⁶⁷⁾ en 2017 et 61% selon Lee et al⁽³⁶⁸⁾ en 2017. Le recours à la

splénectomie dans la prise en charge du PTI, est estimé à un taux de 3 à 6 % des patients PTI^(365, 367, 368), dans notre série on n'a aucun cas de splénectomie.

Le taux moyen de plaquettes de nos patients était 31,36 G/L, avec des extrémités allons de 3 à 93 G/L. Le taux de plaquettes constitue le principal facteur de risque de saignement, ainsi un syndrome hémorragique cutané et muqueux est observé à partir d'une diminution du taux de plaquettes au-dessous de 20 G/L^(9, 353), mais le risque de tout type d'hémorragie provoquée ou spontanée est observé à partir d'un taux inférieur à 50 G/L. On a 52 patients présentant un taux de plaquettes inférieur à 20 G/L, et 79 ayant un taux inférieur à 50 G/L, soient des pourcentages de 51% et 77% respectivement. Dans l'étude de Grimaldi 2016⁽³⁶⁶⁾, sur 188 patients PTI, 69% avaient un taux de plaquettes < 20G/L, tandis que pour Frederiksen 1999⁽³⁶³⁾, sur 221 patients PTI, 81% avaient un taux de plaquettes < 50 G/L.

C. Optimisation de la technique PAIg

L'optimisation de la technique a été effectuée au début de notre travail, durant cette phase 23 patients PTI, 35 témoins sains et 3 témoins thrombopéniques non PTI ont été analysés. Durant cette phase on a testé, modifié et ajusté tous les variables pré-analytiques et analytiques, pour arriver enfin, au réglage final qui a été ensuite appliqué sur nos populations (patients et témoins), ces réglages sont présentés ci-dessous.

1. Patients et témoins

Nos critères de sélection de la population des patients répondent à toutes les directives de l'ASH de 2011⁽²⁹⁸⁾ et ses mises à jour de 2018⁽²⁹⁹⁾ et 2019⁽¹³⁾. En effet, il n'existe pas à nos jours, un test biologique « Gold Standard », permettant de confirmer le diagnostic de la thrombopénie immunologique^(7-9, 298). La sélection de nos patients était donc basée sur l'élimination de toutes les causes secondaires de la thrombopénie.

La thrombopénie est confirmée sur deux prélèvements successifs plus un frottis sanguin pour les nouveaux cas, ce qui permet d'éliminer les fausses thrombopénies par agrégation plaquettaire ou bien par macrothrombopathie. En absence d'un « Gold standard », on s'est basé sur la réponse des patients aux traitements de première ligne (corticoïdes et IV-Ig). Une augmentation du taux de plaquettes au-dessus de 30 G/L où un dédoublement du taux de plaquettes de base après la mise sous traitement constitue une preuve solide d'un mécanisme immunologique de la destruction plaquettaire. Dans notre étude, on a inclus les patients ayant une réponse aux traitements qu'elle soit précoce, initiale, tardive ou bien, lente.

Bien que le taux normal des plaquettes dans le sang est au-dessus de 150 G/L, le choix du seuil du taux de plaquettes à 100 G/L pour la réalisation du test PAIg est très important pour les raisons suivantes :

- Les patients présentant un taux de plaquettes entre 100 et 150 G/L, ont uniquement 6,9% de chance de développer une thrombopénie persistante à moins de 100G/L dans 10 années⁽¹⁰⁾.
- Pour certaines ethnies, la valeur normale minimale des plaquettes est physiologiquement entre 100 et 150G/L.
- Cette valeur seuil réduit le problème de diagnostic différentiel avec les thrombopénies physiologiques modérées comme dans le cas de la grossesse. La recherche des anticorps antiplaquettes était toujours négative, dans le cas des thrombopénies gestationnelles, dont le taux des plaquettes est situé entre 100 et 150 G/L⁽³⁶⁹⁾.
- La sensibilité de détection des anticorps est inversement proportionnelle à la numération plaquettaire, en 1996, Brighton⁽³⁷⁰⁾ a trouvé une intensité des anticorps détectée par MAIPA plus élevée chez les patients présentant une thrombopénie sévère. Ceci a été également démontré par Warner en 1999, où la technique de capture des antigènes spécifiques (MACE) était négative chez les patients PTI avec un taux de plaquettes supérieur à 100G/L. Dans notre étude il a été mis en évidence une relation statistiquement significative entre le taux de plaquettes et la MFI IgG+IgM obtenue. La P-valeur de signification de la corrélation de Pearson était à 0,00043. Donc un taux de plaquettes supérieur à 100 G/L signifie l'absence des anticorps antiplaquettes ou bien leur présence à un titre très faible, qui sera indétectable par la technique de PAIg par CMF.

Le PTI est une pathologie qui passe à la chronicité dans plus de 60% des cas, dont le traitement immunosuppresseur ne permet pas une normalisation du taux des plaquettes. Un taux de plaquettes inférieur à 100 G/L chez un patient PTI sous traitement, signifie que la destruction immunologique des plaquettes est encore active, mais à une intensité plus faible. Dans notre étude on a inclus tous les patients PTI, ayant un taux des plaquettes inférieur à 100 G/L qu'ils soient sous traitement ou non.

Notre population des témoins thrombopéniques est constituée de patients présentant des thrombopénies centrales comme : hémopathies malignes (leucémie aiguë, MDS et aplasie médullaire); insuffisance hépatocellulaire; thrombopathies ou anémie mégalo-blastique. Une partie de ces témoins présentent également des thrombopénies périphériques non immunologiques comme les cas de CIVD ou PTT. Il est à noter que certaines hémopathies malignes, notamment les syndromes lymphoprolifératifs, peuvent être accompagnées d'une thrombopénie secondaire d'origine immunologique avec la présence d'anticorps antiplaquettes.

Durant notre étude on a rencontré, deux cas de syndromes lymphoprolifératifs associés à une thrombopénie immunologique, le premier était un cas de LLC chez un patient de 67 ans en phase chronique, sans aucun signe d'accélération ou d'aggravation de la pathologie, le

deuxième est un patient de 59 ans présentant un myélome multiple. Les deux patients ont présenté une thrombopénie d'installation aiguë avec un médullogramme riche en mégacaryocytes. La recherche des PAIg était positive IgG + IgM pour les deux patients. Les auto-anticorps antiplaquettes sont fréquemment associés aux désordres lymphoprolifératifs, de ce fait on n'a pas inclus les cas des SLP dans notre population des témoins thrombopéniques.

2. Choix d'anticorps et marquage des plaquettes

Pour la mise en évidence des anticorps antiplaquettes d'isotype IgG et/ou IgM, on a utilisé des anticorps secondaires, polyclonaux d'origine « goat » dirigés contre les chaînes lourdes d'immunoglobulines « gamma et mu ». Les deux réactifs sont couplés à l'FITC, la forme de l'anticorps est un fragment F(ab')₂ :

- Anti IgG : F(ab')₂-Goat anti-Human IgG FITC, InvitrogenTM. Deux lots utilisés durant cette étude (2077094 et 2243637).
- Anti IgM : F(ab')₂-Goat anti-Human IgM FITC, InvitrogenTM.

Les anticorps les plus fréquemment utilisés dans la littérature se sont des (Goat anti-human immunoglobulin GAH), couplés à l'FITC^(321, 322, 339, 341, 342, 344, 349, 371). Très peu d'études ont utilisé un panel plus large, contenant l'anti-IgA^(4, 323, 338), ou bien l'anti-Kappa/Lambda⁽³⁴⁰⁾. L'IgG et l'IgM sont largement suffisants pour un dépistage des PAIg, la majorité des PAIg sont d'isotype IgG seul ou en association avec l'IgM ou l'IgA^(336, 339, 340), les formes IgM seules sont moins fréquentes et les IgA seules sont exceptionnelles. Parmi nos 86 patients ayant un test PAIg positif, l'IgG était positif seul ou en association avec l'IgM chez 75 patients (87,2%), l'IgM était positif seul pour 11 patients soit un pourcentage de 12,7%. Rosenfeld⁽³⁴⁰⁾ a rapporté un taux d'IgM seul à 16%, donc on observe clairement une concordance de nos résultats avec celles de la littérature.

Il est recommandé d'utiliser des anticorps secondaires anti-IgG ou IgM, polyclonaux. par l'utilisation des anticorps monoclonaux antiglobuline humaine, on peut détecter seulement 60% des IgG présents à la surface des plaquettes, l'utilisation d'une anti-IgG polyclonale, donne un signal plus puissant, par la détection d'un nombre plus élevé des Ig de surface⁽³³⁹⁾. Ceci s'explique par le fait que les anticorps monoclonaux reconnaissent un seul épitope sur la molécule IgG, cet épitope n'est pas toujours accessible pour l'Ac. Les anticorps polyclonaux sont plus utiles et plus pratiques, car ils reconnaissent plusieurs épitopes sur l'immunoglobuline.

La quantité d'anticorps à rajouter à la suspension plaquettaire doit être bien ajustée afin de ne pas avoir un excès ni un défaut du marquage. Un excès d'anticorps est à l'origine d'une fixation non spécifique et par conséquent d'un signal faux positif. On a procédé au titrage de nos anticorps durant la phase d'optimisation de la technique, le choix de la

quantité optimal de l'anticorps a été validé d'une manière à obtenir le meilleur « stain index » associé au bruit de fond le plus bas possible. On note qu'au moment du changement du lot de réactif les mêmes quantités de marquage ont été gardés, la standardisation des résultats a été obtenue par changement du voltage du canal BL1. Cette approche sera discutée plus bas.

Le contrôle négatif anti-mouse IgG FITC (contrôle isotypique), est utilisé afin de déterminer la fluorescence non spécifique, il est utile lorsque l'interprétation des résultats est faite en pourcentage des plaquettes positives^(336, 338, 340, 343). Dans le cas de l'interprétation en MFI, le contrôle isotypique n'a aucun intérêt. En revanche, un contrôle positif est très utile, il permet de valider un résultat négatif, et donc d'éliminer un faux négatif par erreur technique, son utilisation va améliorer la sensibilité de la technique. Un contrôle positif standard peut être également employé pour la standardisation des résultats, entre cytomètres ; entre des différents réactifs et entre des lots différents du même réactif. Le contrôle positif est un anticorps d'origine humaine dirigé contre un Ag de surface spécifique des plaquettes, Anti-PL^{A1(339, 341)} et Anti-HPA-1a⁽⁶⁾, ces anticorps sont préparés à partir du plasma des sujets immunisés. Leur inconvénient réside dans la non disponibilité et le coût élevé.

3. Acquisition des données et analyse des résultats

L'acquisition des données est faite sur le cytomètre Attune NxtTM, à une vitesse de 100 µl/min qui est considérée comme une vitesse moyenne, par rapport aux vitesses très élevées qu'on peut atteindre dans son système fluide assisté par une sonde acoustique. La stratégie de gating et d'analyse adoptée dans notre travail vise à filtrer les plaquettes en éliminant tous les débris ou les cellules non plaquettaires d'une part, et de neutraliser toute influence possible sur la MFI obtenue d'autre part. Les principales étapes de cette stratégie sont les suivantes (Figure 66) :

- Les plaquettes sont identifiées en premier temps sur un histogramme FSC/SSC. Les plaquettes d'un sujet sain sont bien individualisées et leur sélection de cette façon montre la présence de plus de 90% d'évènements exprimant les différents marqueurs plaquettaires, avec une moyenne de 81,3% d'évènements CD61+/CD41+ dans la population générale des témoins normaux, en incluant le taux des globules rouges résiduels après la préparation de l'échantillon. Cependant pour les patients présentant une thrombopénie immunologique, on observe un taux très élevé des débris plaquettaires, ce qui rend la sélection des plaquettes, très difficile, voire impossible, dans certains cas. Le taux moyen d'évènements CD41+/CD61+ de nos témoins était à 38,6%, significativement très diminué par rapport aux témoins. Inclure les débris cellulaires dans l'analyse, surestime la MFI obtenue et diminue la spécificité de la technique. On note que plusieurs études se sont basées sur les critères de taille et

structure des plaquettes sur l'histogramme FSC/SSC pour la détermination des PAIg^(322, 323, 339, 340, 344), où la spécificité mesurée était très variable de 57% à 81%. Il est indispensable de sélectionner les plaquettes en utilisant un anticorps anti-glycoprotéines spécifiques plaquettaires (CD61, CD41a, CD42b).

- La deuxième étape consiste à l'élimination des doublets plaquettaires sur un histogramme FSC-A/FSC-H. les doublets cellulaires présentent une fluorescence plus élevée par rapport aux cellules individuelles, leur élimination minimise les cas des faux positifs et améliore la spécificité.
- Après l'élimination des doublets, les plaquettes sont mises encore une fois, dans un histogramme FSC/SSC, afin de vérifier leur taille. La présence des plaquettes de grandes tailles et géantes est très fréquente dans les cas des thrombopénies périphériques comme le PTI. L'estimation de la taille des plaquettes, à partir de la MI-FSC après calibration à l'aide du kit « Invitrogen flow cytometry size calibration », montre une taille moyenne des plaquettes de nos patients à 5,4 μm nettement plus grande que les plaquettes témoins à 3,9 μm . En cytométrie en flux, l'autofluorescence et la fluorescence non spécifique sont directement proportionnelles à la taille des cellules analysées. On a déterminé une parfaite corrélation entre la taille des plaquettes et la MFI-IgG obtenue chez trois témoins, avec un coefficient de corrélation de Pearson de 0,95 à 0,99. Afin d'éliminer l'effet de la taille plaquettaire sur le résultat final, il est indispensable d'éliminer les plaquettes de taille géante sur l'histogramme FSC/SSC, en sélectionnant la région des plaquettes dont la MI-FSC est inférieure à 10^5 .
- La dernière étape est la détermination de la MFI IgG ou IgM sur un histogramme monoparamétrique. Le nombre souhaité des plaquettes est de 7000, qui permet l'obtention d'une courbe lisse, cependant l'analyse est possible même avec un nombre d'évènements à 2000. On note que le nombre d'évènements minimum nécessaire à l'analyse a été obtenu pour l'ensemble de nos patients, même ceux qui présentaient une thrombopénie sévère (jusqu'à 3 G/L).

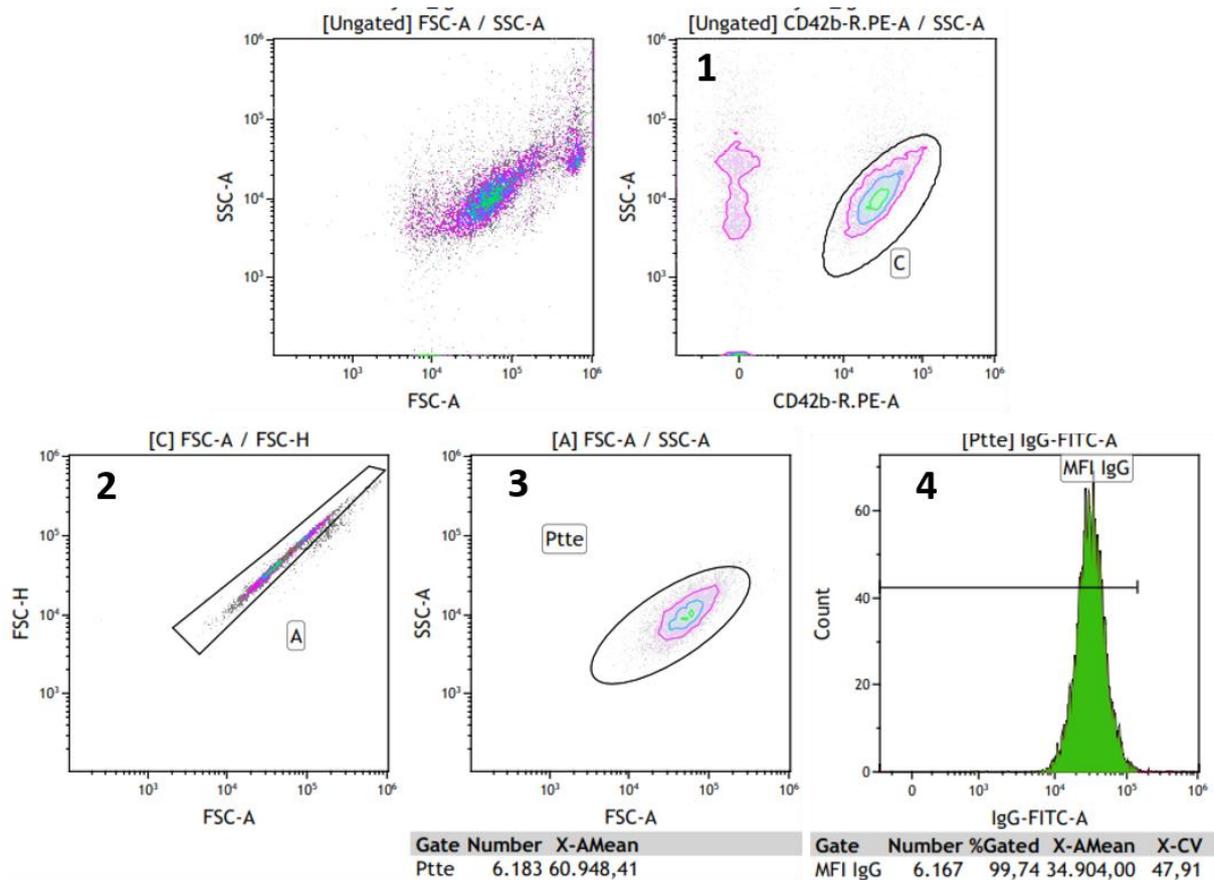


Figure 66: stratégie de gating

(1) Sélection des plaquettes CD42b positif; (2) élimination des doublets; (3) vérification de la taille, $MFI-FSC=60948 < 10^5$; (4) détermination de la MFI IgG (X-AMean), sur une courbe bien lisse par 6167 événements.

D. Performances analytiques de la technique PAIg

1. Méthodologie d'évaluation de la technique

Il s'agit de la méthodologie classique d'évaluation d'un nouveau test diagnostique⁽³⁷²⁾; elle consiste à comparer les résultats de notre test à ceux du test de référence, en suivant les étapes protocole, suivantes :

- La question posée dans notre étude, c'est de savoir si la technique de dépistage des PAIg par cytométrie en flux peut être considérée comme, un moyen diagnostique satisfaisant pour le PTI.
- Le test de PAIg appliqué dans cette étude a été décrit, avec une précision suffisante pour refaire une autre étude analogue.

- Nos résultats sont exprimés sous forme d'une variable quantitative, avec un seuil de positivité.
- L'examen de référence est l'exclusion de toutes les causes de thrombopénies. Cet examen n'est pas une référence incontestable, il ne constitue pas un vrai « Gold standard » pour l'évaluation de notre technique. Afin d'obtenir notre examen de référence, on a inclus la réponse aux traitements de première ligne (corticoïdes et IV-Ig), comme un moyen de confirmation du mécanisme immunologique. Par ailleurs, pour éviter le biais de sélection des patients ayant des formes de PTI ne répondant pas aux traitements, et les patients mis uniquement sous surveillance (sans traitement), on a opté à la sélection des patients en postériori. C'est-à-dire, tous les patients ayant une thrombopénie persistante de plus de 6 mois, avec élimination de toutes les autres causes de thrombopénie sont inclus. Cette sélection des patients va nous permettre de reproduire la situation d'une éventuelle application du test en pratique courante.
- Pour une évaluation sans biais, l'interprétation des résultats du test était en insu, c'est-à-dire, sans connaître le résultat de l'examen de référence (réponse au traitement) pour les formes aiguës. Quant aux formes sans réponse au traitement ou sans traitement, le test a été exécuté et interprété, ensuite les informations du suivi du patient ont été collectées afin de le classer. Néanmoins, cette approche n'était applicable que pour les nouveaux cas (60% des patients inclus), pour les formes persistantes ou chroniques (40% de la population), les résultats de l'examen de référence étaient connus avant la réalisation du test.
- Biais d'exclusion : on a obtenu des résultats ininterprétables dans 8 cas, le test a été refait sur un deuxième prélèvement pour 3 cas et puis le résultat a été validé. Pour les cinq patients restants, on n'a pas pu réaliser un deuxième prélèvement et les 5 cas ont été exclus de l'analyse. Les principales causes d'un résultat ininterprétable sont la présence d'un bruit de fond trop élevé ; la perte des événements au moment la préparation des plaquettes et le défaut de marquage par l'anticorps anti-GP.

2. Performances intrinsèques du test PAIg

Les résultats sont exprimés en MFI, l'intensité de fluorescence est directement proportionnelle au nombre d'anticorps fixés à la surface des plaquettes. C'est le mode d'expression des résultats le plus utilisé par la majorité des études similaires, ainsi que par les kits commercialisés ThrombocytexTM et Platelet PAIg BiocytexTM StagoTM. Néanmoins, on note une interprétation par pourcentage des plaquettes positives dans quelques études^(336, 338, 340, 343). Bien que l'intensité de la fluorescence obtenue chez les patients PTI est statistiquement plus élevée que celle des témoins, la différence moyenne de la MFI entre patients et témoins est de 11000 et 4700 pour l'IgG et l'IgM respectivement, pour une MFI moyenne des témoins à 2200 et une valeur seuil à 4800. Donc la différence n'est pas très

importante pour permettre une détermination objective du pourcentage des plaquettes positives, principalement dans les cas faiblement positifs (Figure 67). En revanche dans les formes fortement positives le pourcentage des plaquettes positives est supérieur à 90% (Figure 68), mais ces situations sont les moins fréquentes. Seulement 5,2% de nos patients positifs ont eu une MFI IgG ou IgM très élevée supérieure à 32000, tandis que 60% ont une MFI faiblement positive inférieure à 9000. En outre, l'interprétation en pourcentage des plaquettes positives ne permet pas une estimation de l'intensité qui est en relation directe avec le titre des anticorps et la sévérité de la pathologie.

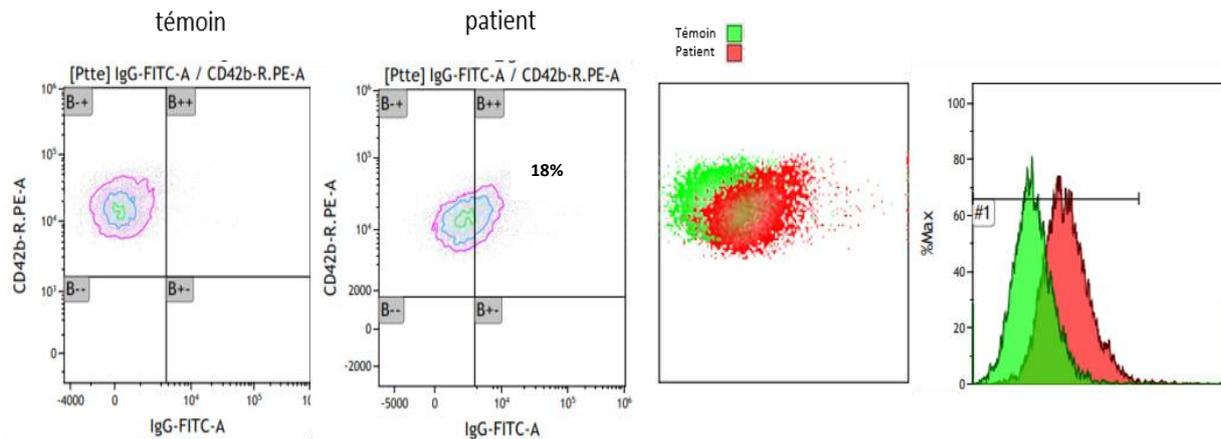


Figure 67: patient faiblement positif IgG

Patient présentant une MFI IgG à 8600, 18% des plaquettes sont positives, l'overlay patient/témoin montre une séparation des pics MFI plus évidente que le pourcentage des plaquettes positives.

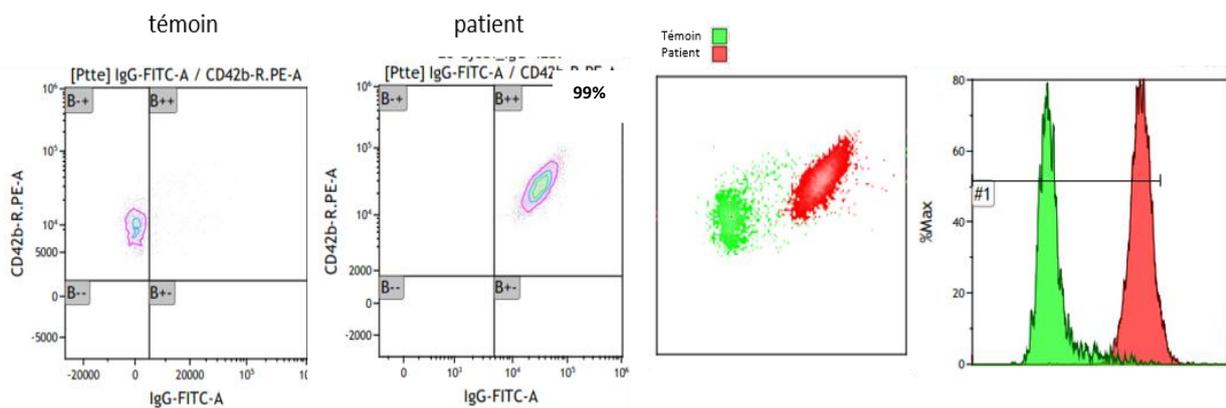


Figure 68: patient fortement positif IgG

Patient présentant une MFI IgG à 80000, 99% des plaquettes sont positives, l'overlay patient/témoin montre une nette séparation des pics MFI et des populations plaquettaires.

Les valeurs intrinsèques de la technique (sensibilité et spécificité), ont été déterminées après le choix d'une valeur seuil à partir de la courbe ROC. La surface sous la courbe ROC pour l'association IgG+IgM était excellente, à 0,95 (très proche de 1). On a choisi une valeur seuil, qui nous offre la meilleure spécificité tout en gardant une sensibilité élevée. La valeur seuil de MFI=4800 nous donne une spécificité à 95,5% et une sensibilité à 84,3% pour l'association IgG+IgM. La sensibilité diminue en cas d'utilisation de l'IgG seul à 73,5%, et elle diminue encore davantage pour l'IgM seul à 53,9%, mais en gardant une spécificité supérieure à 95% dans les deux cas. Ceci est en rapport avec la prédominance de l'isotype IgG dans le PTI. Les formes IgA seules sont possibles également, mais elles sont rares, l'utilisation de l'anti-IgA en association avec l'anti-IgG et l'anti-IgM pourrait améliorer la sensibilité de la technique. On a donc 16 cas faux négatifs parmi les 102 patients PTI, qui sont constitués de 9 cas de PTI chroniques et 7 cas de PTI nouvellement diagnostiqués ou persistants. Les 9 cas de PTI chroniques avaient tous un taux de plaquettes supérieur à 50 G/L avec une moyenne à 64G/L.

La fréquence des résultats faux négatifs était à 60% chez les patients présentant un PTI chronique, contre seulement 08% chez les patients présentant une forme nouvelle ou persistante. Cette différence est statistiquement significative, la P valeur du test Khi-2 = 10^{-7} , ainsi que l'estimation du risque montre un risque relatif des faux négatifs à 17,1 avec un intervalle de confiance significatif [4,7 – 62,2], autrement dit, il y'a 17 fois plus de risque d'avoir un test faux négatif chez les patients présentant un PTI chronique par rapport aux patients présentant des formes nouvelles ou persistantes. On outre, il y'a 15 cas de patients présentant un PTI chronique dans notre population, dont 6 sont de vrais positifs IgG+IgM, la comparaison du taux des plaquettes des cas vrais positifs par rapport aux cas faux négatifs montre un taux moyen des plaquettes chez les 9 cas faux négatifs à 64G/L, nettement supérieur à celui des cas vrais positifs qui était à 34G/L. Donc le risque d'un résultat faux négatif se multiplie encore plus, lorsqu'on traite un patient présentant un PTI chronique avec un taux des plaquettes supérieur à 50G/L.

Parmi les 07 cas faux négatifs des formes nouvelles et persistantes, quatre patients étaient sous traitement à base de corticoïdes en J2 à J3, et chez lesquelles on observe une augmentation (au moins le double) du taux de plaquettes au moment de l'analyse par rapport à celui du J0. Cette réponse au traitement en cours pourrait être à l'origine de la non-détection de PAIg à la surface plaquettaire par notre technique.

Sur les 204 témoins analysés, seulement 9 cas étaient des faux positifs, ce qui donne une excellente spécificité à 95,5%. Parmi les cas faux positifs, il y'a 7 cas de témoins sains et deux cas de témoins thrombopéniques dont un présentait une leucémie aiguë lymphoblastique, et l'autre une insuffisance hépatocellulaire. Dans cinq cas la MFI était faiblement positive, inférieure à 6000, et dans quatre cas la MFI était plus élevée avec une limite supérieure à

12000. Le signal faux positif, est dû principalement à une fixation non spécifique des anticorps à la surface plaquettaire, secondaire à une mauvaise préparation des plaquettes avant le marquage. Ce qui caractérise un signal faux positif par rapport au vrai positif, c'est sa grande hétérogénéité ; le CV-MFI des faux positifs est plus élevé par rapport à celui des vrais positifs ; ce paramètre constitue un moyen d'aide à l'interprétation des résultats afin d'éviter les cas faux positifs et améliorer davantage la spécificité de la technique.

La fixation de la valeur seuil à partir d'une courbe ROC améliore les performances du test⁽³²³⁾, cependant plusieurs auteurs ont procédé à la fixation d'une valeur seuil sur la base de la moyenne des témoins : MFI+2ET⁽³³⁹⁾ ou MFI+3ET^(4, 321). La moyenne de la MFI IgG+IgM de nos témoins était égale à 2160, avec un écart type à 1380, on remarque que la moyenne+2ET= 4920, très proche de la valeur déterminée par la courbe ROC. Étant donné que la distribution des valeurs MFI de nos témoins était normale, l'intervalle moyenne±2ET inclus 95,45% de nos témoins selon la loi normale, ce qui représente la même spécificité obtenue à 95,5%. L'interprétation en moyenne+2ET, est très utile lorsqu'on veut établir rapidement des valeurs normales, en cas de la réalisation d'une étude analogue dans un autre laboratoire, il est possible d'appliquer le test sur une série de 20 témoins au minimum et déterminer une valeur seuil initiale, très similaire à celle de la courbe ROC.

La sensibilité et la spécificité de la méthode indirecte sont à 81,8% et 84% respectivement, nettement diminuées par rapport aux résultats de la technique directe. Il est admis que la sensibilité de détection des anticorps associés aux plaquettes est plus élevée, par méthode directe que la méthode indirecte, et c'est commun pour les différentes techniques MAIPA, ELISA et CMF⁽³⁵⁰⁾. Ceci est dû à la séquestration des anticorps sériques sur les plaquettes, ce qui diminue leur titre dans le sérum⁽³⁷³⁾. On a obtenu une concordance des résultats entre la technique directe et indirecte à 62,8% pour l'IgG et 60,4% pour l'IgM. Dans les cas d'une faible positivité à l'épreuve directe, on enregistre souvent des résultats négatifs à l'épreuve indirecte estimés à 14,2% pour l'IgG et 13,6% pour l'IgM. Par ailleurs, l'incubation des plaquettes témoins avec le plasma des patients, était parfois à l'origine d'un bruit de fond très élevé et d'une réaction faux positive due à une fixation non spécifique des immunoglobulines à la surface plaquettaire notamment les IgG, où il y'avait neuf cas (20% des tests) non concluant, dont la fluorescence était très hétérogène et trop élevée, supérieure à 10^6 pour le patient et le témoin. C'est pour cette raison que l'évaluation de la méthode indirecte a été clôturée à 44 patients seulement.

La méthode directe est la mieux adaptée au dépistage des PAIg, elle est moins laborieuse et plus rapide, en plus de son excellente spécificité par rapport à la méthode indirecte. Le principal avantage apporté par la méthode indirecte, réside dans la possibilité de conservation des plasmas à de longues durées et l'analyse différée des échantillons, par rapport à la méthode directe où l'analyse doit être effectuée dans les 24 heures après le

prélèvement. Une autre application possible de la méthode indirecte est dans le dépistage des allo-immunisations plaquettaires, où la recherche doit se faire dans le sérum. La technique de PAIg n'est pas actuellement indiquée dans les cas des allo-immunisations, mais on va présenter les résultats de deux cas traités sur la marge de cette étude. (Page 123/chapitre III.K)

3. Performances extrinsèques du test PAIg direct

La sensibilité et la spécificité représentent des performances propres au test lui-même, mais elles nous ne renseignent pas sur les performances du test lorsqu'il est appliqué en pratique courante. Lorsqu'un PTI est suspecté, le clinicien a besoin de savoir la probabilité que le patient soit réellement malade si le test est positif, et la probabilité qu'il soit sain si le test est négatif. Ceci n'est possible qu'après la détermination des valeurs prédictives (positive et négative) et les rapports de vraisemblance⁽³⁵⁶⁾.

Les valeurs prédictives sont dépendantes de la prévalence de la pathologie. Dans notre étude la prévalence des patients était à 33% (1 patient pour 2 témoins), le calcul de ces valeurs selon le théorème de Bayes⁽³⁵⁷⁾ montre d'excellente valeur prédictive, positive à 90% et négative à 92,5%. Étant donné, que ces deux valeurs sont influencées par la prévalence de la maladie, donc dépendantes des caractéristiques épidémiologiques de chaque population⁽³⁷⁴⁾, on a démontré la variation de ces valeurs selon la prévalence. La VPP dépend de la spécificité du test, elle est donc très similaire entre la recherche de l'IgG seul ; IgM seul ou bien l'association IgG+IgM, et directement proportionnelle à la prévalence (Figure 45 page100). En revanche la VPN est inversement proportionnelle à la prévalence et on remarque une VPN nettement plus élevée dans l'association IgG+IgM, en cas d'une grande prévalence (Figure 46 page 101).

On a évalué la prévalence du PTI au niveau de notre laboratoire. Cette évaluation avait pour but de déterminer le taux des vrais cas de PTI, lorsqu'on reçoit un nouveau patient thrombopénique chez lequel on suspecte un mécanisme immunologique, après élimination des causes les plus évidentes. Le taux des vrais PTI dans ces conditions est estimé à environ 50%.

Les rapports de vraisemblances (RV) ou *Likelihood ratio (LR)*, permettent l'évaluation du gain diagnostique apporté par le test, et ils ne dépendent pas de la prévalence. Le LR+ était égal à 19, et significativement supérieur à 10 pour l'association IgG+IgM, ce qui signifie que l'apport au diagnostic positif du test PAIg est très fort. Par ailleurs, le LR- était égal à 0,16 avec un intervalle de confiance allant jusqu'à la valeur 0,26, signifiant que l'apport au diagnostic négatif de la maladie est fort à modérer par ce test.

À partir des valeurs LR+ et LR-, les probabilités poste test ont été calculées en prenant en considération la prévalence de la maladie et après le traçage des nomogrammes de Fagan.

Ces valeurs nous permettent de répondre directement à la question du clinicien (*probabilité qu'un patient soit réellement atteint du PTI si le test est positif*). Dans les conditions de notre laboratoire, pour une prévalence estimée à 50%, qui représente la probabilité prétest ; si le test revient positif la probabilité poste test est de 95%, donc on est sûr à **95%** que le patient soit réellement atteint du PTI avec un intervalle de confiance à 95% [90-98%] ; si le test revient négatif, la probabilité poste test négatif, est de 14%, donc si le test est négatif, la probabilité qu'il soit positif (faux négatif) est à 14% avec un intervalle de confiance à 95% [10-19%], autrement dit, la probabilité qu'il soit réellement un vrai négatif est de **86%**.

4. Autres caractéristiques du test PAIg

a) Aspect des plaquettes

L'aspect des plaquettes sur l'histogramme FSC/SSC est très variable entre les témoins normaux et les patients PTI. On identifie cinq différentes régions sur l'histogramme FSC/SSC après l'acquisition de la suspension des plaquettes lavées (Figure 69). Chez un témoin normal, les plaquettes représentent la principale population dans la suspension préparée, où le taux de d'évènements CD41+/CD61+ était à 81,5% après le marquage par un anticorps plaquettaire anti-CD41a ; CD61 ou CD42b, et l'élimination des doublets et agrégats. Le reste des évènements sont constitués de globules rouges ou blancs résiduels, et des débris cellulaires.

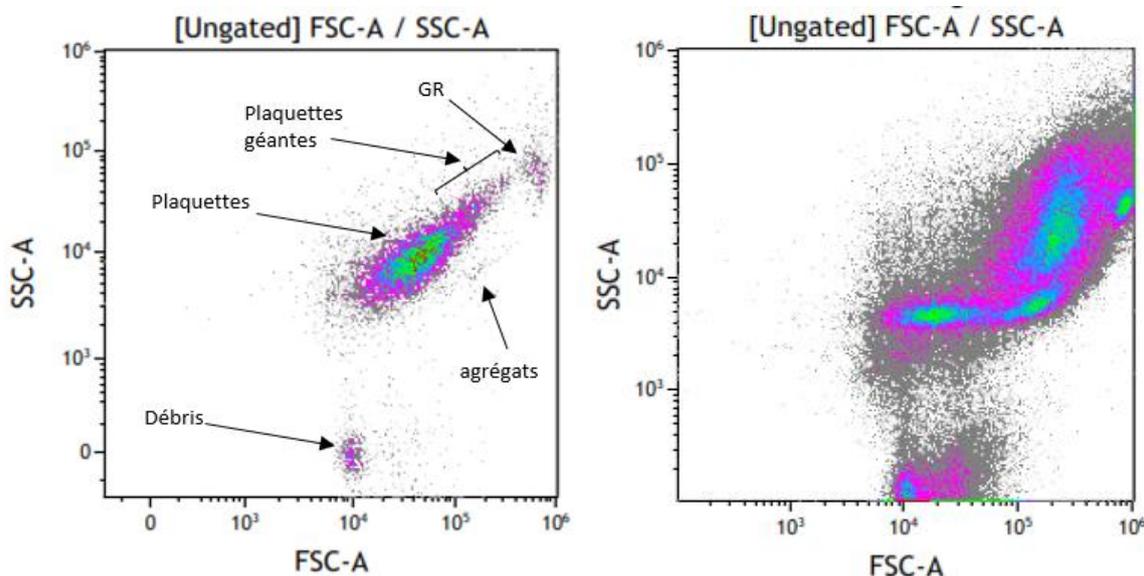


Figure 69: Aspect des plaquettes sur un histogramme FSC/SSC

À gauche : Témoin normal

À droite : patient PTI

Chez les patients PTI, on enregistre un aspect des plaquettes très altéré sur l'histogramme FSC/SSC, où on note souvent une fraction plus importante des débris cellulaires, en rapport

avec la destruction plaquettaire, et également une fraction des globules rouges résiduels plus importante, en rapport avec la faible richesse en plaquettes. L'estimation du taux des plaquettes à l'aide d'un anticorps antiplaquettaire (CD41/CD61/CD42b), montre une moyenne de 36,6%, significativement très diminuée par rapport aux témoins normaux. Dans cette situation il est très difficile de sélectionner la population plaquettaire à analyser sur un histogramme FSC/SSC, en raison de l'interférence des débris, et la présence des plaquettes de grande taille qui chevauchent avec les globules rouges résiduels. Il est donc indispensable de sélectionner les plaquettes à analyser par un anticorps antiplaquettaire sur un histogramme SSC/CD41a (CD42b ou CD61). Inclure les débris et les GR résiduels entraîne une surestimation de la MFI IgG ou IgM, et par conséquent un résultat faux positif, ceci peut expliquer la grande variabilité de la spécificité enregistrée par certains auteurs qui ont procédé à la sélection des plaquettes sur l'histogramme FSC/SSC.

Par ailleurs, le taux moyen des plaquettes CD41+/CD61+ chez les témoins thrombopéniques était à 55,9%, mais une analyse des deux sous populations de thrombopénies centrales et périphériques montre un taux moyen de 64,1% et 20,7% respectivement. Dans le cas des thrombopénies centrales, on remarque une majoration de la fraction des GR en rapport avec la thrombopénie ce qui diminue légèrement le taux des plaquettes CD41+/CD61+ à 64%. Dans le cas des thrombopénies périphériques, on note une augmentation des débris cellulaires et des GR résiduels, l'aspect était très comparable à celui des patients PTI avec la présence des plaquettes de grande taille. Cette observation nous confirme que les débris présents à l'histogramme FSC/SSC correspondent à la destruction périphérique des plaquettes. Une analyse attentive de l'aspect des plaquettes en FSC/SSC peut nous fournir des renseignements utiles sur le mécanisme de destruction périphérique des plaquettes.

b) Taille des plaquettes

Les plaquettes de grande taille et les plaquettes géantes sont très fréquentes, au cours des thrombopénies périphériques, principalement dans le PTI. L'intensité moyenne de la lumière laser obtenue dans le canal FSC (MI-FSC) est proportionnelle à la taille plaquettaire. L'utilisation d'un kit de billes calibrées de différentes tailles permet de convertir la MI-FSC en taille cellulaire par μm .

La MI-FSC des plaquettes de nos patients PTI était significativement plus grande que celle des témoins normaux. La taille moyenne des plaquettes est estimée à 2,9 μm chez les témoins et 3,6 μm chez les patients, avec une taille moyenne maximale enregistrée à 5,4 μm cependant les plaquettes géantes étaient très fréquentes chez les patients, où la taille mesurée était entre 7 et 11 μm , donc comparable ou plus grande que la taille d'un globule rouge normal.

La fluorescence non spécifique, obtenue par cytométrie en flux, est due à la fluorescence naturelle (autofluorescence) des plaquettes d'une part et à la fixation non spécifique des anticorps à la surface plaquettaire d'autre part. Ces deux sources de bruit de fond sont très influencées par la taille de la plaquette. Les plaquettes de grande taille génèrent une autofluorescence plus importante, et elles fixent d'une façon non spécifique plus d'anticorps, en rapport avec leurs surfaces membranaires plus étendues. L'analyse des groupes des plaquettes de différentes tailles, au sein de la même population plaquettaire, montre une augmentation de la fluorescence non spécifique proportionnelle à la taille moyenne plaquettaire, avec une parfaite corrélation (corrélation de Pearson >0,95).

Inclure les plaquettes géantes dans l'analyse, entraîne une surestimation de la fluorescence, qui peut être à l'origine d'un résultat faux positif. Afin d'éviter ce phénomène, nous avons sélectionné les plaquettes dont la MI-FSC est inférieure à 10^5 , ce qui correspond à une taille plaquettaire moyenne inférieure à 4,5 μm .

c) CV- MFI

Une fluorescence positive se caractérise par son homogénéité, par rapport à la fluorescence non spécifique qui est très hétérogène au sein de la même population cellulaire. Le coefficient de variation (CV) de la fluorescence IgG ou IgM nous renseigne sur leur homogénéité. Le CV moyen de la MFI-IgG était à 138% chez les patients plus bas par rapport aux témoins à 186%, cette différence est statistiquement très significative. Pareil pour la MFI IgM, où les CV moyens étaient à 152% et 193% chez les patients et les témoins respectivement.

Une fluorescence homogène est en faveur d'une vraie fixation des immunoglobulines à la surface plaquettaire, un CV-MFI diminué est souvent observé dans les cas vrais positifs IgG ou IgM. Le CV-MFI peut constituer un paramètre d'aide à l'interprétation des résultats obtenus. Par ailleurs, le CV-MFI est influencé par la qualité du réactif (fluorochrome et concentration), et par le réglage du voltage du canal de récupération de la fluorescence.

d) Intensité MFI

En plus du dépistage direct des PAIg par CMF, la technique permet également une estimation du titre d'anticorps fixés à la surface des plaquettes. Il est directement proportionnel à l'intensité de fluorescence obtenue. On a déterminé une relation linéaire entre le titre de l'anticorps et l'intensité de la fluorescence, par une expérience réalisée à l'aide des billes de capture, avec un coefficient de détermination $R^2=0,9996$.

Le titre de l'anticorps est en relation directe avec la sévérité de la pathologie. L'étude de la relation entre le titre d'anticorps et la sévérité de la thrombopénie montre une corrélation négative statistiquement significative entre les deux (P valeur du Pearson=0,00043). Néanmoins il y'a eu dans quelques cas une discordance entre l'intensité de la MFI et le taux des plaquettes. Cinq cas de thrombopénies sévères <10G/L, présentaient un test direct

positif, mais à une MFI < 8000, en revanche, deux cas présentaient une MFI élevée >32000, mais avec un taux des plaquettes >50G/L. Ceci peut s'expliquer par l'existence de plusieurs mécanismes de destruction plaquettaire⁽²⁸⁰⁾ : activation du complément qui entraîne la lyse cellulaire ; la cytotoxicité cellulaire dépendante d'anticorps (ADCC) médiée par les lymphocytes TCD8 et NK ; opsonisation par les macrophages via les récepteurs FcγR et la désialylation plaquettaire⁽³⁷⁵⁾. L'intensité de la présence des PAIg est variable selon le mécanisme de destruction plaquettaire.

e) Calibration d'un nouveau réactif

Bien que l'interprétation des résultats du test en MFI soit plus objective par rapport aux taux de plaquettes positives, elle pose un problème de standardisation des valeurs seuils même au sein du même laboratoire. La MFI est influencée par le changement du réactif ; l'utilisation d'un nouveau cytomètre ou une intervention technique sur le cytomètre (maintenance ou changement du laser, PMT, filtres...etc.).

Durant notre étude on a reçu un nouveau lot du réactif Goat anti-human IgG, ce nouveau lot présente une concentration plus élevée en Ac anti-IgG (0,4 mg/ml pour l'ancien réactif et 0,5 mg/ml pour le nouveau), et l'intensité de fluorescence obtenue sur le canal BL1, était très élevé par rapport à l'ancien lot. L'utilisation de ce nouveau lot n'était possible qu'après ajustement et calibration.

Une corrélation parfaite a été démontrée entre les MFI obtenues par les deux réactifs selon les voltages du PMT du canal BL1. Il est donc possible d'ajuster le voltage du PMT pour le nouveau lot afin de rendre ses résultats similaires à ceux obtenus par l'ancien réactif. En se basant sur ces données, on a procédé à la diminution du voltage du PMT BL1, jusqu'à l'obtention d'une MFI similaire à l'ancien réactif pour un témoin normal. Le voltage du PMT a été diminué de 380 à 310, et son application sur 4 patients PTI et 11 témoins montre des résultats très similaires, avec une concordance à 100%.

Cette approche a permis de calibrer un nouveau lot en utilisant l'ancien lot qui est déjà calibré. Dans le cas où l'ancien lot n'est plus disponible, il est impossible de calibrer d'autres réactifs. Il est donc nécessaire, de trouver un autre moyen plus reproductible, comme les billes de capture, qui vont permettre d'enregistrer les MFI obtenues avec l'ancien réactif, et d'ajuster les PMT afin d'obtenir les mêmes résultats avec un nouveau réactif. Par ailleurs, les billes disponibles actuellement au niveau de notre laboratoire sont des billes de capture d'anticorps de souris (anti mouse beads kit), qui sont incapables de fixer les Goat anti-IgG et anti-IgM, on a envoyé une demande à notre fournisseur pour l'acquisition des billes de capture des immunoglobulines de plusieurs espèces.

E. Évaluation générale de la technique PAIg directe

L'évaluation d'un nouveau test de diagnostic biologique consiste à déterminer ses performances analytiques (intrinsèques et extrinsèques) et d'évaluer ses conditions d'application au laboratoire et en routine courante. La technique de recherche directe des PAIg par cytométrie en flux, développée au niveau de notre laboratoire, a montré des performances analytiques très satisfaisantes et prometteuses. La sensibilité et la spécificité pour l'association IgG-IgM étaient respectivement 84,3% et 95,5%, avec un excellent rapport de vraisemblance LR+=19.

Le test de PAIg direct est considéré comme un test de dépistage global, il met en évidence un excès d'immunoglobuline à la surface plaquettaire, sans identifier la cible. L'avantage de ce test c'est qu'il détecte bien les anticorps dirigés contre les GP plaquettaires, et même les anticorps dirigés contre le système HLA ou bien les antigènes des groupes sanguins. En revanche, l'inconvénient majeur de ce type de recherche réside dans la fixation non spécifique des immunoglobulines à la surface plaquettaire, qui est à l'origine d'une augmentation des cas faux positifs et par conséquent, une baisse de la spécificité du test. L'analyse des études similaires dans la littérature montre une grande divergence des résultats obtenus par les différents auteurs (Tableau 51). On a collecté les data de 12 études similaires publiées entre l'année 1986 et 2016. Le nombre total des patients inclus dans ces études était 538 PTI avec des extrémités de 8 à 88 patients par étude. La sensibilité cumulée de ces études était à 79% avec des extrémités larges de 45 à 100%. La spécificité était également variable de 39 à 100%, cependant on n'a pas pu calculer la spécificité cumulée par manque de data concernant la population témoin dans plusieurs études. La grande variabilité des résultats est en rapport avec les différences entre ces études dans le mode de préparation des échantillons et d'interprétation des résultats, mais globalement on observe une sensibilité acceptable avec une spécificité diminuée.

Tableau 51: Techniques de PAIg direct par cytométrie en flux.

Auteur	Anticorps	Contrôle	Expression des résultats	Sensibilité	Spécificité
Rosenfeld ⁽³⁴⁰⁾ 1987 44 PTI	FITC goat anti-IgG humaine	Sheep anti-mouse	% des plaquettes positives (moyenne +3SD)	92%	81,8%
Christopoulos ⁽³³⁹⁾ 1993 16 PTI	FITC goat anti-IgG humaine	Non immune goat IgG	MFI goat IgG/MFI contrôle = RFI (moyenne RFI + 2SD)	75%	77,8%
Tazzari ⁽³⁴¹⁾ 1995 54 PTI	FITC goat anti-IgG humaine	Ptte normales + goat anti-IgG humaine	MFI	85%	100%
Romero-Guzman ⁽³⁴³⁾ 2000 62 PTI	FITC rabbit anti-IgG, IgM humaines	FITC Goat anti-mouse	% des plaquettes positives (Moyenne +2SD)	90,3%	39,3%
Lazarchik ⁽³⁴⁴⁾ 1986 8 PTI	FITC goat anti-IgG humaine	Non	MFI ptte marquées/MFI ptte non marquées	63%	60%

Campos Guerra ⁽³⁴⁹⁾ 2011 8 PTI	-	-	-	76,9%	83,3%
Huh ⁽³³⁸⁾ 2009 59 PTI	FITC rabbit anti-IgG IgA IgM humaines	FITC mouse IgG	% des plaquettes positives analyse par courbe ROC	74%	78%
Nishioka ⁽³³⁶⁾ 2011 23 PTI	FITC anti total Ig, IgG, IgM, IgA.	FITC anti-mouse IgG	% de positivité, au-delà du signal du contrôle nég	Total Ig 95% Anti IgG 69%	/
Nielsen ⁽⁶⁾ 2016 88 PTI	FITC anti IgG, IgM	Non	MFI / courbe ROC	74%	/
Hezard ⁽³²³⁾ 2008 73 PTI	FITC goat anti IgG, IgM, IgA	Non	MFI / courbe ROC	100%	57%
Hamidpour ⁽³²¹⁾ 2014 38 PTI	FITC anti IgG	Non	Moyenne MFI + 3SD	62%	/
Stockelberg ⁽⁴⁾ 1996 65 PTI	FITC anti IgG, IgM, IgA	Non	Moyenne MFI + 3SD	45%	/
Notre étude 2022 102 PTI	FITC goat anti IgG, IgM	Non	MFI / courbe ROC	84,3%	95,5%

MFI : intensité moyenne de fluorescence. FITC : isothiocyanate de fluorescéine. ROC : receiver operating characteristic. Ptte : plaquettes.

Par ailleurs, plusieurs techniques de recherche des anticorps spécifiques aux GP plaquettaires sont développées, on cite principalement les techniques ELISA avec ses différentes méthodologies ; MAIPA (*monoclonal antibody immobilization of platelet antigens*) ; ACE (*antigen capture ELISA*) et MACE (*modified antigen capture ELISA*). Plus récemment, une technique par cytométrie en flux a été développée également, il s'agit de la FCIA (*flow cytometric immuno-beads assay*).

Vrbensky et al (2019)⁽³⁷⁶⁾ ont publié une revue systématique et une méta-analyse des tests d'autoanticorps plaquettaires dans le diagnostic du PTI, basés sur la détection des anticorps spécifiques, dans laquelle 18 études éligibles ont été incluses, dont 09 études ont utilisé la technique MAIPA^(284, 352, 354, 370, 377-381), 4 par la technique MACE^(249, 382-384), 02 études par la technique ACE^(385, 386) et 03 par FCIA^(5, 345, 347). L'ensemble de ses études inclut 1170 patients PTI et 225 contrôles normaux et non PTI, la sensibilité et la spécificité cumulées de ces tests pour la détection des anticorps antiGPIIb/IIIa et GPIbIX étaient respectivement 53% (IC95%, 44-61%), et 93% (IC95%, 81-99%)⁽³⁷⁶⁾. Bien que, la majorité des auto-anticorps antiplaquettes sont dirigés contre les complexes glycoprotéiques GPIIb/IIIa et GPIbIX, la recherche des anticorps spécifiques de ces deux glycoprotéines montre une sensibilité réduite, cependant cette sensibilité pourrait être améliorée si on associe à la recherche les anticorps anti-GPV et GPIIa⁽³⁶²⁾. En revanche, toutes ces techniques montrent une excellente spécificité, en effet la recherche ciblée des anticorps dirigés contre les complexes glycoprotéiques plaquettaires, élimine le problème de fixation non spécifique observé dans les techniques PAIg et améliore considérablement la spécificité. Par ailleurs, toutes les

publications se sont limitées à l'évaluation des performances intrinsèques du test, aucun auteur n'a estimé les performances extrinsèques (valeurs prédictives et rapport de vraisemblance).

Donc globalement les techniques spécifiques au GP sont plus spécifiques, tandis que les techniques PAIg sont plus sensibles, néanmoins le type de la recherche n'est pas le seul facteur influençant les performances du test d'auto-anticorps antiplaquettes. D'autres paramètres comme : le mode de sélection et préparation des échantillons, le choix des anticorps pour les techniques par CMF et le mode d'interprétation des résultats^(350, 362, 376) sont également des paramètres très importants. Dans la présente étude, on a modifié et ajusté tous les paramètres pouvant être à l'origine d'un signal faux positif, afin d'améliorer la spécificité de la technique PAIg directe tout en gardant sa bonne sensibilité. On recommande de respecter les étapes suivantes :

- Choix des patients : le test PAIg doit se réaliser chez les patients présentant une thrombopénie isolée, sans aucune autre étiologie évidente ; le taux de plaquettes doit être inférieur à 100G/L⁽³⁵⁰⁾ ; le test est utile chez les patients ne rependant pas aux traitements et les patients présentant une thrombopénie modérée sans traitement. Cependant le test ne doit pas être réalisé chez les patients avec une réponse au traitement en cours, et les patients présentant une forme chronique avec un taux des plaquettes supérieur à 50G/L.
- Le témoin : le test positif doit être validé par un témoin négatif afin d'éliminer une fixation non spécifique due à une mauvaise préparation de l'échantillon. Le témoin est un sujet sain sans aucun antécédent pathologique ni prise médicamenteuse, il est analysé en parallèle et dans les mêmes conditions que le patient.
- Préparation de l'échantillon : la préparation du concentré plaquettaire lavé est l'étape clé du test, elle est souvent à l'origine du bruit de fond et du signal faux positif. La solution de lavage (PBS ou SAGM) doit être standard à un pH stable additionnée de l'EDTA et préchauffée à 37 °C. Le nombre de lavages doit être suffisant afin d'éliminer le maximum de fixation non spécifique, dans notre cas on a effectué 5 lavages. La recherche directe des PAIg sur les plaquettes du patient est plus sensible et spécifique que la recherche des anticorps sériques, ceci est commun entre tous les auteurs et par toutes les techniques.
- Préparation du cytomètre : un contrôle journalier des performances du cytomètre doit être effectué au début de la journée avant l'analyse des échantillons, il est effectué en général à l'aide des billes commercialisées. Le réglage de la compensation pour la technique PAIg doit être réalisé par des plaquettes témoins.
- Acquisition des données : choisir une vitesse moyenne d'acquisition, le nombre des plaquettes souhaitées dans le gâte final est 5000 au minimum, à moins de 1000 l'interprétation est souvent très difficile. Sélectionner impérativement les plaquettes

exprimant un marqueur (CD42b, CD41a ou CD61). Une attention particulière à la forme des plaquettes à l'histogramme FSC/SSC ; la taille des plaquettes (présence des plaquettes géantes) ; la présence des doublets ou agrégats, la présence d'une courbe finale MFI non lisse ou en deux pics et le CV-MFI.

- Choix de la valeur seuil : chaque laboratoire doit établir ses propres valeurs normales, soit en traçant une courbe ROC, qui est la meilleure façon d'établir une valeur seuil très précise, cependant elle a besoin de réaliser une étude sur une série de patients et témoins. Alternativement, si la distribution des MFI d'une population témoin suit la loi normale, on peut fixer une valeur seuil sur la base de la moyenne témoin $\pm 2ET$, qui sera très proche et similaire à la valeur obtenue par la courbe ROC. Enfin, la valeur seuil est influencée par toute modification des paramètres : compensation, voltage PMT, changement du lot de réactif, changement du cytomètre ou intervention technique sur le cytomètre.

Le respect de toutes ces recommandations a permis d'améliorer la spécificité de cette technique à 95,5%, en outre, l'application des recommandations concernant la sélection des patients peut améliorer davantage la sensibilité de la technique qui est actuellement à 84,3%. On signale qu'afin d'éliminer le biais d'interprétation des résultats, une partie de notre population (20 patients et 20 témoins) a été analysée et interprétée par une tierce personne dont les résultats étaient très similaires.

Parmi les points forts de cette technique, c'est qu'elle est adaptée à l'usage en routine, et beaucoup moins laborieuse que les techniques de recherche spécifique des anticorps anti-GP plaquettaires. Le temps de prise en main est estimé à seulement 75 min, avec un cout très réduit estimé à 1700 DA pour un patient+témoin, par rapport aux kits commercialisés des autres tests, exemple :

- Kit Thrombocyttest BD de 25 tests à 2779 € sur le site « Fishersci.fr », soit environ 16677 DA pour un seul test, 10 fois plus cher que notre test.

Pour les patients PTI positifs, l'intensité du signal MFI de l'IgG ou l'IgM est bien corrélé avec la variation du taux des plaquettes, ce qui permettra une surveillance de l'évolution du titre d'anticorps chez le patient durant le traitement et après l'arrêt. Le dépistage des PAIg par CMF est également très utile dans les cas complexes, comme les patients réfractaires aux traitements de première et deuxième ligne, et les cas de thrombopénies médicamenteuses⁽⁷⁾. Dans notre série, on a deux cas de thrombopénies chroniques sans réponse aux différents traitements : corticoïdes, gamma globulines, rituximab, le test réalisé chez les deux patients est revenu positif confirmant le mécanisme immunologique. Dans ces cas la recherche de la spécificité de l'anticorps est également utile, elle peut fournir des renseignements sur le mécanisme de destruction plaquettaire afin d'expliquer cette résistance au traitement, principalement les anti-GPIbIX qui induisent la destruction

plaquettaire par désialylation⁽³⁸⁷⁾. Un autre cas particulier dépisté dans notre série, est celui d'un patient adulte présentant une thrombopathie (maladie de Bernard-Soulier), associée à une thrombopénie modérée depuis la petite enfance, le patient a développé une thrombopénie sévère aiguë avec un syndrome hémorragique grade 3 OMS, ne répondant pas à la transfusion de concentrés plaquettaires qui était la conduite à tenir habituelle dans le cas d'hémorragie grave. Le test PAIg réalisé chez le patient est revenu fortement positif IgG, le patient a été mis sous corticoïdes où on a observé une augmentation rapide du taux de plaquettes et atténuation de l'hémorragie avec la négativité du test PAIg.

L'avantage des techniques de CMF, PAIg ou FCIA, c'est qu'elles permettent une analyse des plaquettes même dans le cas des thrombopénies les plus sévères, contrairement aux techniques ELISA qui nécessitent une certaine richesse plaquettaire pour leur réalisation. Dans notre série on a pu analyser des cas de thrombopénies sévères jusqu'à 2G/l, sans aucune difficulté.

Parmi les défis de cette technique, c'est la standardisation des résultats entre les laboratoires et dans le même laboratoire également. La MFI obtenue est influencée par l'énergie du laser installé sur le cytomètre, les filtres, les PMT et leur voltage, les anticorps utilisés et leurs caractéristiques. Dans le cas du changement de réactif, on a réalisé une calibration par changement du voltage PMT afin de le rendre similaire au réactif précédent, mais cette approche ne sera possible dans d'autres situations, comme le changement du cytomètre par exemple. On propose une calibration à l'aide de billes standard dont la MFI est connue, qui vont permettre d'effectuer les réglages nécessaires du cytomètre.

Par les modifications apportées à cette technique, la spécificité s'est considérablement améliorée, et les résultats sont très prometteurs, cependant d'autres améliorations sont nécessaires, figurant dans nos prochains projets principalement : l'identification des anticorps spécifiques par la technique FCIA et la calibration inter-laboratoires par des billes standards.

F. Quantification des PAIg et suivi des patients

Historiquement les essais de quantification des PAIg avaient comme objectifs d'améliorer la spécificité de la technique PAIg d'une part et de fournir un moyen de suivi des patients atteint du PTI^(339, 342). La technique de PAIg est caractérisée par son excellente sensibilité mais avec une spécificité variable à cause de la détection des Ig de surface d'une manière non spécifique. La recherche spécifique des anticorps anti-glycoprotéines plaquettaires et leurs quantifications étaient proposées comme des moyens d'amélioration de la spécificité de la technique.

L'utilisation de nouvelles technologies sur les cytomètres des dernières générations a permis la résolution de plusieurs problèmes relatifs au bruit de fond et la fluorescence non

spécifique. L'optimisation des différentes étapes de préparation de l'échantillon, le choix d'anticorps et les réglages de l'instrument, a permis d'améliorer la spécificité de la détection des PAIg à 95,5% en utilisant l'anti-IgG et l'anti-IgM, indépendamment de la quantification des PAIg.

Dans notre étude on a obtenue une parfaite corrélation entre la MFI et le taux de PAIg fixés à la surface plaquettaire, donc la surveillance du titre d'anticorps peut être effectuée directement par la détermination de la MFI obtenue, on a également mis en évidence une corrélation entre la MFI et le risque de thrombopénie sévère. Les patients présentant une MFI supérieur à 18.10^3 présentent 5 fois plus de risque de développer une thrombopénie à moins de 30G/L, ce taux de plaquettes a été choisi parce qu'il constitue la valeur seuil à partir de laquelle un traitement immunosuppresseur de première intention est indiqué selon les recommandations de l'ASH. Le suivi des patients présentant un PTI a montré une excellente concordance entre la MFI et le taux de plaquettes estimée à 94,8%, en utilisant le même lot de réactif. Le changement du lot de réactif ou d'instrument influence la MFI obtenue, donc il est indispensable d'effectuer un étalonnage à l'aide des billes ou bien des plaquettes humaines pour chaque nouveau lot de réactif afin de permettre le suivi des patients PTI.

G. Identification des PAIg

L'identification des anticorps antiplaquettaires a été réalisée chez 28 patients. Dont seulement trois ont été validés. Plusieurs problèmes ont été rencontrés durant l'application de cette technique, qui sont liées principalement à la qualité et à la nature des billes de capture. Le kit des billes de capture est destiné à la réalisation des réglages de compensation du cytomètre. Ce sont des billes de 6,4 μm de diamètre, sensibilisées par des anticorps anti-mouse kappa et bloquées par le PBS/BSA. Les billes de capture anti-mouse Ig ne fixent pas les anticorps d'origine « Goat » comme notre anticorps « Goat anti-human IgG FITC ». Cependant après incubation avec l'hémolysat plaquettaire et en présence de triton, il y'a eu une fixation du Goat anti-IgG sur les billes même en absence des anticorps antiplaquettaires (CD42b, CD41a, CD42a et CD61).

C'est pour cette raison que cette technique a été abandonnée, jusqu'à l'obtention des billes plus adaptées. Une commande des billes a été envoyée au fournisseur et on les a réceptionnées en mois de janvier 2023 (Tableau 52).

Tableau 52: Désignation des billes pour le test FCIA

Billes	Marque	Référence
Nonionic Late Beads, 4% w/v, 5 μm	Invitrogen™	N37460
Opti-Link™ Carboxylate-Modified Particles 5.0 μm	Thermo Scientific™	W500CA

CONCLUSION

La thrombopénie immunologique est un désordre immunologique induisant une thrombopénie associée à un syndrome hémorragique qui peut menacer le pronostic vital du patient. La prise en charge thérapeutique est basée sur l'immunosuppression, cependant la compréhension des mécanismes physiopathologiques a permis le développement de nouvelles thérapeutiques ciblées, qui font actuellement l'objet des études et des essais. Le diagnostic biologique est une étape indispensable dans la conduite à tenir du PTI. Il est basé sur l'exclusion de toutes les étiologies de thrombopénie afin de justifier l'utilisation des traitements conventionnels immunosuppresseurs, selon les recommandations des sociétés savantes internationales.

Bien que la recherche des anticorps antiplaquettes n'est pas encore introduite dans la démarche diagnostique du PTI, elle est de plus en plus utilisée par de nombreux laboratoires à travers le monde. En Asie, les sociétés japonaise et chinoise recommandent l'utilisation de ces tests dans le diagnostic des cas compliqués. Il existe plusieurs techniques de recherche d'anticorps antiplaquettes, on cite les techniques dérivées d'ELISA, principalement la MAIPA, qui sont des techniques de choix pour le diagnostic et la surveillance des allo-immunisations antiplaquettaires, mais moins performantes dans les cas d'auto-immunité. Les techniques par cytométrie en flux sont très sensibles à la présence des auto-anticorps, rapides, simples et adaptés à l'usage en routine, inversement leur inconvénient majeur réside dans la mauvaise spécificité due au nombre de cas faux positifs enregistré.

L'optimisation des différentes étapes de la réalisation de la recherche directe des PAIg par CMF a permis l'amélioration de sa spécificité à 95,5% avec une bonne sensibilité à 84,3%. En outre, le rapport de vraisemblance était à 19 IC [10-36], confirmant l'apport important de cette technique dans le diagnostic du PTI. Cette technique permet la mise en évidence d'anticorps antiplaquettes d'isotype IgG et IgM, qui sont dirigés principalement contre les GP plaquettaire, mais également contre le système HLA ou les antigènes de groupes sanguins. La technique FCIA, avait l'objectif d'améliorer la spécificité par l'identification des GP cibles, mais elle perd de la sensibilité, car elle ne détecte pas les auto-anticorps du système HLA, groupes sanguins ou autres. Cependant l'identification des GP pourrait avoir un intérêt thérapeutique et pronostique, surtout en ce qui concerne les anticorps anti-GPIb induisant la désialylation plaquettaire.

La technique du PAIg directe optimisée au niveau de notre laboratoire durant cette étude, est caractérisée par sa simplicité, sa rapidité et son coût très réduit, en plus des bonnes performances analytiques intrinsèques et extrinsèques, elle est donc très prometteuse pour qu'elle soit appliquée en pratique courante comme un test diagnostique de routine dans le cas des thrombopénies immunologiques, tout en appliquant les

CONCLUSION

recommandations relatifs à la sélection et la préparation des échantillons, l'analyse et l'interprétation des résultats citées ci-dessus (chapitre E). La principale limite de cette technique réside dans la standardisation des résultats inter-laboratoires, les normes doivent être évaluées et réajuster à chaque changement de réactifs ou d'équipement, ce qui incite à lancer une étude similaire multicentrique à la recherche d'un moyen permettant la standardisation des résultats.

Références

1. Neunert C, Lim W, Crowther M, Cohen A, Solberg L, Jr., Crowther MA, et al. The American Society of Hematology 2011 evidence-based practice guideline for immune thrombocytopenia. *Blood*. 2011;117(16):4190-207. Epub 2011/02/18.
2. Moulis G, Lapeyre-Mestre M, Adoue D, Sailler L. [Epidemiology and pharmacoepidemiology of immune thrombocytopenia]. *Rev Med Interne*. 2017;38(7):444-9. Epub 2017/01/31. Epidemiologie et pharmacoepidemiologie du purpura thrombopenique immunologique.
3. Provan D. Characteristics of immune thrombocytopenic purpura: a guide for clinical practice. *European Journal of Haematology*. 2009;82:8–12.
4. Stockelberg D, Hou M, Jacobsson S, Kutti J, Wadenvik H. Detection of Platelet antibodies in chronic idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP). A comparative study using flow cytometry, a whole platelet ELISA, and an antigen capture ELISA. *Eur J Haematol* 1996;56:72-7.
5. He Y, Zhao YX, Zhu MQ, Wu Q, Ruan CG. Detection of autoantibodies against platelet glycoproteins in patients with immune thrombocytopenic purpura by flow cytometric immunobead array. *Clin Chim Acta*. 2013;415:176-80. Epub 2012/10/30.
6. Nielsen OH, Tuckuviene R, Nielsen KR, Rosthoj S. Flow cytometric measurement of platelet-associated immunoglobulin in children with newly diagnosed Immune Thrombocytopenia. *Eur J Haematol*. 2016;96(4):397-403. Epub 2015/06/26.
7. Liu X-g, Bai X-c, Chen F-p, Cheng Y-f, Dai K-s, Fang M-y, et al. Chinese guidelines for treatment of adult primary immune thrombocytopenia. *International Journal of Hematology*. 2018;107(6):615-23.
8. British-Committee-for-Standards-in-Haematology-General-Haematology-Task-Force. Guidelines for the investigation and management of idiopathic thrombocytopenic purpura in adults, children and in pregnancy. *British journal of haematology*. 2003;120(1):574-96.
9. Provan D, Stasi R, Newland AC, Blanchette VS, Bolton-Maggs P, Bussel JB, et al. International consensus report on the investigation and management of primary immune thrombocytopenia. *Blood*. 2010;115(2):168-86.
10. George JN, Woolf SH, Raskob GE, Wasser JS, Aledort LM, Ballem PJ, et al. Idiopathic Thrombocytopenic Purpura: A Practice Guideline Developed by Explicit Methods for The American Society of Hematology. *Blood*. 1996;88(1):3-40.
11. Arnold DM, Nazy I, Clare R, Jaffer AM, Aubie B, Li N, et al. Misdiagnosis of primary immune thrombocytopenia and frequency of bleeding: lessons from the McMaster ITP Registry. *Blood Advances*. 2017;1(25):2414-20.
12. Bryant N, Watts R. Thrombocytopenic Syndromes Masquerading as Childhood Immune Thrombocytopenic Purpura. 2011;50(3):225-30.
13. Neunert C, Terrell DR, Arnold DM, Buchanan G, Cines DB, Cooper N, et al. American Society of Hematology 2019 guidelines for immune thrombocytopenia. 2019;3(23):3829-66.
14. Woolthuis.CM, Park.CY. Hematopoietic stem/progenitor cell commitment to the megakaryocyte lineage. *Blood*. 2016;127(10):1242–8.
15. Machlus KR, Italiano JE. Megakaryocyte Development and Platelet Formation. *Platelets*2019. p. 25-46.
16. Nakorn.TN, Miyamoto.T, Weissman.IL. Characterization of mouse clonogenic megakaryocyte progenitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(1):205–10.
17. Adolfsson.J BO, Bryder.D, Theilgaard-Monch.K, AstrandGrundstrom.I, Sitnicka.E. Upregulation of Flt3 expression within the bone marrow Lin(-)Sca1(+)-c-kit(+) stem cell compartment is accompanied by loss of self-renewal capacity. *Immunity*. 2001;15(4):659–69.
18. Haas.S HJ, Klimmeck.D, Loeffler.D, Velten.L, Uckelmann.H, et al. Inflammation-induced emergency Megakaryopoiesis driven by hematopoietic stem cell-like megakaryocyte progenitors. *Cell Stem Cell* 2015;17(4):422–34.
19. Nakeff.A D-MS. In vitro colony assay for a new class of megakaryocyte precursor: colony-forming unit megakaryocyte (CFU-M). *Proc Soc Exp Biol Med* 1976;151(3):587–90.
20. Briddell.RA BJ, Straneva.JE, Srour.EF, Hoffman.R. Characterization of the human burst-forming unit-megakaryocyte. *Blood*. 1989;74(1):145–51.
21. Therman.E SGE, Stubblefield.P.A. Endomitosis: a reappraisal. *Hum Genet* 1983;63(1):13–8.
22. Vitrat.N C-SK, Pique.C, Le Couedic.J.P, Norol.F., Larsen.A.K ea. Endomitosis of human megakaryocytes are due to abortive mitosis. *Blood*. 1998;91(10):3711–23.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

23. Kautz.J DMQ. Electron microscopy of sectioned blood and bone marrow elements. *Rev Hematol* 1955;10(2):314–23.
24. Eckly.A HH, Pertuy.F, Geerts.W, Proamer.F, Rinckel.J.Y, et al. Biogenesis of the demarcation membrane system (DMS) in megakaryocytes. *Blood*. 2014;123(6):921–30.
25. Linden MD. Platelet physiology. *Methods Mol Biol*. 2013;992:13-30. Epub 2013/04/03.
26. Lefrançois E, Ortiz-Muñoz G, Caudrillier A, Mallavia B, Liu F, Sayah DM, et al. The lung is a site of platelet biogenesis and a reservoir for haematopoietic progenitors. *Nature*. 2017;544(7648):105-9.
27. Behnke O, Forer A. From megakaryocytes to platelets: platelet morphogenesis takes place in the bloodstream. *European journal of haematology Supplementum*. 1998;61:3-23. Epub 1998/07/11.
28. Ihzumi.T HA, Sanada.M, Muto.M. Megakaryocyte and platelet formation: a scanning electron microscope study in mouse spleen. *Arch Histol Jpn* 1977;40(4):305–20.
29. Kosaki.G. In vivo platelet production from mature megakaryocytes: does platelet release occur via proplatelets. *Int J Hematol*. 2005;81(3):208–19.
30. Machlus KR, Italiano JE, Jr. The incredible journey: From megakaryocyte development to platelet formation. *Journal of Cell Biology*. 2013;201(6):785-96.
31. Thon JN, Montalvo A, Patel-Hett S, Devine MT, Richardson JL, Ehrlicher A, et al. Cytoskeletal mechanics of proplatelet maturation and platelet release. *Journal of Cell Biology*. 2010;191(4):861-74.
32. Cramer-Bordé E. Production plaquettaire : régulation cellulaire et moléculaire. EMC - Hématologie. 2008;3:1-10.
33. Suzukawa K, Satoh H, Taniwaki M, Yokota J, Morishita K. The human thrombopoietin gene is located on chromosome 3q26.33-q27, but is not transcriptionally activated in leukemia cells with 3q21 and 3q26 abnormalities (3q21q26 syndrome). *Leukemia*. 1995;9(8):1328-31. Epub 1995/08/01.
34. Hitchcock IS, Kaushansky K. Thrombopoietin from beginning to end. *British journal of haematology*. 2014;165(2):259-68. Epub 2014/02/07.
35. Kaushansky K. Thrombopoiesis. *Seminars in hematology*. 2015;52(1):4-11. Epub 2015/01/13.
36. Kaushansky K, Lok S, Holly RD, Broudy VC, Lin N, Bailey MC, et al. Promotion of megakaryocyte progenitor expansion and differentiation by the c-Mpl ligand thrombopoietin. *Nature*. 1994;369(6481):568-71. Epub 1994/06/16.
37. Kaushansky K. The molecular mechanisms that control thrombopoiesis. *The Journal of Clinical Investigation*. 2005;115(12):3339-47.
38. Kaushansky K, Broudy VC, Lin N, Jorgensen MJ, McCarty J, Fox N, et al. Thrombopoietin, the Mp1 ligand, is essential for full megakaryocyte development. 1995;92(8):3234-8.
39. Thomas SG. The Structure of Resting and Activated Platelets. *Platelets*2019. p. 47-77.
40. O'Donnell VB, Murphy RC, Watson SP. Platelet Lipidomics. 2014;114(7):1185-203.
41. Fadeel B, Xue D. The ins and outs of phospholipid asymmetry in the plasma membrane: roles in health and disease. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. 2009;44(5):264-77.
42. Collier BS. Biochemical and electrostatic considerations in primary platelet aggregation a. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1983;416(1):693-708.
43. Harrison P, Wilbourn B, Debili N, Vainchenker W, Breton-Gorius J, Lawrie A, et al. Uptake of plasma fibrinogen into the alpha granules of human megakaryocytes and platelets. 1989;84(4):1320-4.
44. Cho J, Kim H, Song J, Cheong J-W, Shin JW, Yang WI, et al. Platelet storage induces accelerated desialylation of platelets and increases hepatic thrombopoietin production. 2018;16(1):199.
45. White JG, Krumwiede MD, Cocking-Johnson DJ, Escolar GJTAjop. Dynamic redistribution of glycoprotein Ib/IX on surface-activated platelets. A second look. 1995;147(4):1057.
46. Schulze H, Korpál M, Hurov J, Kim S-W, Zhang J, Cantley LC, et al. Characterization of the megakaryocyte demarcation membrane system and its role in thrombopoiesis. 2006;107(10):3868-75.
47. White J, Escolar GJEjob. The blood platelet open canalicular system: a two-way street. 1991;56(2):233.
48. White JGJP. Platelets are coverocytes, not phagocytes: uptake of bacteria involves channels of the open canalicular system. 2005;16(2):121-31.
49. Brass LJJoBC. The effect of Na⁺ on Ca²⁺ homeostasis in unstimulated platelets. 1984;259(20):12571-5.
50. Carey F, Menashi S, Crawford NJBJ. Localization of cyclo-oxygenase and thromboxane synthetase in human platelet intracellular membranes. 1982;204(3):847-51.
51. Blair P, Flaumenhaft RJBr. Platelet α -granules: basic biology and clinical correlates. *Blood reviews* 2009;23(4):177-89.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

52. Berman C, Yeo E, Wencel-Drake J, Furie B, Ginsberg M, Furie BJTJoci. A platelet alpha granule membrane protein that is associated with the plasma membrane after activation. Characterization and subcellular localization of platelet activation-dependent granule-external membrane protein. *Journal of clinical investigation*. 1986;78(1):130-7.
53. Banerjee M, Whiteheart, W S. The ins and outs of endocytic trafficking in platelet functions. *Current opinion in hematology*. 2017;24(5):467.
54. Flaumenhaft R, Sharda A. Platelet Secretion. *Platelets*2019. p. 349-70.
55. Blair Price FR. Platelet α -granules: basic biology and clinical correlates. *Blood reviews* 2009;23(4):177-89.
56. Coppinger JA, Cagney G, Toomey S, Kislinger T, Belton O, McRedmond JP, et al. Characterization of the proteins released from activated platelets leads to localization of novel platelet proteins in human atherosclerotic lesions. *J Blood* 2004;103(6):2096-104.
57. McNicol AI, J S. Platelet dense granules: structure, function and implications for haemostasis. *Thrombosis research*. 1999;95(1):1-18.
58. Müller F, Mutch NJ, Schenk WA, Smith SA, Esterl L, Spronk HM, et al. Platelet polyphosphates are proinflammatory and procoagulant mediators in vivo. *J Cell*. 2009;139(6):1143-56.
59. Reed GL, editor. Platelet secretory mechanisms. *Seminars in thrombosis and hemostasis*; 2004: Copyright© 2004 by Thieme Medical Publishers, Inc., 333 Seventh Avenue, New
60. Clemetson KJ, Clemetson JM. Platelet Receptors. *Platelets*2019. p. 169-92.
61. Wagner CL, Mascelli MA, Neblock DS, Weisman HF, Collier BS, Jordan RE. Analysis of GPIIb/IIIa receptor number by quantification of 7E3 binding to human platelets. 1996.
62. Niiya K, Hodson E, Bader R, Byers-Ward V, Koziol JA, Plow EF, et al. Increased surface expression of the membrane glycoprotein IIb/IIIa complex induced by platelet activation. Relationship to the binding of fibrinogen and platelet aggregation. 1987.
63. Bennett JS. Structure and function of the platelet integrin α IIb β 3. *J The Journal of clinical investigation*. 2005;115(12):3363-9.
64. Poncz M, Eisman R, Heidenreich R, Silver S, Vilaire G, Surrey S, et al. Structure of the platelet membrane glycoprotein IIb. Homology to the alpha subunits of the vitronectin and fibronectin membrane receptors. *Journal of Biological Chemistry* 1987;262(18):8476-82.
65. Ruoslahti E. RGD and other recognition sequences for integrins. *Annual review of cell developmental biology* 1996;12(1):697-715.
66. Cheresch DA, Berliner SA, Vicente V, Ruggeri ZM. Recognition of distinct adhesive sites on fibrinogen by related integrins on platelets and endothelial cells. *Cell*. 1989;58(5):945-53.
67. Carman CV, Springer TA. Integrin avidity regulation: are changes in affinity and conformation underemphasized? *Current opinion in cell biology* 2003;15(5):547-56.
68. Hynes RO. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *cell*. 2002;110(6):673-87.
69. Nieswandt B, Watson SP. Platelet-collagen interaction: is GPVI the central receptor? *Blood*. 2003;102(2):449-61.
70. Kasirer-Friede A, Cozzi MR, Mazzucato M, De Marco L, Ruggeri ZM, Shattil SJ. Signaling through GP Ib-IX-V activates α IIb β 3 independently of other receptors. *Blood*. 2004;103(9):3403-11.
71. Coughlin SR. Thrombin signalling and protease-activated receptors. *Nature*. 2000;407(6801):258-64.
72. Nakahata N. Thromboxane A2: physiology/pathophysiology, cellular signal transduction and pharmacology. *Pharmacology and therapeutics*. 2008;118(1):18-35.
73. Abrams CS. Intracellular signaling in platelets. *Curr Opin Hematol*. 2005;12(5):401-5. Epub 2005/08/12.
74. Staatz WD, Rajpara SM, Wayner EA, Carter WG, Santoro SA. The membrane glycoprotein Ia-IIa (VLA-2) complex mediates the Mg⁺⁺-dependent adhesion of platelets to collagen. *Journal of Cell Biology*. 1989;108(5):1917-24.
75. Clemetson KJ, Clemetson JM. Platelet collagen receptors. *Thrombosis haemostasis*. 2001;86(07):189-97.
76. Sarratt KL, Chen H, Zutter MM, Santoro SA, Hammer DA, Kahn ML. GPVI and α 2 β 1 play independent critical roles during platelet adhesion and aggregate formation to collagen under flow. *Blood*. 2005;106(4):1268-77.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

77. Maurer E, Schaff M, Receveur N, Bourdon C, Mercier L, Nieswandt B, et al. Fibrillar cellular fibronectin supports efficient platelet aggregation and procoagulant activity. *Thrombosis haemostasis*. 2015;114(12):1175-88.
78. Simic D, Bogdan N, Teng F, Otieno M. Blocking $\alpha 5\beta 1$ integrin attenuates sCD40L-mediated platelet activation. *Clinical Applied Thrombosis/Hemostasis*. 2017;23(6):607-14.
79. Schaff M, Tang C, Maurer E, Bourdon C, Receveur N, Eckly A, et al. Integrin $\alpha 6\beta 1$ is the main receptor for vascular laminins and plays a role in platelet adhesion, activation, and arterial thrombosis. *Circulation*. 2013;128(5):541-52.
80. Philippeaux MM, Vesin C, Tacchini-Cottier F, Piguet PF. Activated human platelets express $\beta 2$ integrin. *European journal of haematology*. 1996;56(3):130-7.
81. J Bernard, J.P.Soulier. Sur une nouvelle variété de dystrophie thrombocytaire-hémorragipare congénitale. *J Semi Hop Paris*. 1948;24:3217-23.
82. Burkhardt JM, Vaudel M, Gambaryan S, Radau S, Walter U, Martens L, et al. The first comprehensive and quantitative analysis of human platelet protein composition allows the comparative analysis of structural and functional pathways. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 2012;120(15):e73-e82.
83. Luo S-Z, Mo X, Afshar-Kharghan V, Srinivasan S, López JA, Li R. Glycoprotein Iba forms disulfide bonds with 2 glycoprotein Ib β subunits in the resting platelet. *Blood*. 2007;109(2):603-9.
84. Müller JP, Mielke S, Löf A, Obser T, Beer C, Bruetzel LK, et al. Force sensing by the vascular protein von Willebrand factor is tuned by a strong intermonomer interaction. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2016;113(5):1208-13.
85. De Candia E, Hall SW, Rutella S, Landolfi R, Andrews RK, De Cristofaro R. Binding of thrombin to glycoprotein Ib accelerates the hydrolysis of Par-1 on intact platelets. *Journal of Biological Chemistry*. 2001;276(7):4692-8.
86. Bradford HN, Dela Cadena RA, Kunapuli SP, Dong J-F, Lopez JA, Colman RW. Human kininogens regulate thrombin binding to platelets through the glycoprotein Ib-IX-V complex. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 1997;90(4):1508-15.
87. Simon DI, Chen Z, Xu H, Li CQ, Dong J-f, McIntire LV, et al. Platelet glycoprotein Iba is a counterreceptor for the leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18). *The Journal of experimental medicine*. 2000;192(2):193-204.
88. Romo GM, Dong J-F, Schade AJ, Gardiner EE, Kansas GS, Li CQ, et al. The glycoprotein Ib-IX-V complex is a platelet counterreceptor for P-selectin. *The Journal of experimental medicine*. 1999;190(6):803-14.
89. Gangarosa EJ, Landerman NS, Rosch PJ, Herndon Jr E. Hematologic complications arising during ristocetin therapy: relation between dose and toxicity. *New England Journal of Medicine*. 1958;259(4):156-61.
90. Zheng XL, Sadler JE. Pathogenesis of thrombotic microangiopathies. *Annu Rev Pathol Mech Dis*. 2008;3:249-77.
91. Federici AB, Mannucci PM, Castaman G, Baronciani L, Bucciarelli P, Canciani MT, et al. Clinical and molecular predictors of thrombocytopenia and risk of bleeding in patients with von Willebrand disease type 2B: a cohort study of 67 patients. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 2009;113(3):526-34.
92. Zeng Q, Zhu L, Tao L, Bao J, Yang M, Simpson EK, et al. Relative efficacy of steroid therapy in immune thrombocytopenia mediated by anti-platelet GPIIb/IIIa versus GPIb α antibodies. *American journal of hematology*. 2012;87(2):206-8.
93. Go RS, Johnston KL, Bruden KC. The association between platelet autoantibody specificity and response to intravenous immunoglobulin G in the treatment of patients with immune thrombocytopenia. *Haematologica*. 2007;92(2):283-4.
94. Peng J, Ma SH, Liu J, Hou Y, Liu XM, Niu T, et al. Association of autoantibody specificity and response to intravenous immunoglobulin G therapy in immune thrombocytopenia: a multicenter cohort study. *Journal of Thrombosis Haemostasis*. 2014;12(4):497-504.
95. Bergmeier W, Rackebandt K, Schröder W, Zirngibl H, Nieswandt B. Structural and functional characterization of the mouse von Willebrand factor receptor GPIb-IX with novel monoclonal antibodies. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 2000;95(3):886-93.
96. Li J, van der Wal D, Zhu G, Xu M, Yougbare I, Ma L, et al. Desialylation is a mechanism of Fc-independent platelet clearance and a therapeutic target in immune thrombocytopenia. *Nat Commun* 6: 7737. 2015.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

97. Quach ME, Dragovich MA, Chen W, Syed AK, Cao W, Liang X, et al. Fc-independent immune thrombocytopenia via mechanomolecular signaling in platelets. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 2018;131(7):787-96.
98. Cauwenberghs N, Meiring M, Vauterin S, van Wyk V, Lamprecht S, Roodt JP, et al. Antithrombotic effect of platelet glycoprotein Ib-blocking monoclonal antibody Fab fragments in nonhuman primates. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2000;20(5):1347-53. Epub 2000/05/16.
99. Liang X, Syed AK, Russell SR, Ware J, Li R. Dimerization of glycoprotein Iba is not sufficient to induce platelet clearance. *Journal of Thrombosis Haemostasis*. 2016;14(2):381-6.
100. Li R. The Glycoprotein Ib-IX-V Complex. *Platelets*2019. p. 193-211.
101. Poujol C, Ware J, Nieswandt B, Nurden AT, Nurden P. Absence of GPIba is responsible for aberrant membrane development during megakaryocyte maturation: ultrastructural study using a transgenic model. *Experimental hematology*. 2002;30(4):352-60.
102. Shiraki R, Inoue N, Kawasaki S, Takei A, Kadotani M, Ohnishi Y, et al. Expression of Toll-like receptors on human platelets. *Thrombosis research*. 2004;113(6):379-85.
103. Furman MI, Liu L, Benoit SE, Becker RC, Barnard MR, Michelson AD. The cleaved peptide of the thrombin receptor is a strong platelet agonist. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1998;95(6):3082-7.
104. Kahn ML, Nakanishi-Matsui M, Shapiro MJ, Ishihara H, Coughlin SR. Protease-activated receptors 1 and 4 mediate activation of human platelets by thrombin. *The Journal of clinical investigation*. 1999;103(6):879-87.
105. Estevez B, Kim K, Delaney MK, Stojanovic-Terpo A, Shen B, Ruan C, et al. Signaling-mediated cooperativity between glycoprotein Ib-IX and protease-activated receptors in thrombin-induced platelet activation. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 2016;127(5):626-36.
106. Sebastiano M, Momi S, Falcinelli E, Bury L, Hoylaerts MF, Gresele P. A novel mechanism regulating human platelet activation by MMP-2-mediated PAR1 biased signaling. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 2017;129(7):883-95.
107. Baker NC, Lipinski MJ, Lhermusier T, Waksman R. Overview of the 2014 food and drug administration cardiovascular and renal drugs advisory committee meeting about vorapaxar. *Circulation*. 2014;130(15):1287-94.
108. Leonardi S, Tricoci P, White HD, Armstrong PW, Huang Z, Wallentin L, et al. Effect of vorapaxar on myocardial infarction in the thrombin receptor antagonist for clinical event reduction in acute coronary syndrome (TRA-CER) trial. *European heart journal*. 2013;34(23):1723-31.
109. Mangin P, Ohlmann P, Eckly A, Cazenave JP, Lanza F, Gachet C. The P2Y1 receptor plays an essential role in the platelet shape change induced by collagen when TxA2 formation is prevented. *Journal of Thrombosis Haemostasis* 2004;2(6):969-77.
110. Clemetson KJ, Clemetson JM, Proudfoot AE, Power CA, Baggiolini M, Wells TN. Functional expression of CCR1, CCR3, CCR4, and CXCR4 chemokine receptors on human platelets. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 2000;96(13):4046-54.
111. Lova P, Campus F, Lombardi R, Cattaneo M, Sinigaglia F, Balduino C, et al. Contribution of protease-activated receptors 1 and 4 and glycoprotein Ib-IX-V in the Gi-independent activation of platelet Rap1B by thrombin. *Journal of Biological Chemistry*. 2004;279(24):25299-306.
112. Léon C, Freund M, Ravanat C, Baurand A, Cazenave J-P, Gachet C. Key Role of the P2Y1 Receptor in Tissue Factor-Induced Thrombin-Dependent Acute Thromboembolism: Studies in P2Y1-Knockout Mice and Mice Treated With a P2Y1 Antagonist. *Circulation*. 2001;103(5):718-23.
113. Cattaneo M, Savage B, Ruggeri Z, editors. Effects of pharmacological inhibition of the P2Y1 and P2Y12 ADP receptors on shear-induced platelet aggregation and platelet thrombus formation on a collagen-coated surface under flow conditions. *Blood*; 2001: amer soc hematology 1900 m street. Nw suite 200, Washington, DC 20036 USA.
114. Rolf MG, Brearley CA, Mahaut-Smith MP. Platelet shape change evoked by selective activation of P2X1 purinoceptors with α , β -methylene ATP. *Thrombosis haemostasis*. 2001;85(02):303-8.
115. Toth-Zsomboki E, Oury C, Cornelissen H, De Vos R, Vermeylen J, Hoylaerts MF. P2X1-mediated ERK2 activation amplifies the collagen-induced platelet secretion by enhancing myosin light chain kinase activation. *Journal of Biological Chemistry*. 2003;278(47):46661-7.
116. Breyer RM, Bagdassarian CK, Myers SA, Breyer MD. Prostanoid receptors: subtypes and signaling. *Annual review of pharmacology toxicology*. 2001;41(1):661-90.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

117. Moscardó A, Vallés J, Latorre A, Santos M. The association of thromboxane A2 receptor with lipid rafts is a determinant for platelet functional responses. *FEBS letters*. 2014;588(17):3154-9.
118. Smyth EM, FitzGerald GA. Human prostacyclin receptor. *Vitamins and hormones*. 2002;65:149-65. Epub 2002/12/17.
119. Iwahashi M, Naganawa A, Kinoshita A, Shimabukuro A, Nishiyama T, Ogawa S, et al. Discovery of new orally active prostaglandin D2 receptor antagonists. *Bioorganic medicinal chemistry*. 2011;19(22):6935-48.
120. Burgers JA, Akkerman J-WN. Regulation of the receptor for platelet-activating factor on human platelets. *Biochemical Journal*. 1993;291(1):157-61.
121. Manning M, Stoev S, Chini B, Durroux T, Mouillac B, Guillon G. Peptide and non-peptide agonists and antagonists for the vasopressin and oxytocin V1a, V1b, V2 and OT receptors: research tools and potential therapeutic agents. *Progress in brain research*. 2008;170:473-512.
122. Classics Born GVR. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature*. 1962;194:927-9.
123. Steinhilber ME, Fisher R, Revtyak G, Hanahan D, Olson M. β 2-Adrenergic agonist regulation of immune aggregate-and platelet-activating factor-stimulated hepatic metabolism. *Journal of Biological Chemistry*. 1989;264(19):10976-81.
124. Kagaya A, Mikuni M, Yamamoto H, Muraoka S, Yamawaki S, Takahashi K. Heterologous supersensitization between serotonin 2 and alpha 2-adrenergic receptor-mediated intracellular calcium mobilization in human platelets. *Journal of Neural Transmission/General Section JNT*. 1992;88(1):25-36.
125. Yamada S, Akita H, Kanazawa K, Ishida T, Hirata K-i, Ito K, et al. T102C polymorphism of the serotonin (5-HT) 2A receptor gene in patients with non-fatal acute myocardial infarction. *Atherosclerosis*. 2000;150(1):143-8.
126. Ricci A, Bronzetti E, Mannino F, Mignini F, Morosetti C, Tayebati SK, et al. Dopamine receptors in human platelets. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*. 2001;363(4):376-82.
127. Schedel A, Thornton S, Schloss P, Klüter H, Bugert P. Human platelets express functional α 7-nicotinic acetylcholine receptors. *Arteriosclerosis, thrombosis, vascular biology*. 2011;31(4):928-34.
128. V Catani M, Gasperi V, Catanzaro G, Baldassarri S, Bertoni A, Sinigaglia F, et al. Human platelets express authentic CB1 and CB2 receptors. *Current neurovascular research*. 2010;7(4):311-8.
129. Sugiyama T, Okuma M, Ushikubi F, Sensaki S, Kanaji K, Uchino H. A novel platelet aggregating factor found in a patient with defective collagen-induced platelet aggregation and autoimmune thrombocytopenia. 1987;1712-1720.
130. Lockyer S, Okuyama K, Begum S, Le S, Sun B, Watanabe T, et al. GPVI-deficient mice lack collagen responses and are protected against experimentally induced pulmonary thromboembolism. *Thrombosis research*. 2006;118(3):371-80.
131. Grüner S, Prostedna M, Koch M, Miura Y, Schulte V, Jung SM, et al. Relative antithrombotic effect of soluble GPVI dimer compared with anti-GPVI antibodies in mice. *Blood*. 2005;105(4):1492-9.
132. Pinto E, Catalani LH, Lopes NP, Di Mascio P, Colepicolo P. Peridinin as the major biological carotenoid quencher of singlet oxygen in marine algae *Gonyaulax polyedra*. *Biochemical biophysical research communications*. 2000;268(2):496-500.
133. Tsuji M, Ezumi Y, Arai M, Takayama H. A novel association of Fc receptor γ -chain with glycoprotein VI and their co-expression as a collagen receptor in human platelets. *Journal of Biological Chemistry*. 1997;272(38):23528-31.
134. Ezumi Y, Shindoh K, Tsuji M, Takayama H. Physical and functional association of the Src family kinases Fyn and Lyn with the collagen receptor glycoprotein VI-Fc receptor γ chain complex on human platelets. *The Journal of experimental medicine*. 1998;188(2):267-76.
135. Joutsu-Korhonen L, Smethurst PA, Rankin A, Gray E, IJsseldijk M, Onley CM, et al. The low-frequency allele of the platelet collagen signaling receptor glycoprotein VI is associated with reduced functional responses and expression. *Blood*. 2003;101(11):4372-9.
136. Jung SM, Takemura Y, Imamura Y, Hayashi T, Adachi E, Moroi M. Collagen-type specificity of glycoprotein VI as a determinant of platelet adhesion. *Platelets*. 2008;19(1):32-42.
137. Mammadova-Bach E, Ollivier V, Loyau S, Schaff M, Dumont B, Favier R, et al. Platelet glycoprotein VI binds to polymerized fibrin and promotes thrombin generation. *Blood*. 2015;126(5):683-91.
138. Gibbins J, Asselin J, Farndale R, Barnes M, Law C-L, Watson SP. Tyrosine phosphorylation of the Fc receptor γ -chain in collagen-stimulated platelets. *Journal of Biological Chemistry*. 1996;271(30):18095-9.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

139. Gibbins JM, Okuma M, Farnsdale R, Barnes M, Watson SP. Glycoprotein VI is the collagen receptor in platelets which underlies tyrosine phosphorylation of the Fc receptor γ -chain. *FEBS letters*. 1997;413(2):255-9.
140. Gardiner EE, Karunakaran D, Shen Y, Arthur JF, Andrews RK, Berndt MC. Controlled shedding of platelet glycoprotein (GP) VI and GPIb-IX-V by ADAM family metalloproteinases. *Journal of thrombosis haemostasis*. 2007;5(7):1530-7.
141. Andrews RK, Gardiner EE. Basic mechanisms of platelet receptor shedding. *Platelets*. 2017;28(4):319-24.
142. Carlsson LE, Santoso S, Baurichter G, Kroll H, Papenberg S, Eichler P, et al. Heparin-induced thrombocytopenia: new insights into the impact of the Fc γ RIIa-R-H131 polymorphism. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 1998;92(5):1526-31.
143. Zhi H, Rauova L, Hayes V, Gao C, Boylan B, Newman DK, et al. Cooperative integrin/ITAM signaling in platelets enhances thrombus formation in vitro and in vivo. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 2013;121(10):1858-67.
144. Hasegawa S, Pawankar R, Suzuki K, Nakahata T, Furukawa S, Okumura K, et al. Functional expression of the high affinity receptor for IgE (Fc ϵ RI) in human platelets and its' intracellular expression in human megakaryocytes. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 1999;93(8):2543-51.
145. André P. P-selectin in haemostasis. *British journal of haematology*. 2004;126(3):298-306.
146. Frenette PS, Denis CV, Weiss L, Jurk K, Subbarao S, Kehrel B, et al. P-selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL-1) is expressed on platelets and can mediate platelet-endothelial interactions in vivo. *The Journal of experimental medicine*. 2000;191(8):1413-22.
147. Lam FW, Burns AR, Smith CW, Rumbaut RE. Platelets enhance neutrophil transendothelial migration via P-selectin glycoprotein ligand-1. *American Journal of Physiology-Heart Circulatory Physiology*. 2011;300(2):H468-H75.
148. Zwicker JI, Trenor III CC, Furie BC, Furie B. Tissue factor-bearing microparticles and thrombus formation. *Arteriosclerosis, thrombosis, vascular biology*. 2011;31(4):728-33.
149. Suzuki-Inoue K, Fuller GL, García A, Eble JA, Pöhlmann S, Inoue O, et al. A novel Syk-dependent mechanism of platelet activation by the C-type lectin receptor CLEC-2. *Blood*. 2006;107(2):542-9.
150. Zelensky AN, Gready JE. The C-type lectin-like domain superfamily. *The FEBS journal*. 2005;272(24):6179-217.
151. Nagae M, Morita-Matsumoto K, Kato M, Kaneko MK, Kato Y, Yamaguchi Y. A platform of C-type lectin-like receptor CLEC-2 for binding O-glycosylated podoplanin and nonglycosylated rhodocytin. *Structure*. 2014;22(12):1711-21.
152. Kuter DJ. Thrombopoietin Receptor Agonists. *Platelets*2019. p. 1085-110.
153. Zauli G, Vitale M, Falcieri E, Gibellini D, Bassini A, Celeghini C, et al. In vitro senescence and apoptotic cell death of human megakaryocytes. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 1997;90(6):2234-43.
154. Kuter DJ, Beeler DL, Rosenberg RD. The purification of megapoeitin: a physiological regulator of megakaryocyte growth and platelet production. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1994;91(23):11104-8.
155. Li J, Xia Y, Kuter DJ. Interaction of thrombopoietin with the platelet c-mpl receptor in plasma: binding, internalization, stability and pharmacokinetics. *British journal of haematology*. 1999;106(2):345-56.
156. Nakata M, Yada T, Soejima N, Maruyama I. Leptin promotes aggregation of human platelets via the long form of its receptor. *Diabetes*. 1999;48(2):426-9.
157. Vassbotn FS, Havnen OK, Heldin C-H, Holmsen H. Negative feedback regulation of human platelets via autocrine activation of the platelet-derived growth factor alpha-receptor. *Journal of Biological Chemistry*. 1994;269(19):13874-9.
158. Tsiamis AC, Hayes P, Box H, Goodall AH, Bell PR, Brindle NP. Characterization and regulation of the receptor tyrosine kinase Tie-1 in platelets. *Journal of vascular research*. 2000;37(6):437-42.
159. Hajek AS, Joist JH. Platelet insulin receptor. *Methods in enzymology*. 1992;215:398-403.
160. Gould W, Baxi S, Schroeder R, Peng Y, Leadley R, Peterson J, et al. Gas6 receptors Axl, Sky and Mer enhance platelet activation and regulate thrombotic responses. *Journal of Thrombosis Haemostasis*. 2005;3(4):733-41.
161. Nanda N, Bao M, Lin H, Clauser K, Komuves L, Quertermous T, et al. Platelet endothelial aggregation receptor 1 (PEAR1), a novel epidermal growth factor repeat-containing transmembrane receptor, participates in platelet contact-induced activation. *Journal of Biological Chemistry*. 2005;280(26):24680-9.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

162. Polgár J, Clemetson JM, Gengenbacher D, Clemetson KJ. Additional GPI-anchored glycoproteins on human platelets that are absent or deficient in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *FEBS letters*. 1993;327(1):49-53.
163. Kelton JG, Smith JW, Horsewood P, Warner MN, Warkentin TE, Finberg RW, et al. ABH antigens on human platelets: expression on the glycosyl phosphatidylinositol-anchored protein CD109. *Journal of Laboratory Clinical Medicine*. 1998;132(2):142-8.
164. Kashiwagi H, Tomiyama Y, Kosugi S, Shiraga M, Lipsky RH, Nagao N, et al. Family studies of type II CD36 deficient subjects: linkage of a CD36 allele to a platelet-specific mRNA expression defect (s) causing type II CD36 deficiency. *Thrombosis haemostasis*. 1995;74(08):758-63.
165. Lee K, Godeau B, Fromont P, Plonquet A, Debili N, Bachir D, et al. CD36 deficiency is frequent and can cause platelet immunization in Africans. *Transfusion*. 1999;39(8):873-9.
166. Kashiwagi H, Tomiyama Y, Honda S, Kosugi S, Shiraga M, Nagao N, et al. Molecular basis of CD36 deficiency. Evidence that a 478C-> T substitution (proline90-> serine) in CD36 cDNA accounts for CD36 deficiency. *The Journal of clinical investigation*. 1995;95(3):1040-6.
167. Diaz-Ricart M, Tandon NN, Carretero M, Ordinas A, Bastida E, Jamieson G. Platelets lacking functional CD36 (glycoprotein IV) show reduced adhesion to collagen in flowing whole blood. *Blood*. 1993;82(2):491-6.
168. Asch AS, Liu I, Briccetti FM, Barnwell JW, Kwakye-Berko F, Dokun A, et al. Analysis of CD36 binding domains: ligand specificity controlled by dephosphorylation of an ectodomain. *Science*. 1993;262(5138):1436-40.
169. Endemann G, Stanton L, Madden KS, Bryant CM, White RT, Protter AA. CD36 is a receptor for oxidized low density lipoprotein. *Journal of Biological Chemistry*. 1993;268(16):11811-6.
170. Yu GH, Holers VM, Seya T, Ballard L, Atkinson JP. Identification of a third component of complement-binding glycoprotein of human platelets. *J Clin Invest*. 1986;78(2):494-501. Epub 1986/08/01.
171. Febbraio M, Silverstein RL. Identification and characterization of LAMP-1 as an activation-dependent platelet surface glycoprotein. *The Journal of biological chemistry*. 1990;265(30):18531-7. Epub 1990/10/25.
172. Henn V, Slupsky JR, Gräfe M, Anagnostopoulos I, Förster R, Müller-Berghaus G, et al. CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature*. 1998;391(6667):591-4. Epub 1998/02/19.
173. Inwald DP, Peters MJ, Walshe D, Jones A, Davies EG, Klein NJ. Absence of platelet CD40L identifies patients with X-linked hyper IgM syndrome. *Clinical and experimental immunology*. 2000;120(3):499-502. Epub 2000/06/09.
174. Henn V, Steinbach S, Büchner K, Presek P, Kroczeck RA. The inflammatory action of CD40 ligand (CD154) expressed on activated human platelets is temporally limited by coexpressed CD40. *Blood*. 2001;98(4):1047-54. Epub 2001/08/09.
175. Curtis B, McFarland J. Human platelet antigens–2013. *Vox sanguinis*. 2014;106(2):93-102.
176. Van Der Weerd CM, Veenhoven-Vonriesz LE, Nijenhuis LE, Van Loghem J. THE ZW BLOOD GROUP SYSTEM IN PLATELETS. *Vox Sang*. 1963;8:513-30. Epub 1963/09/01.
177. Sullivan MJ, Peterson J, McFarland JG, Bougie D, Aster RH, Curtis BR. A new low-frequency alloantigen (Kha(b)) located on platelet glycoprotein IIIa as a cause of maternal sensitization leading to neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Transfusion*. 2015;55(6 Pt 2):1584-5. Epub 2014/12/17.
178. Brouk H, Halle L, Bertrand G, Neche FZ, Ouelaa H, Kaplan C. Human platelet antigen allele frequencies in different Algerian populations. *Tissue Antigens*. 2010;75(6):673-8. Epub 2010/02/13.
179. Brouk H, Bertrand G, Zitouni S, Djenouni A, Martageix C, Griffi F, et al. HPA antibodies in Algerian multitransfused patients: Prevalence and involvement in platelet refractoriness. *Transfusion and Apheresis Science*. 2015;52(3):295-9.
180. van der Weerd CM. Platelet antigens and iso-immunization: Verlag nicht ermittelbar; 1965.
181. Kiefel V, Vicariot M, Giovangrandi Y, Kroll H, Böhringer M, Greinacher A, et al. Alloimmunization against Iy, a low-frequency antigen on platelet glycoprotein Ib/IX as a cause of severe neonatal alloimmune thrombocytopenic purpura. *Vox Sang*. 1995;69(3):250-4. Epub 1995/01/01.
182. Tobelem G, Levy-Toledano S, Bredoux R, Michel H, Nurden A, Caen JP, et al. New approaches to determination of specific functions of platelet membrane sites. *Nature*. 1976;263(5576):427-9. Epub 1976/09/30.
183. Corral J, Rivera J, González-Conejero R, Vicente V. The number of platelet glycoprotein Ia molecules is associated with the genetically linked 807 C/T and HPA-5 polymorphisms. *Transfusion*. 1999;39(4):372-8. Epub 1999/04/29.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

184. Kelton JG, Smith JW, Horsewood P, Humbert JR, Hayward CP, Warkentin TE. Gova/b alloantigen system on human platelets. *Blood*. 1990;75(11):2172-6. Epub 1990/06/01.
185. Lee RH, Stefanini L, Bergmeier W. Platelet Signal Transduction. *Platelets*2019. p. 329-48.
186. Mutch NJ. Regulation of Fibrinolysis by Platelets. *Platelets*2019. p. 417-31.
187. Koupenova M, Freedman JE. Inhibition of Platelet Function by the Endothelium. *Platelets*2019. p. 311-27.
188. Moro MA, Russel RJ, Celtek S, Lizasoain I, Su Y, Darley-Usmar VM, et al. cGMP mediates the vascular and platelet actions of nitric oxide: confirmation using an inhibitor of the soluble guanylyl cyclase. 1996;93(4):1480-5.
189. Jin RC, Voetsch B, Loscalzo J. Endogenous Mechanisms of Inhibition of Platelet Function. *Microcirculation*. 2005;12(3):247-58.
190. Bellamy TC, Garthwaite J. The receptor-like properties of Nitric oxide-activated soluble guanylyl cyclase in intact cells. In: Sharma RK, editor. *Guanylate Cyclase*. Boston, MA: Springer US; 2002. p. 165-76.
191. Moncada S, Gryglewski R, Bunting S, Vane JR. An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. *Nature*. 1976;263(5579):663-5.
192. BUNTING S, MONCADA S, VANE JR. THE PROSTACYCLIN-THROMBOXANE A₂ BALANCE: PATHOPHYSIOLOGICAL AND THERAPEUTIC IMPLICATIONS. *British Medical Bulletin*. 1983;39(3):271-6.
193. Kaczmarek E, Koziak K, Sévigny J, Siegel JB, Anrather J, Beaudoin AR, et al. Identification and characterization of CD39/vascular ATP diphosphohydrolase. *Journal of Biological* 1996;271(51):33116-22.
194. Savage B, Cattaneo M, Ruggeri ZM. Mechanisms of platelet aggregation. *Curr Opin Hematol*. 2001;8(5):270-6. Epub 2001/10/18.
195. Alberio L, Dale GL. Review article: platelet-collagen interactions: membrane receptors and intracellular signalling pathways. *Eur J Clin Invest*. 1999;29(12):1066-76.
196. Sixma JJ, van Zanten GH, Huizinga EG, van der Plas RM, Verkley M, Wu YP, et al. Platelet adhesion to collagen: an update. *Thromb Haemost*. 1997;78(1):434-8. Epub 1997/07/01.
197. De Marco L, Girolami A, Russell S, Ruggeri ZM. Interaction of asialo von Willebrand factor with glycoprotein Ib induces fibrinogen binding to the glycoprotein IIb/IIIa complex and mediates platelet aggregation. *J Clin Invest*. 1985;75(4):1198-203. Epub 1985/04/01.
198. Klages B, Brandt U, Simon MI, Schultz G, Offermanns S. Activation of G12/G13 results in shape change and Rho/Rho-kinase-mediated myosin light chain phosphorylation in mouse platelets. *The Journal of cell biology*. 1999;144(4):745-54. Epub 1999/02/26.
199. Bauer M, Retzer M, Wilde JI, Maschberger P, Essler M, Aepfelbacher M, et al. Dichotomous regulation of myosin phosphorylation and shape change by Rho-kinase and calcium in intact human platelets. *Blood*. 1999;94(5):1665-72. Epub 1999/09/09.
200. van Kruchten R, Mattheij NJA, Saunders C, Feijge MAH, Swieringa F, Wolfs JLN, et al. Both TMEM16F-dependent and TMEM16F-independent pathways contribute to phosphatidylserine exposure in platelet apoptosis and platelet activation. *Blood*. 2013;121(10):1850-7.
201. Heemskerk JW, Bevers EM, Lindhout T. Platelet activation and blood coagulation. *Thromb Haemost*. 2002;88(2):186-93. Epub 2002/08/28.
202. Bunting S, Moncada S, Vane JR. The prostacyclin--thromboxane A₂ balance: pathophysiological and therapeutic implications. *Br Med Bull*. 1983;39(3):271-6. Epub 1983/07/01.
203. Hecker M, Ullrich V. On the mechanism of prostacyclin and thromboxane A₂ biosynthesis. *The Journal of biological chemistry*. 1989;264(1):141-50. Epub 1989/01/05.
204. Pokrovskaya ID, Aronova MA, Kamykowski JA, Prince AA, Hoyne JD, Calco GN, et al. STEM tomography reveals that the canalicular system and α -granules remain separate compartments during early secretion stages in blood platelets. *J Thromb Haemost*. 2016;14(3):572-84. Epub 2015/12/15.
205. Cattaneo M, Gachet C. ADP receptors and clinical bleeding disorders. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 1999;19(10):2281-5. Epub 1999/10/16.
206. Timmons S, Kloczewiak M, Hawiger J. ADP-dependent common receptor mechanism for binding of von Willebrand factor and fibrinogen to human platelets. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1984;81(15):4935-9. Epub 1984/08/01.
207. Smith SA, Morrissey JH. Interactions Between Platelets and the Coagulation System. *Platelets*2019. p. 393-400.
208. Zwaal RF, Comfurius P, Bevers EM. Lipid-protein interactions in blood coagulation. *Biochimica et biophysica acta*. 1998;1376(3):433-53. Epub 1998/11/07.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

209. Marx G, Korner G, Mou X, Gorodetsky R. Packaging zinc, fibrinogen, and factor XIII in platelet alpha-granules. *Journal of cellular physiology*. 1993;156(3):437-42. Epub 1993/09/01.
210. Handagama P, Scarborough RM, Shuman MA, Bainton DF. Endocytosis of fibrinogen into megakaryocyte and platelet alpha-granules is mediated by alpha IIb beta 3 (glycoprotein IIb-IIIa). *Blood*. 1993;82(1):135-8. Epub 1993/07/01.
211. Schroeder V, Kohler HP. Factor XIII: Structure and Function. *Seminars in thrombosis and hemostasis*. 2016;42(4):422-8. Epub 2016/03/29.
212. Hayward CP, Furmaniak-Kazmierczak E, Cieutat AM, Moore JC, Bainton DF, Nesheim ME, et al. Factor V is complexed with multimerin in resting platelet lysates and colocalizes with multimerin in platelet alpha-granules. *The Journal of biological chemistry*. 1995;270(33):19217-24. Epub 1995/08/18.
213. Holmsen H, Weiss HJ. Secretable storage pools in platelets. *Annual review of medicine*. 1979;30:119-34. Epub 1979/01/01.
214. Schwarz HP, Heeb MJ, Wencel-Drake JD, Griffin JH. Identification and quantitation of protein S in human platelets. *Blood*. 1985;66(6):1452-5. Epub 1985/12/01.
215. Battinelli EM. The Role of Platelets in Angiogenesis. *Platelets*2019. p. 433-41.
216. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2009;29(6):789-91. Epub 2009/01/24.
217. Coppinger JA, Cagney G, Toomey S, Kislinger T, Belton O, McRedmond JP, et al. Characterization of the proteins released from activated platelets leads to localization of novel platelet proteins in human atherosclerotic lesions. *Blood*. 2004;103(6):2096-104. Epub 2003/11/25.
218. Klement GL, Yip TT, Cassiola F, Kikuchi L, Cervi D, Podust V, et al. Platelets actively sequester angiogenesis regulators. *Blood*. 2009;113(12):2835-42. Epub 2008/11/28.
219. Radziwon-Balicka A, Moncada de la Rosa C, Zielnik B, Doroszko A, Jurasz P. Temporal and pharmacological characterization of angiotensin release and generation by human platelets: implications for endothelial cell migration. *PloS one*. 2013;8(3):e59281. Epub 2013/04/05.
220. Italiano JE, Jr., Richardson JL, Patel-Hett S, Battinelli E, Zaslavsky A, Short S, et al. Angiogenesis is regulated by a novel mechanism: pro- and antiangiogenic proteins are organized into separate platelet alpha granules and differentially released. *Blood*. 2008;111(3):1227-33. Epub 2007/10/27.
221. Gawaz M, Borst O. The Role of Platelets in Atherothrombosis. *Platelets*2019. p. 459-67.
222. Geisler T, Grass D, Bigalke B, Stellos K, Drosch T, Dietz K, et al. The Residual Platelet Aggregation after Deployment of Intracoronary Stent (PREDICT) score. *J Thromb Haemost*. 2008;6(1):54-61. Epub 2007/10/24.
223. Gawaz M, Neumann FJ, Dickfeld T, Reininger A, Adelsberger H, Gebhardt A, et al. Vitronectin receptor (alpha(v)beta3) mediates platelet adhesion to the luminal aspect of endothelial cells: implications for reperfusion in acute myocardial infarction. *Circulation*. 1997;96(6):1809-18. Epub 1997/10/10.
224. Gawaz M, Brand K, Dickfeld T, Pogatsa-Murray G, Page S, Bogner C, et al. Platelets induce alterations of chemotactic and adhesive properties of endothelial cells mediated through an interleukin-1-dependent mechanism. Implications for atherogenesis. *Atherosclerosis*. 2000;148(1):75-85. Epub 1999/12/02.
225. Ruggeri ZM. Platelets in atherothrombosis. *Nature medicine*. 2002;8(11):1227-34. Epub 2002/11/02.
226. Thomas MR, Storey RF. The role of platelets in inflammation. *Thromb Haemost*. 2015;114(3):449-58. Epub 2015/08/22.
227. Morrell CN, Aggrey AA, Chapman LM, Modjeski KL. Emerging roles for platelets as immune and inflammatory cells. *Blood*. 2014;123(18):2759-67. Epub 2014/03/04.
228. Ma Y-Q, Plow EF, Geng J-G. P-selectin binding to P-selectin glycoprotein ligand-1 induces an intermediate state of α M β 2 activation and acts cooperatively with extracellular stimuli to support maximal adhesion of human neutrophils. *Blood*. 2004;104(8):2549-56.
229. Weyrich AS, Zimmerman GA. Platelets in lung biology. *Annual review of physiology*. 2013;75:569-91. Epub 2012/10/10.
230. Grau GE, Mackenzie CD, Carr RA, Redard M, Pizzolato G, Allasia C, et al. Platelet accumulation in brain microvessels in fatal pediatric cerebral malaria. *The Journal of infectious diseases*. 2003;187(3):461-6. Epub 2003/01/29.
231. Iba T, Levy JH. Inflammation and thrombosis: roles of neutrophils, platelets and endothelial cells and their interactions in thrombus formation during sepsis. *J Thromb Haemost*. 2018;16(2):231-41. Epub 2017/12/02.
232. Diaz-Gonzalez F, Ginsberg Mea. Platelets and rheumatic diseases. *J*, editors Kelley's textbook of rheumatology Philadelphia: Elsevier Saunders. 2005:252-9.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

233. Tomasson G, Lavalley M, Tanriverdi K, Finkielman JD, Davis JC, Jr., Hoffman GS, et al. Relationship between markers of platelet activation and inflammation with disease activity in Wegener's granulomatosis. *The Journal of rheumatology*. 2011;38(6):1048-54. Epub 2011/03/18.
234. Joseph JE, Harrison P, Mackie IJ, Isenberg DA, Machin SJ. Increased circulating platelet-leucocyte complexes and platelet activation in patients with antiphospholipid syndrome, systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *British journal of haematology*. 2001;115(2):451-9. Epub 2001/11/13.
235. Yount NY, Gank KD, Xiong YQ, Bayer AS, Pender T, Welch WH, et al. Platelet microbicidal protein 1: structural themes of a multifunctional antimicrobial peptide. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2004;48(11):4395-404. Epub 2004/10/27.
236. Yeaman MR. The Role of Platelets in Antimicrobial Host Defense. *Platelets*2019. p. 523-46.
237. Yeaman MR. Platelets: at the nexus of antimicrobial defence. *Nature reviews Microbiology*. 2014;12(6):426-37. Epub 2014/05/17.
238. Li Z, Riesenber B, Metelli A, Li A, Wu BX. The Role of Platelets in Tumor Growth, Metastasis, and Immune Evasion. *Platelets*2019. p. 547-61.
239. Kaser A, Brandacher G, Steurer W, Kaser S, Offner FA, Zoller H, et al. Interleukin-6 stimulates thrombopoiesis through thrombopoietin: role in inflammatory thrombocytosis. *Blood*. 2001;98(9):2720-5. Epub 2001/10/25.
240. Shimada H, Oohira G, Okazumi S, Matsubara H, Nabeya Y, Hayashi H, et al. Thrombocytosis associated with poor prognosis in patients with esophageal carcinoma. *Journal of the American College of Surgeons*. 2004;198(5):737-41. Epub 2004/04/28.
241. Josa V, Krzystanek M, Eklund AC, Salamon F, Zarand A, Szallasi Z, et al. Relationship of postoperative thrombocytosis and survival of patients with colorectal cancer. *International journal of surgery (London, England)*. 2015;18:1-6. Epub 2015/04/07.
242. Menter DG, Kopetz S, Hawk E, Sood AK, Loree JM, Gresele P, et al. Platelet "first responders" in wound response, cancer, and metastasis. *Cancer metastasis reviews*. 2017;36(2):199-213. Epub 2017/07/22.
243. Senzel L, Gnatenko DV, Bahou WF. The platelet proteome. *Curr Opin Hematol*. 2009;16(5):329-33. Epub 2009/06/25.
244. Goubran HA, Burnouf T, Radosevic M, El-Ekiaby M. The platelet-cancer loop. *European journal of internal medicine*. 2013;24(5):393-400. Epub 2013/02/26.
245. Greenberg EM, Kaled ES. Thrombocytopenia. *Critical care nursing clinics of North America*. 2013;25(4):427-34, v. Epub 2013/11/26.
246. Michelson AD. The Clinical Approach to Disorders of Platelet Number and Function. *Platelets*2019. p. 701-5.
247. Pegels JG, Bruynes EC, Engelfriet CP, von dem Borne AE. Pseudothrombocytopenia: an immunologic study on platelet antibodies dependent on ethylene diamine tetra-acetate. *Blood*. 1982;59(1):157-61. Epub 1982/01/01.
248. Briggs C, Harrison P, Machin S. Continuing developments with the automated platelet count 1. *International journal of laboratory hematology*. 2007;29(2):77-91.
249. Tessier-Marteau A, Geneviève F, Godon A, Macchi L, Zandecki M. Anomalies et erreurs de détermination de l'hémogramme avec les automates d'hématologie cellulaire. *Ann Biol Clin (Paris)*. 2010;68(4):393-407.
250. Richards EM, Baglin TP. Quantitation of reticulated platelets: methodology and clinical application. *British journal of haematology*. 1995;91(2):445-51. Epub 1995/10/01.
251. Waters AH. Post-transfusion purpura. *Blood Rev*. 1989;3(2):83-7. Epub 1989/06/01.
252. Oda A, Ochs HD. Wiskott-Aldrich syndrome protein and platelets. *Immunological reviews*. 2000;178:111-7. Epub 2001/02/24.
253. Geddis AE. Congenital amegakaryocytic thrombocytopenia. *Pediatric blood & cancer*. 2011;57(2):199-203. Epub 2011/02/22.
254. Hedberg VA, Lipton JM. Thrombocytopenia with absent radii. A review of 100 cases. *The American journal of pediatric hematology/oncology*. 1988;10(1):51-64. Epub 1988/01/01.
255. Zhang RR, Chen XJ, Ren YY, Yang WY, Zhu XF. [Familial platelet disorder with predisposition to myeloid leukemia (FPD/AML): a case report and literature review]. *Zhonghua xue ye xue za zhi = Zhonghua xueyexue zazhi*. 2021;42(4):308-12. Epub 2021/05/14.
256. Raslova H, Komura E, Le Couédic JP, Larbret F, Debili N, Feunteun J, et al. FLI1 monoallelic expression combined with its hemizygous loss underlies Paris-Trousseau/Jacobsen thrombopenia. *J Clin Invest*. 2004;114(1):77-84. Epub 2004/07/03.
257. Singh AR, Morin G, Rochette J. Stormorken syndrome or York platelet syndrome: A clinician's dilemma. *Molecular genetics and metabolism reports*. 2015;2:80. Epub 2015/01/29.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

258. Gauer RL, Braun MM. Thrombocytopenia. *American family physician*. 2012;85(6):612-22. Epub 2012/04/27.
259. Pham A, Wang J. Bernard-Soulier syndrome: an inherited platelet disorder. *Archives of pathology & laboratory medicine*. 2007;131(12):1834-6. Epub 2007/12/18.
260. Behrens WE. Mediterranean macrothrombocytopenia. *Blood*. 1975;46(2):199-208. Epub 1975/08/01.
261. Ban BH, Shah V. MYH9-Related Thrombocytopenia. *Mayo Clinic proceedings*. 2017;92(7):1169-70. Epub 2017/07/10.
262. Michelson AD. Gray platelet syndrome. *Blood*. 2013;121(2):250. Epub 2013/02/22.
263. Baccini V, Alessi MC. [Diagnosis of inherited thrombocytopenia]. *Rev Med Interne*. 2016;37(2):117-26. Epub 2015/12/01. Les thrombopénies constitutionnelles : démarche diagnostique.
264. Lewis D, Vaidya R. Kasabach Merritt Syndrome. *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing Copyright © 2022, StatPearls Publishing LLC.; 2022.
265. Wallace K, Harris S, Addison A, Bean C. HELLP Syndrome: Pathophysiology and Current Therapies. *Current pharmaceutical biotechnology*. 2018;19(10):816-26. Epub 2018/07/13.
266. Rodeghiero F, Stasi R, Gernsheimer T, Michel M, Provan D, Arnold DM, et al. Standardization of terminology, definitions and outcome criteria in immune thrombocytopenic purpura of adults and children: report from an international working group. *Blood*. 2009;113(11):2386-93. Epub 2008/11/14.
267. Li S, Molony JT, Cetin K, Wasser JS, Altomare I. Rate of bleeding-related episodes in elderly patients with primary immune thrombocytopenia: a retrospective cohort study. *Current medical research and opinion*. 2018;34(2):209-16. Epub 2017/07/28.
268. Neunert CE, Buchanan GR, Imbach P, Bolton-Maggs PH, Bennett CM, Neufeld E, et al. Bleeding manifestations and management of children with persistent and chronic immune thrombocytopenia: data from the Intercontinental Cooperative ITP Study Group (ICIS). *Blood*. 2013;121(22):4457-62. Epub 2013/04/04.
269. Zeller B, Rajantie J, Hedlund-Treutiger I, Tedgård U, Wesenberg F, Jonsson OG, et al. Childhood idiopathic thrombocytopenic purpura in the Nordic countries: epidemiology and predictors of chronic disease. *Acta paediatrica (Oslo, Norway : 1992)*. 2005;94(2):178-84. Epub 2005/06/29.
270. Hedman A, Henter JI, Hedlund I, Elinder G. Prevalence and treatment of chronic idiopathic thrombocytopenic purpura of childhood in Sweden. *Acta paediatrica (Oslo, Norway : 1992)*. 1997;86(2):226-7. Epub 1997/02/01.
271. SEGAL JB, POWE NR. Prevalence of immune thrombocytopenia: analyses of administrative data. 2006;4(11):2377-83.
272. Moulis G, Palmaro A, Montastruc J-L, Godeau B, Lapeyre-Mestre M, Sailler L. Epidemiology of incident immune thrombocytopenia: a nationwide population-based study in France. *Blood*. 2014;124(22):3308-15.
273. Terrell DR, Beebe LA, Vesely SK, Neas BR, Segal JB, George JN. The incidence of immune thrombocytopenic purpura in children and adults: A critical review of published reports. 2010;85(3):174-80.
274. McMillan R. Antiplatelet antibodies in chronic adult immune thrombocytopenic purpura: assays and epitopes. *Journal of pediatric hematology/oncology*. 2003;25 Suppl 1:S57-61. Epub 2003/12/12.
275. Mahévas M, Patin P, Huetz F, Descatoire M, Cagnard N, Bole-Feysot C, et al. B cell depletion in immune thrombocytopenia reveals splenic long-lived plasma cells. *J Clin Invest*. 2013;123(1):432-42. Epub 2012/12/18.
276. Kuwana M, Iki S, Urabe A. The role of autoantibody-producing plasma cells in immune thrombocytopenic purpura refractory to rituximab. *Am J Hematol*. 2007;82(9):846-8. Epub 2007/05/17.
277. Emmerich F, Bal G, Barakat A, Milz J, Mühle C, Martinez-Gamboa L, et al. High-level serum B-cell activating factor and promoter polymorphisms in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura. *British journal of haematology*. 2007;136(2):309-14. Epub 2006/12/13.
278. Zhu XJ, Shi Y, Peng J, Guo CS, Shan NN, Qin P, et al. The effects of BAFF and BAFF-R-Fc fusion protein in immune thrombocytopenia. *Blood*. 2009;114(26):5362-7. Epub 2009/10/02.
279. Audia S, Rossato M, Santegoets K, Spijkers S, Wichers C, Bekker C, et al. Splenic TFH expansion participates in B-cell differentiation and antiplatelet-antibody production during immune thrombocytopenia. *Blood*. 2014;124(18):2858-66. Epub 2014/09/19.
280. Audia S, Mahevas M, Bonnotte B. Thrombopénie immunologique : de la physiopathologie aux traitements. *La Revue de Médecine Interne*. 2021;42(1):16-24.
281. Houwerzijl EJ, Blom NR, van der Want JJ, Esselink MT, Koornstra JJ, Smit JW, et al. Ultrastructural study shows morphologic features of apoptosis and para-apoptosis in megakaryocytes from patients with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Blood*. 2004;103(2):500-6. Epub 2003/09/13.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

282. Chang M, Nakagawa PA, Williams SA, Schwartz MR, Imfeld KL, Buzby JS, et al. Immune thrombocytopenic purpura (ITP) plasma and purified ITP monoclonal autoantibodies inhibit megakaryocytopoiesis in vitro. *Blood*. 2003;102(3):887-95. Epub 2003/04/05.
283. Zufferey A, Kapur R, Semple JW. Pathogenesis and Therapeutic Mechanisms in Immune Thrombocytopenia (ITP). *Journal of clinical medicine*. 2017;6(2). Epub 2017/02/18.
284. Najaoui A, Bakchoul T, Stoy J, Bein G, Rummel MJ, Santoso S, et al. Autoantibody-mediated complement activation on platelets is a common finding in patients with immune thrombocytopenic purpura (ITP). 2012;88(2):167-74.
285. Peerschke EI, Andemariam B, Yin W, Bussel JB. Complement activation on platelets correlates with a decrease in circulating immature platelets in patients with immune thrombocytopenic purpura. *British journal of haematology*. 2010;148(4):638-45. Epub 2009/11/21.
286. Kuwana M, Okazaki Y, Ikeda Y. Splenic macrophages maintain the anti-platelet autoimmune response via uptake of opsonized platelets in patients with immune thrombocytopenic purpura. *J Thromb Haemost*. 2009;7(2):322-9. Epub 2008/10/02.
287. Grewal PK. The Ashwell-Morell receptor. *Methods Enzymol*. 2010;479:223-41. Epub 2010/09/08.
288. Tao L, Zeng Q, Li J, Xu M, Wang J, Pan Y, et al. Platelet desialylation correlates with efficacy of first-line therapies for immune thrombocytopenia. *Journal of hematology & oncology*. 2017;10(1):46. Epub 2017/02/10.
289. Peng J, Ma SH, Liu J, Hou Y, Liu XM, Niu T, et al. Association of autoantibody specificity and response to intravenous immunoglobulin G therapy in immune thrombocytopenia: a multicenter cohort study. *J Thromb Haemost*. 2014;12(4):497-504. Epub 2014/02/13.
290. Stasi R, Cooper N, Del Poeta G, Stipa E, Laura Evangelista M, Abruzzese E, et al. Analysis of regulatory T-cell changes in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura receiving B cell-depleting therapy with rituximab. *Blood*. 2008;112(4):1147-50. Epub 2008/04/01.
291. Olsson B, Andersson PO, Jernås M, Jacobsson S, Carlsson B, Carlsson LM, et al. T-cell-mediated cytotoxicity toward platelets in chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. *Nature medicine*. 2003;9(9):1123-4. Epub 2003/08/26.
292. Branehög I, Kutti J, Weinfeld A. Platelet survival and platelet production in idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP). *British journal of haematology*. 1974;27(1):127-43. Epub 1974/05/01.
293. McMillan R, Nugent D. The effect of antiplatelet autoantibodies on megakaryocytopoiesis. *Int J Hematol*. 2005;81(2):94-9. Epub 2005/03/16.
294. Li S, Wang L, Zhao C, Li L, Peng J, Hou M. CD8+ T cells suppress autologous megakaryocyte apoptosis in idiopathic thrombocytopenic purpura. *British journal of haematology*. 2007;139(4):605-11. Epub 2007/11/06.
295. Kosugi S, Kurata Y, Tomiyama Y, Tahara T, Kato T, Tadokoro S, et al. Circulating thrombopoietin level in chronic immune thrombocytopenic purpura. *British journal of haematology*. 1996;93(3):704-6. Epub 1996/06/01.
296. Chia WK, Blanchette V, Mody M, Wright JF, Freedman J. Characterization of HIV-1-specific antibodies and HIV-1-crossreactive antibodies to platelets in HIV-1-infected haemophiliac patients. *British journal of haematology*. 1998;103(4):1014-22. Epub 1999/01/14.
297. Diehl LF, Ketchum LH. Autoimmune disease and chronic lymphocytic leukemia: autoimmune hemolytic anemia, pure red cell aplasia, and autoimmune thrombocytopenia. *Seminars in oncology*. 1998;25(1):80-97. Epub 1998/03/03.
298. Neunert C, Lim W, Crowther M, Cohen A, Solberg Jr L, Crowther MAJB, The Journal of the American Society of Hematology. The American Society of Hematology 2011 evidence-based practice guideline for immune thrombocytopenia. 2011;117(16):4190-207.
299. Neunert CE, Cooper NJH, the American Society of Hematology Education Program Book. Evidence-based management of immune thrombocytopenia: ASH guideline update. 2018;2018(1):568-75.
300. Imbach Paul A. Immunopathogenesis, Immunomodulation and Management of Immune Thrombocytopenic Purpura in Children. *J Pediatr Blood Cancer*. 2006;46:351.
301. Neunert C, Noroozi N, Norman G, Buchanan GR, Goy J, Nazi I, et al. Severe bleeding events in adults and children with primary immune thrombocytopenia: a systematic review. *J Thromb Haemost*. 2015;13(3):457-64. Epub 2014/12/17.
302. Cohen YC, Djulbegovic B, Shamaï-Lubovitz O, Mozes B. The bleeding risk and natural history of idiopathic thrombocytopenic purpura in patients with persistent low platelet counts. *Archives of internal medicine*. 2000;160(11):1630-8. Epub 2000/06/10.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

303. Bussel JB. Fc receptor blockade and immune thrombocytopenic purpura. *Seminars in hematology*. 2000;37(3):261-6. Epub 2000/08/15.
304. Kitchens CS. The purpuric disorders. *Seminars in thrombosis and hemostasis*. 1984;10(3):173-89. Epub 1984/07/01.
305. Houwerzijl EJ, Louwes H, Sluiter WJ, Smit JW, Vellenga E, de Wolf JT. Platelet production rate predicts the response to prednisone therapy in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Ann Hematol*. 2008;87(12):975-83. Epub 2008/08/12.
306. Zen M, Canova M, Campana C, Bettio S, Nalotto L, Rampudda M, et al. The kaleidoscope of glucorticoid effects on immune system. *Autoimmunity reviews*. 2011;10(6):305-10. Epub 2011/01/13.
307. Schwab I, Nimmerjahn F. Intravenous immunoglobulin therapy: how does IgG modulate the immune system? *Nature reviews Immunology*. 2013;13(3):176-89. Epub 2013/02/16.
308. Bussel JB, Goldman A, Imbach P, Schulman I, Hilgartner MW. Treatment of acute idiopathic thrombocytopenia of childhood with intravenous infusions of gammaglobulin. *J Pediatr*. 1985;106(6):886-90. Epub 1985/06/01.
309. Katz U, Achiron A, Sherer Y, Shoenfeld Y. Safety of intravenous immunoglobulin (IVIG) therapy. *Autoimmunity reviews*. 2007;6(4):257-9. Epub 2007/02/24.
310. Despotovic JM, Lambert MP, Herman JH, Gernsheimer TB, McCrae KR, Tarantino MD, et al. RhIG for the treatment of immune thrombocytopenia: consensus and controversy (CME). *Transfusion*. 2012;52(5):1126-36; quiz 5. Epub 2011/10/11.
311. Arnold DM, Dentali F, Crowther MA, Meyer RM, Cook RJ, Sigouin C, et al. Systematic review: efficacy and safety of rituximab for adults with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Annals of internal medicine*. 2007;146(1):25-33. Epub 2007/01/04.
312. Patel VL, Mahévas M, Lee SY, Stasi R, Cunningham-Rundles S, Godeau B, et al. Outcomes 5 years after response to rituximab therapy in children and adults with immune thrombocytopenia. *Blood*. 2012;119(25):5989-95. Epub 2012/05/09.
313. Mahévas M, Fain O, Ebbo M, Roudot-Thoraval F, Limal N, Khellaf M, et al. The temporary use of thrombopoietin-receptor agonists may induce a prolonged remission in adult chronic immune thrombocytopenia. Results of a French observational study. *British journal of haematology*. 2014;165(6):865-9. Epub 2014/04/15.
314. Vianelli N, Galli M, de Vivo A, Intermesoli T, Giannini B, Mazzucconi MG, et al. Efficacy and safety of splenectomy in immune thrombocytopenic purpura: long-term results of 402 cases. *Haematologica*. 2005;90(1):72-7. Epub 2005/01/12.
315. Dixon R, Rosse W, Ebbert L. Quantitative determination of antibody in idiopathic thrombocytopenic purpura. *N Engl J med* 1975;292(5):230-6.
316. Kelton JG, Powers PJ, Carter CJ. A Prospective of the Usefulness of the Measurement of Platelet-Associated IgG for the Diagnosis of Idiopathic Thrombocytopenic Purpura. *Blood*. 1982;60:1050-3.
317. Cines DB, Schreiber AD. Immune thrombocytopenia. Use of a Coombs antiglobulin test to detect IgG and C3 on platelets. *N Engl J Med*. 1979;300(3):106-11. Epub 1979/01/18.
318. KELTON JG, MURPHY WG, LUCARELLI A, GARVEY-WILLIAMS J, SANTOS A. A prospective comparison of four techniques for measuring platelet-associated IgG. *British journal of Haematology*. 1989;71:97-105.
319. Davoren A, Bussel J, Curtis BR, Moghaddam M, Aster RH, McFarland JG. Prospective evaluation of a new platelet glycoprotein (GP)-specific assay (PakAuto) in the diagnosis of autoimmune thrombocytopenia (AITP). *Am J Hematol*. 2005;78(3):193-7. Epub 2005/02/24.
320. Kiefel v. The MAIPA assay and its applications in immunohaematology. *Transfusion Medicine*., 1992;2:18 I - 188.
321. Hamidpour M, Khalili G, Tajic N, Shamsian BBS, Hamidpour R. Comparative of three methods (ELIZA, MAIPA and flow cytometry) to determine anti-platelet antibody in children with ITP. *Am J Blood Res*. 2014;4(2):86-92.
322. JOUTSI L, KEKOMAKI R. Comparison of the direct platelet immunofluorescence test (direct PIFT) with a modified direct monoclonal antibody-specific immobilization of platelet antigens (direct MAIPA) in detection of platelet-associated IgG. *British Journal of Haematology*., 1997;96:204-9.
323. Hezard N, Simon G, Mace C, Jallu V, Kaplan C, Nguyen P. Is flow cytometry accurate enough to screen platelet autoantibodies? *Transfusion*. 2008;48(3):513-8. Epub 2007/12/11.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

324. Najaoui A, Bakchoul T, Stoy J, Bein G, Rummel MJ, Santoso S, et al. Autoantibody-mediated complement activation on platelets is a common finding in patients with immune thrombocytopenic purpura (ITP). *Eur J Haematol.* 2012;88(2):167-74. Epub 2011/10/12.
325. Porcelijn L, Huiskes E, Oldert G, Schipperus M, Zwaginga JJ, de Haas M. Detection of platelet autoantibodies to identify immune thrombocytopenia: state of the art. *British journal of haematology.* 2018;182(3):423-6. Epub 2018/05/29.
326. Leeuwen EFv, Ven JTMvd, Engelfriet CP, Borne vd. Specificity of Autoantibodies in Autoimmune Thrombocytopenia. *Blood.* 1982;59(1):23-6.
327. Fujisawa K, Tani P, O'Toole TE, Ginsberg MH, McMillan R. <Different Specificities of Platelet-Associated and Plasma Autoantibodies to.pdf>. *Blood.* 1992;79:1441-6.
328. Brown M, Wittwer C. Flow cytometry: principles and clinical applications in hematology. *Clinical chemistry.* 2000;46(8 Pt 2):1221-9. Epub 2000/08/06.
329. Jaroszeski MJ, Radcliff G. Fundamentals of flow cytometry. *Molecular biotechnology.* 1999;11(1):37-53. Epub 1999/06/15.
330. Givan AL. Principles of flow cytometry: an overview. *Methods in cell biology.* 2001;63:19-50. Epub 2000/11/04.
331. McCoy JP, Jr. Basic principles of flow cytometry. *Hematology/oncology clinics of North America.* 2002;16(2):229-43. Epub 2002/07/04.
332. Nunez R. Flow cytometry: principles and instrumentation. *Current issues in molecular biology.* 2001;3(2):39-45. Epub 2001/07/27.
333. Shapiro HM. *Practical flow cytometry.* 2, editor: John Wiley & Sons; 2005. 2 p.
334. Biosciences BD. *Introduction to flow cytometry: A learning guide 2000.* %J San Jose, CA, USA: Becton, Dickinson Company.
335. McKinnon KM. Flow Cytometry: An Overview. *Current protocols in immunology.* 2018;120:5.1.-5.1.11. Epub 2018/03/08.
336. Nishioka T, Yamane T, Takubo T, Ohta K, Park K, Hino M. Detection of various platelet-associated immunoglobulins by flow cytometry in idiopathic thrombocytopenic purpura. *Cytometry B Clin Cytom.* 2005;68(1):37-42. Epub 2005/09/27.
337. Cines DB, shreiber AD. Immune thrombocytopenia, Use of a Coombs antiglobulin test to detect IgG and C3 on platelets. *N Engl J Med.* 1979;300(3):106-11.
338. Hee Jin Huh, Park CJ, Kim SW, Han SH, Jang S, Chi aHS. Flow Cytometric Detection of Platelet-Associated Immunoglobulin in Patients with Immune Thrombocytopenic Purpura and Nonimmune Thrombocytopenia. *Annals of Clinical & Laboratory Science.* 2009;39(3):283-8.
339. Christopoulos CG, Kelsey HC, Machin SJ. A FlowCytometric Approach to quantitative estimation of platelets surface Ig. *Vox Sang.* 1993;64:106-15.
340. Craig S. Rosenfeld, Gary Nichols, Bodensteiner Dc. Flow Cytometric Measurement of Antiplatelet Antibodies. *Am J Clin Pathol.* 1987;87:518-22. Epub july 1987.
341. P.L.Tazzari, F. Ricci, N. Vianelli, C. Tassi, D. Belletti, I. Pierri, et al. Detection of platelet-associated antibodies by flow cytometry in hematology imunological disorder. *Ann Hematol* 1995;70:267-72. Epub 6 mars 1995.
342. Hagenström H, Schlenke P, Hennig H, Kirchner H, Klüter H. Quantification of Platelet-associated IgG for Differential Diagnosis of Patients with Thrombocytopenia. *Thromb Haemost.* 2000;84:779-83.
343. Romero-Guzmán Lt, López-Karpovitch X, Paredes R, Barrales-Benitez O, Piedras J. Detection of platelet-associated immunoglobulins by flow cytometry for the diagnosis of immune thrombocytopenia: a prospective study and critical review. *Haematologica* 2000;85(6):627-31.
344. Lazarchick J, HaL SA. Platelet-associated IgG assay using flow cytometric analysis. *Journal of Immunological Methods.* 1986;87:257-65.
345. A T, J K, R M. autoimmun thrombocytopenia- determination of platelet-associated autoantibodies against platelet-specific. *Thromb Haemost* 2005;3:74-8.
346. Zhai J, Ding M, Yang T, Zuo B, Weng Z, Zhao Y, et al. Flow cytometric immunobead assay for quantitative detection of platelet autoantibodies in immune thrombocytopenia patients. *J Transl Med.* 2017;15(1):214. Epub 2017/10/25.
347. Zhao Y, Zhu M, Jiang M, Zuo B, Wu Q, Ruan C, et al. An improved flow cytometric immunobead array to detect autoantibodies in plasma from patients with immune thrombocytopenic purpura. *Clin Chim Acta.* 2015;438:396-400. Epub 2014/10/01.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

348. Liu XG, Li JL, Qin P, Ren J, Ma SH, Sun L, et al. Determination of platelet-bound glycoprotein-specific autoantibodies by flow cytometric immunobead assay in primary immune thrombocytopenia. *Eur J Haematol.* 2011;86(4):339-46. Epub 2011/01/05.
349. Guerra JCDc, Kanayama RH, Nozawa ST, Takiri IY, Lazaro RJ, Hamerschlag N, et al. Thrombocytopenia: diagnosis with flow cytometry and antiplatelet antibodies. *einstein.* 2011;9(2):130-4.
350. Arnold DM, Santoso S, Greinacher A, Platelet Immunology Scientific Subcommittee of the I. Recommendations for the implementation of platelet autoantibody testing in clinical trials of immune thrombocytopenia. *J Thromb Haemost.* 2012;10(4):695-7.
351. Nishioka T, Yokota M, I. Tsuda, Tatsumi N. Flow cytometric analysis of platelet activation under calcium ion-chelating conditions. *Clin Lab Haem.* 2002;24:115-9.
352. Buderer NMF. Statistical methodology: I. Incorporating the prevalence of disease into the sample size calculation for sensitivity and specificity. *Academic emergency medicine.* 1996;3(9):895-900.
353. Moulis G, Comont T, Adoue D. New insights into the epidemiology of immune thrombocytopenia in adult patients: Impact for clinical practice. *La Revue de Médecine Interne.* 2021;42(1):11-5.
354. Protassov K. Analyse statistique des données expérimentales: EDP sciences Les Ulis; 2002.
355. Perneger T, Perrier A. Analyse d'un test diagnostique : courbe ROC, ou « receiver operating characteristic ». *Rev Mal Respir* 2004;21:398-401.
356. Delacour H, François N, Servonnet A, Gentile A, Roche B. Les rapports de vraisemblance : un outil de choix pour l'interprétation des tests biologiques. *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée.* 2009;24(2):92-9.
357. Nendaz MR, Perrier A. Théorème de Bayes et rapports de vraisemblance. *Revue des Maladies Respiratoires.* 2004;21(2):394-7.
358. Fogarty PF, Tarantino MD, Brainsky A, Signorovitch J, Grotzinger KMJCMr, opinion. Selective validation of the WHO Bleeding Scale in patients with chronic immune thrombocytopenia. 2012;28(1):79-87.
359. Page LK, Psaila B, Provan D, Michael Hamilton J, Jenkins JM, Elish AS, et al. The immune thrombocytopenic purpura (ITP) bleeding score: assessment of bleeding in patients with ITP. 2007;138(2):245-8.
360. Downes K, Megy K, Duarte D, Vries M, Gebhart J, Hofer S, et al. Diagnostic high-throughput sequencing of 2396 patients with bleeding, thrombotic, and platelet disorders. *Blood.* 2019;134(23):2082-91.
361. Grall M, Azoulay E, Galicier L, Provôt F, Wynckel A, Poullin P, et al. Thrombotic thrombocytopenic purpura misdiagnosed as autoimmune cytopenia: Causes of diagnostic errors and consequence on outcome. Experience of the French thrombotic microangiopathies reference centre. 2017;92(4):381-7.
362. Porcelijn L, Schmidt DE, Oldert G, Hofstede-van Egmond S, Kapur R, Zwaginga JJ, et al. Evolution and Utility of Antiplatelet Autoantibody Testing in Patients with Immune Thrombocytopenia. *Transfusion Medicine Reviews.* 2020;34(4):258-69.
363. Frederiksen H, Schmidt K. The Incidence of Idiopathic Thrombocytopenic Purpura in Adults Increases With Age. *Blood.* 1999;94(3):909-13.
364. Neylon AJ, Saunders PWG, Howard MR, Proctor SJ, Taylor PRA, Group obotNRH. Clinically significant newly presenting autoimmune thrombocytopenic purpura in adults: a prospective study of a population-based cohort of 245 patients. 2003;122(6):966-74.
365. Marieke Schoonen W, Kucera G, Coalson J, Li L, Rutstein M, Mowat F, et al. Epidemiology of immune thrombocytopenic purpura in the General Practice Research Database. 2009;145(2):235-44.
366. Grimaldi-Bensouda L, Nordon C, Michel M, Viallard J-F, Adoue D, Magy-Bertrand N, et al. Immune thrombocytopenia in adults: a prospective cohort study of clinical features and predictors of outcome. *Haematologica.* 2016;101(9):1039-45. Epub 2016/05/26.
367. Palau J, Sancho E, Herrera M, Sánchez S, Mingot ME, Upegui RI, et al. Characteristics and management of primary and other immune thrombocytopenias: Spanish registry study. *Hematology.* 2017;22(8):484-92. Epub 2017/04/19.
368. Lee JY, Lee J-H, Lee H, Kang B, Kim J-W, Kim SH, et al. Epidemiology and management of primary immune thrombocytopenia: A nationwide population-based study in Korea. *Thrombosis Research.* 2017;155:86-91.
369. Gernsheimer TB. Thrombocytopenia in pregnancy: is this immune thrombocytopenia or...? *Hematology.* 2012;2012(1):198-202.
370. Brighton T, Evans S, Castaldi P, Chesterman C, Chong B. Prospective evaluation of the clinical usefulness of an antigen- specific assay (MAIPA) in idiopathic thrombocytopenic purpura and other immune thrombocytopenias. *Blood.* 1996;88(1):194-201.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

371. Buakaew J, Promwong C. Platelet antibody screening by flow cytometry is more sensitive than solid phase red cell adherence assay and lymphocytotoxicity technique: a comparative study in Thai patients. *Asian Pac J Allergy Immunol.* 2010;28:177-84.
372. Doyon F, Hill C. Évaluation des méthodes diagnostiques. *J Radiol.* 2001;82:117-25.
373. Teraz-Orosz A, Cooper N, Crawley JTB, Salles-Crawley II. Detection of anti-platelet antibodies in immune thrombocytopenia by flow cytometry. 2019;184(5):844-7.
374. Nendaz MR, Perrier A. Sensibilité, spécificité, valeur prédictive positive et valeur prédictive négative d'un test diagnostique. *Revue des Maladies Respiratoires.* 2004;21(2):390-3.
375. Li J, van der Wal DE, Zhu G, Xu M, Yougbare I, Ma L, et al. Desialylation is a mechanism of Fc-independent platelet clearance and a therapeutic target in immune thrombocytopenia. *Nat Commun.* 2015;6:7737. Epub 2015/07/18.
376. Vrbensky JR, Moore JE, Arnold DM, Smith JW, Kelton JG, Nazy I. The sensitivity and specificity of platelet autoantibody testing in immune thrombocytopenia: a systematic review and meta-analysis of a diagnostic test. 2019;17(5):787-94.
377. Panzer S, Höcker L, Rieger M, Vormittag R, Koren D, Dunkler D, et al. Agonist-inducible platelet activation in chronic idiopathic autoimmune thrombocytopenia. 2007;79(3):198-204.
378. Panzer S, Höcker L, Vormittag R, Rieger M, Koren D, Dunkler D, et al. Flow cytometric evaluation of platelet activation in chronic autoimmune thrombocytopenia. 2006;47(S5):694-6.
379. Chen J-f, Yang L-h, Chang L-x, Feng J-j, Liu J-q. The clinical significance of circulating B cells secreting anti-glycoprotein IIb/IIIa antibody and platelet glycoprotein IIb/IIIa in patients with primary immune thrombocytopenia. *Hematology.* 2012;17(5):283-90.
380. Crossley A, Calvert JE, Taylor PRA, Dickinson AM. A comparison of monoclonal antibody immobilization of platelet antigen (MAIPA) and immunobead methods for detection of GPIIb/IIIa antiplatelet antibodies in immune thrombocytopenic purpura. 1997;7(2):127-34.
381. Porcelijn L, Huiskes E, Oldert G, Schipperus M, Zwaginga JJ, de Haas M. Detection of platelet autoantibodies to identify immune thrombocytopenia: state of the art. 2018;182(3):423-6.
382. Kosugi S, Tomiyama Y, Honda S, Kashiwagi H, Shiraga M, Tadokoro S, et al. Anti-alpha3 antibodies in chronic immune thrombocytopenic purpura. *Thromb Haemost.* 2001;85(1):36-41. Epub 2001/02/24.
383. Kosugi S, Tomiyama Y, Shiraga M, Kashiwagi H, Mizutani H, Kanakura Y, et al. Platelet-associated anti-glycoprotein (GP) IIb-IIIa autoantibodies in chronic immune thrombocytopenic purpura mainly recognize cation-dependent conformations: comparison with the epitopes of serum autoantibodies. *Thromb Haemost.* 1996;75(2):339-45. Epub 1996/02/01.
384. Fabris F, Scandellari R, Ruzzon E, Randi ML, Luzzatto G, Girolami A. Platelet-associated autoantibodies as detected by a solid-phase modified antigen capture ELISA test (MACE) are a useful prognostic factor in idiopathic thrombocytopenic purpura. *Blood.* 2004;103(12):4562-4.
385. Chan H, Moore JC, Finch CN, Warkentin TE, Kelton JG. The IgG subclasses of platelet-associated autoantibodies directed against platelet glycoproteins IIb/IIIa in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura. 2003;122(5):818-24.
386. WARNER MN, MOORE JC, WARKENTIN TE, SANTOS AV, KELTON JG. A prospective study of protein-specific assays used to investigate idiopathic thrombocytopenic purpura. 1999;104(3):442-7.
387. Li J, van der Wal DE, Zhu G, Xu M, Yougbare I, Ma L, et al. Desialylation is a mechanism of Fc-independent platelet clearance and a therapeutic target in immune thrombocytopenia. *Nature Communications.* 2015;6(1):7737.

ANNEXES

ANNEXE 1 : FICHE DE RENSEIGNEMENT**FICHE DE RENSEIGNEMENT**

Nom : Prénom : Age : Sexe :
 Service : N° de tel..... Numéro : Date.....

Circonstances de découverte :

.....

Histoire de la maladie :

.....

Antécédents personnels et familiaux :

.....

Syndrome hémorragique : Oui Non

Type du syndrome hémorragique :

.....

Hépatomégalie Splénomégalie Adénopathies Douleurs osseuses

Fièvre Amaigrissement Grossesse Alcoolisme

Autres signes cliniques :

.....

NFS : (automate) Groupe sanguin :

GR..... GB..... Hb VGM Ptte

Frottis sanguin :

.....

.....

Médullogramme :

.....

Autre :

Traitement en cours :

Quinidine Héparine

Transfusion :

Nombre de transfusions et types de produits :

Réponse au traitement :

.....

ANNEXE 2 : INTERPRETATION DES RAPPORTS DE VRAISEMBLANCE

Lorsqu'on suspecte une pathologie, nous avons une probabilité de départ ($p=X$), cette probabilité est la probabilité pré-test que le patient soit atteint de cette pathologie. Afin de confirmer notre hypothèse diagnostique nous allons appliquer un test biologique, si ce test est suffisamment puissant il va augmenter significativement notre probabilité de départ s'il est positif ou la diminuer significativement s'il revient négatif. Un test idéal est celui qui donne une probabilité post-test à 100% (VPP=100%) en cas de test positif, et une probabilité post-test à 00% (VPN=100%) si le test négatif mais ça n'existe pas en réalité. Donc un bon test diagnostique est celui qui change la probabilité de la pathologie (augmentation ou diminution) à plus de 30%.

Les rapports de vraisemblance ce sont des ratios d'évaluation de l'importance de la variation entre la probabilité pré-test et post-test. Le LR+ et le LR- sont les rapports de vraisemblance pour un test positif et négatif respectivement, on défini trois points de référence pour ces rapports:

Le LR+ est associé à l'augmentation de la probabilité de la pathologie*:

- LR+=2 augmente la probabilité de la maladie à environ 15%
- LR+=5 augmente la probabilité de la maladie à environ 30%
- LR+=10 augmente la probabilité de la maladie à environ 45%

Le LR- est associé à la diminution de la probabilité de la pathologie*:

- LR-=0,5 diminue la probabilité de la maladie à environ 15%
- LR-=0,2 diminue la probabilité de la maladie à environ 30%
- LR-=0,1 diminue la probabilité de la maladie à environ 45%

Taux d'augmentation de la probabilité*	LR+	Apport au diagnostic	LR-	Taux de diminution de la probabilité*
>45%	>10	Très fort	<0,1	>45%
30-45%	5-10	Fort	0,1-0,2	30-45%
15-30%	2-5	Modéré	0,2-0,5	15-30%
00-15%	1-2	Faible	0,5-1	00-15%
00%	1	Nul	1	00%

- ***Remarque:** Ce ne sont que des estimations approximatives. Ils fonctionnent mieux lorsque la probabilité pré-test est d'environ 50%. Ils ne fonctionnent pas lorsqu'il y a une très faible probabilité (10% ou moins) ou une probabilité très élevée (90% ou plus).

ANNEXE 3: DONNEES DE LA POPULATION DES PATIENTS

N°	Date	Âge année	sexe	Taux Ptte G/L	% Ptte	Méthode directe				Interpretation VS=4800	Méthode indirecte			
						MI-FSC	MFI IgG	CV IgG	MFI IgM		% Ptte	MFI IgG	CV IgG	MFI IgM
1	17/12/18	51	H	37	93	60628,32	2342,55	78,24	1817,66	Négatif	90	3141	184	4511
2	17/12/18	63	F	88	85,4	46351,15	3174,53	80,6	4101,11	Négatif	88,4	7139,9	165,8	5603,3
3	6/1/19	42	H	44		33068,45	7652,68	123,38	3747,95	Positif		5776,1		6790,6
4	1/3/19	4	H	32		18055,47	8903,24	130,22	23458,53	Positif				
5	3/8/20	12	F	20		35252,08	9386,51	84,48	5691,82	Positif				
6	9/4/19	11	F	8		47734,93	935,24	257,55	11051,19	Positif				
7	17/2/21	26	F	9,4	34	89089,47	14430,44	136,73	15200,16	Positif				
8	17/6/19	24	F	8,1	43	86945,74	26885,34	137,63	30411,48	Positif				
9	9/10/19	19	F	18,9	27	53974,92	32289,88	95,56	24422,26	Positif				
10	3/6/19	30	F	24,2	61	56241,26	12331,66	131,36	18009,71	Positif				
11	22/4/19	16	H	5	7,4	77624,72	1044,19	353,25	4575,45	Négatif	72,1	14160	92,5	10986
12	29/4/19	17	H	4	1	51453	10721,09	99,06	4228,07	Positif	85	10287	99,4	4642
13	6/5/19	32	H	14	23	65508,53	1347,51	170,9	10910,44	Positif	86	1359	148	7789
14	13/5/19	24	H	3	4,5	90982,11	5042,18	214,49	1150,01	Positif	61	3708	172	3363
15	22/5/19	62	H	82	80	41525,3	4432,46	190	1318,91	Négatif	88	2817	211	3215
16	26/5/19	58	F	14	37	62367,91	7842,31	101,31	3727,92	Positif	77	7121	218	13710
17	26/5/19	70	F	51	98	40280	1691	316	8919	Positif	78	4549	134	90175
18	6/6/19	5	F	12	32	71974,89	17818,11	147,25	7397,21	Positif				
19	16/6/19	7	F	76	82	39959,72	7367,97	145,22	3790,48	Positif				
20	29/10/19	21	F	41	28	70726,9	3204,84	143,64	2635,05	Négatif				
21	27/10/19	59	H	8	8,1	18189,47	203642,6	111	29486,02	Positif	9,7	14404	106	7008
22	15/12/19	58	H	12	3,1	72081,34	2347,76	239,78	2122,03	Négatif	17	17829	137	10224
23	30/10/19	21	F	8	3,4	15211,51	24114,9	141,55	12769,28	Positif	54	22787	98	6508
24	19/12/19	26	H	74	38	32086,38	3918,73	124,15	2325,14	Négatif	50	5785	125	5660
25	22/12/19	0,1	F	26,2	2,6	100780,9	11011,45	129,68	5543,61	Positif	41	3508	160	4266

ANNEXES

N°	Date	Âge année	sexe	Taux Ptte G/L	% Ptte	Méthode directe				Interpretation		Méthode indirecte		
						MI-FSC	MFI IgG	CV IgG	MFI IgM	VS=4800	% Ptte	MFI IgG	CV IgG	MFI IgM
26	24/12/19	60	F	15	17	29662,07	1989,42	207,43	14735,09	Positif	18	4341	165	27860
27	24/12/19	62	F	51	60	67462	2445,54	212,92	11960,43	Positif	1,8	6804	169	36474
28	25/12/19	27	H	18	66	64122,71	10224,78	71,66	2980,41	Positif				
29	23/12/19	80	H	23,3	65	66283,52	3225,17	159,85	7102	Positif				
30	23/12/19	1	H	48	22	19764,86	1606,87	207,4	3460,39	Négatif				
31	16/9/20	23	F	15	53	78938,29	13690,96	50,03	2748,21	Positif				
32	20/1/20	27	F	14	41	60948,41	34904	47,91	1473,33	Positif				
33	21/1/20	46	F	65	72	63561,33	7585,06	75,36	1597,03	Positif				
34	4/2/20	42	H	56	55	86497,32	3996,57	162,3	1064,51	Négatif				
35	25/2/20	34	F	69	72	72010,32	3624,59	101,83	3346,44	Négatif				
36	5/3/20	29	F	45	28	103313,69	6402,95	157,7	4277,9	Positif				
37	3/3/20	62	H	32	85	64905,94	6707,7	74,55	3977,48	Positif				
38	24/3/20	42	F	14,8	35	103467,67	2693,69	185,68	2390,83	Négatif				
39	5/4/20	7	F	18	48	61987,47	8805,46	130,64	5564,3	Positif				
40	11/5/20	36	H	11,6	0,4	112787,71	19344,23	168,87	2721,25	Positif	12	29770	217	3874
41	13/5/20	58	H	7,3	12,2	67061,19	7577,47	188,15	5203,92	Positif	73	13839	215	8105
42	16/6/20	28	H	3	45	107974,51	23494,46	75,18	10056,63	Positif	63	8828	95	11629
43	16/6/20	20	F	88	58	85701,7	17450,62	87,31	5024,57	Positif	80	8848	153	2317
44	17/6/20	32	H	33	26,4	66175,34	9664,99	123,75	3847,81	Positif	76	4898	87	1921
45	19/11/19	62	H	17	12,8	15810,44	19574,54	157,31	5016,13	Positif				
46	24/11/19	1	F	54	83	11241,62	8730,13	76,42	5470,87	Positif				
47	24/11/19	73	F	89	86	10422,14	10480,72	78,6	5769,89	Positif				
48	19/11/19	50	F	9,8	35	33405,73	78228,66	53,96	4291,2	Positif				
49	19/11/19	56	H	4	0,7	32060,48	27814,03	144,9	15939,93	Positif				
50	4/11/19	30	H	16	3,5	109458,77	15213,21	88,53	3128,87	Positif				
51	29/10/19	52	F	6	16,8	20873,52	26766,06	110,72	6779,21	Positif				
52	27/10/19	31	F	35	21	68456,16	2230,12	227,19	3122,21	Négatif	77	8018	112	2752
53	22/10/19	42	H	15	29	68708,2	30281,15	100,33	6179,86	Positif	83	6176	115	1165
54	21/10/19	35	F	32	28	17090,2	5994,74	135,74	6766,71	Positif				
55	24/12/19	68	H	15	5,8	29788,05	22871,68	124,37	1601,49	Positif				

ANNEXES

N°	Date	Âge année	sexe	Taux Ptte G/L	% Ptte	Méthode directe				Interpretation		Méthode indirecte		
						MI-FSC	MFI IgG	CV IgG	MFI IgM	VS=4800	% Ptte	MFI IgG	CV IgG	MFI IgM
56	22/10/19	63	F	17	14	19544,86	5288,04	137,15	13536,79	Positif				
57	20/10/19	10	F	4	2,9	24859,73	42018,1	178,64	6799,72	Positif	65	17925	98	5942
58	15/10/19	42	F	3	2	26859,28	250737,7	90,24	40088,25	Positif				
59	15/10/19	34	F	18	38	70806,62	1558,29	230,5	2519,41	Négatif				
60	22/10/19	14	H	15	73	83850,05	1267,93	123,48	4199,75	Négatif	84	90571	107	2928
61	10/10/19	3	H	7	35	35138,41	4333,02	113,68	8682,22	Positif				
62	28/6/21	28	F	46	56	72133,24	2509,82	140,67	5351	Positif	42	8946	169	7460
63	20/7/20	26	F	80	62	72443,93	3425,27	165,45	828,71	Négatif				
64	5/3/20	2	F	14	41	58328,81	9064,6	134,3	10260,46	Positif	44	5035	128	3992
65	2/8/20	6	F	35	19	47915,54	5937,89	187,74	6470,92	Positif				
66	5/8/20	1	F	25	29	66083,15	8395,88	145,42	5070,13	Positif				
67	9/8/20	0,5	F	3	0,9	86755,19	3447,63	143,44	7409,74	Positif	78			1863
68	26/7/20	5,5	F	6,1	1	105045,3	7969,35	145,81	4365	Positif	63	3956	123	1957
69	28/7/20	3	F	45,5	44,7	62590,61	4949,55	140,02	3308,27	Positif				
70	2/8/20	4,5	F	37,3	34,8	49950,6	8701,26	134,42	4624,69	Positif				
71	9/8/20	21	F	80	62,5	40414,88	39949,8	94,08	3048,29	Positif	83			5931
72	12/10/20	28	H	33	33,6	73067,07	1950,33	253,42	1225,09	Négatif	85			12810
73	12/10/20	50	H	50	53,5	52365,07	32430,49	163,07	9956,59	Positif				
74	13/10/20	48	H	37,7	49	63940,04	12248,52	262	6708,46	Positif				
75	14/10/20	52	H	23,8	48	55453,99	11591,81	168,3	7066,4	Positif				
76	18/10/20	59	F	4	8,8	106317,58	10758,51	94,46	2305,11	Positif				
77	12/10/20	42	F	61	81,9	42827	12911	55,8	2019,6	Positif	85,1	6280	221	2940
78	25/10/20	3	F	39	53	53793,2	5189,09	109,87	3590,01	Positif	75			12318
79	25/10/20	6	F	24	37,5	88540,07	5000,87	183,17	6732,35	Positif	83			15769
80	2/12/20	22	F	40,6	17,8	90480,96	17744,93	145,78	10324,71	Positif	75			9688
81	1/12/20	25	F	54,5	42,2	116603,73	5943,45	108,24	4760,67	Positif	79			15876
82	2/12/20	41	F	69	77	71325,92	6273,72	96,23	4747,48	Positif	61			2844
83	1/12/20	7	H	59	62	63604,97	7335,13	133,56	1908,07	Positif	63	4995	157	
84	3/1/21	26	F	6,7	13,3	90190,02	6017,1	173,06	10172,05	Positif	56,7	11905	140	9724
85	5/1/21	36	F	13,9	37	94025,95	7716,39	114,9	3488,49	Positif	62			4909

ANNEXES

N°	Date	Âge	sexe	Taux Ptte G/L	% Ptte	Méthode directe				Interpretation VS=4800	Méthode indirecte			
						MI-FSC	MFI IgG	CV IgG	MFI IgM		% Ptte	MFI IgG	CV IgG	MFI IgM
86	5/1/21	10	F	73	31,1	95146,01	5555,86	159,81	4269,24	Positif	86	4144,9	174	7575,4
87	21/2/21	6	H	44,6	8,8	79434,64	5100,84	132,26	3889,22	Positif				
88	3/3/21	2	H	20	41,7	109943,4	18566,14	97,85	21763,57	Positif				
89	24/2/21	37	F	52	35	48381,22	5292,74	152,25	4106,76	Positif				
90	24/2/21	23	F	65	73	45394,42	21154,73	199,1	2112,73	Positif				
91	24/2/21	33	F	41	32	37475,51	33964,07	138,31	6101,5	Positif				
92	24/2/21	41	F	12	52	39607,14	24676,1	163,45	5698,29	Positif				
93	24/2/21	25	F	81	64	47957,04	34538,15	137,93	3053,68	Positif				
94	16/3/21	13	F	5,2	28	129730,98	5757,14	135,74	7443,72	Positif	31,5	2717	228	3861
95	16/3/21	52	F	15,2	25,9	37484,57	9805,56	151,73	4259,4	Positif	55	6007	99,3	3070
96	12/4/21	35	F	21	37	122440,1	11541,91	123,97	3734,91	Positif				
97	23/5/21	4	H	35	78	48753,15	19549,85	63,92	5583,25	Positif				
98	15/7/21	5	H	22,8	4,6	82359,79	9608,61	66,69	3529,45	Positif				
99	5/10/21	46	F	70,9	62	55413	1878	100	4937	Positif				
100	23/9/21	13	F	25	26	76217	7704	66	9592	Positif				
101	5/10/21	14	F	93	59,01	49912	7416	70	4501	Positif				
102	10/4/21	31	H	11,3	23	54851	898	109	16269	Positif				

Taux ptte: taux de plaquettes sur la NFS

Sexe: F=féminin H=masculin

% ptte: pourcentage des plaquettes exprimant (CD41, CD42b ou CD61)

MI-FSC: intensité moyenne du canal FSC

Interprétation: une Valeur MFI IgG ou IgM supérieure à 4800 est positive.

Recherche des anticorps antiplaquettes par cytométrie en flux chez les patients présentant une thrombopénie immunologique

RÉSUMÉ

Le purpura thrombopénique immunologique (PTI), est définie par la destruction périphérique des plaquettes circulantes par un mécanisme immunologique impliquant des auto-anticorps antiplaquettes, induisant une thrombopénie périphérique $<100\text{G/L}$ et un syndrome hémorragique cutanéomuqueux. Le diagnostic du PTI se pose après exclusion de toutes les autres causes de thrombopénies, car il n'existe pas actuellement un test biologique « gold standard » pouvant confirmer le diagnostic. Dans ce travail nous avons optimisé une technique de recherche directe des anticorps antiplaquettes par cytométrie en flux appelée PAIg, ensuite nous avons évalué ses performances dans le diagnostic du PTI.

Matériels et méthodes : il s'agit d'une étude cas-témoins, où nous avons réalisé une recherche directe des anticorps antiplaquettes chez 102 patients présentant un PTI confirmé selon les directives de l'ASH, et 204 témoins répartis entre 162 sujets sains et 42 témoins présentant une thrombopénie d'une autre étiologie. Après la préparation d'une suspension de plaquettes lavées, le marquage a été réalisé par une antiglobuline humaine polyvalente anti-IgG et anti-IgM couplés à FITC, plus un anticorps anti-GP plaquettaires (CD41a, CD42b ou CD61) couplés à la PE. Les résultats sont exprimés en MFI IgG ou IgM de 7000 plaquettes. L'évaluation des performances de la technique a été effectuée après traçage de la courbe ROC et fixation d'une valeur seuil du test.

Résultats : la recherche combinée des anticorps d'isotype IgG et IgM, a montré les meilleures performances par rapport à l'IgG seul ou l'IgM seul. La surface sous la courbe ROC était à 0,95, la sensibilité à 84,3%, la spécificité à 95,5% et le rapport de vraisemblance $\text{LR+}=19$ $\text{IC}[10-36]$, en faveur d'un excellent apport diagnostique de ce test dans le PTI. Il existe une corrélation négative entre la MFI et le taux de plaquettes, une MFI supérieure à 18.10^3 constitue un facteur de risque de thrombopénie sévère à moins de 30G/L. La surveillance des patients PTI par le test PAIg, a montré également une excellente corrélation entre le taux de plaquettes et la MFI.

Afin d'améliorer les performances de cette technique et standardiser ses résultats, on propose certaines recommandations relatives au choix et préparations de l'échantillon, méthode d'analyse et d'interprétation des résultats.

Conclusion : La technique du PAIg directe optimisée au niveau de notre laboratoire durant cette étude, est caractérisée par sa simplicité, sa rapidité et son coût très réduit, en plus des bonnes performances analytiques intrinsèques et extrinsèques, elle est donc très prometteuse pour qu'elle soit appliquée en pratique courante dans le diagnostic des thrombopénies immunologiques.

Mots clés : anticorps antiplaquettes, PTI, thrombopénie, cytométrie en flux, PAIg.

Detection of Platelet Associated Immunoglobulin by flow cytometry in patients with immune thrombocytopenia

ABSTRACT

Immune thrombocytopenia (or ITP) is defined by the peripheral destruction of circulating platelets by an immunological mechanism involving antiplatelets autoantibodies, inducing peripheral thrombocytopenia $<100\text{G/L}$ and a cutaneous-mucous hemorrhagic syndrome. The diagnosis of the ITP arises after exclusion from all the other causes of thrombocytopenia, as there is currently no "Gold Standard" biological test that can confirm the diagnosis. In this work we have optimized a direct research technique for antiplatelets antibodies by flow cytometry called PAIg, then we evaluated its performances in the diagnosis of ITP.

Materials and methods: This is a case–control study, where we have carried out direct research of Platelet Associated Immunoglobulin in 102 patients with a confirmed ITP according to the ASH guidelines, and 204 controls distributed between 162 healthy subjects and 42 controls presenting a thrombocytopenia of another etiology. After preparing a suspension of washed platelets, the marking was carried out by an mouse anti-human globulin anti-IgG and anti-IgM coupled with FITC, and an anti-Platelet antibody (CD41a, CD42b or CD61) coupled with PE. The results are expressed in MFI IgG or IgM of 7000 platelets. The technique performance assessment was carried out after tracking the ROC curve and selecting a test threshold value.

Results: Combined research of IgG and IgM antibodies has shown the best performance compared to IgG alone or IgM alone. The surface under the ROC curve was 0.95, sensitivity to 84.3%, specificity at 95.5% and the LR+likelihood ratio = 19 CI [10-36], in favor of an excellent diagnostic contribution of this test in the ITP. There is a negative correlation between the MFI and the platelets rate, an MFI greater than 18.10^3 constitutes a risk factor of severe thrombocytopenia less than 30G/l. In addition, monitoring ITP patients by the PAIg test show an excellent correlation between the platelets rate and the MFI.

In order to improve the performance of this technique and standardize the results, we have proposed recommendations relating to the choice and preparations of the sample, method of analysis and interpretation of the results.

Conclusion : the direct PAIg technique optimized in our laboratory during this study is characterized by its simplicity, speed and very reduced cost, in addition to the good intrinsic and extrinsic analytical performances, it is therefore very promising to either applied in routine practice in the diagnosis of immune thrombopenia.

Keywords : antiplatelets antibodies, PTI, thrombocytopenia, flow cytometry, PAIg.

Recherche des anticorps antiplaquettes par cytométrie en flux chez les patients présentant une thrombopénie immunologique

RÉSUMÉ

Le purpura thrombopénique immunologique (PTI), est définie par la destruction périphérique des plaquettes circulantes par un mécanisme immunologique impliquant des auto-anticorps antiplaquettes, induisant une thrombopénie périphérique $<100\text{G/L}$ et un syndrome hémorragique cutanéomuqueux. Le diagnostic du PTI se pose après exclusion de toutes les autres causes de thrombopénies, car il n'existe pas actuellement un test biologique « gold standard » pouvant confirmer le diagnostic. Dans ce travail nous avons optimisé une technique de recherche directe des anticorps antiplaquettes par cytométrie en flux appelée PAIg, ensuite nous avons évalué ses performances dans le diagnostic du PTI.

Matériels et méthodes : il s'agit d'une étude cas-témoins, où nous avons réalisé une recherche directe des anticorps antiplaquettes chez 102 patients présentant un PTI confirmé selon les directives de l'ASH, et 204 témoins répartis entre 162 sujets sains et 42 témoins présentant une thrombopénie d'une autre étiologie. Après la préparation d'une suspension de plaquettes lavées, le marquage a été réalisé par une antiglobuline humaine polyvalente anti-IgG et anti-IgM couplés à FITC, plus un anticorps anti-GP plaquettaire (CD41a, CD42b ou CD61) couplés à la PE. Les résultats sont exprimés en MFI IgG ou IgM de 7000 plaquettes. L'évaluation des performances de la technique a été effectuée après traçage de la courbe ROC et fixation d'une valeur seuil du test.

Résultats : la recherche combinée des anticorps d'isotype IgG et IgM, a montré les meilleures performances par rapport à l'IgG seul ou l'IgM seul. La surface sous la courbe ROC était à 0,95, la sensibilité à 84,3%, la spécificité à 95,5% et le rapport de vraisemblance $\text{LR}+=19$ $\text{IC}[10-36]$, en faveur d'un excellent apport diagnostique de ce test dans le PTI. Il existe une corrélation négative entre la MFI et le taux de plaquettes, une MFI supérieure à 18.10^3 constitue un facteur de risque de thrombopénie sévère à moins de 30G/L. La surveillance des patients PTI par le test PAIg, a montré également une excellente corrélation entre le taux de plaquettes et la MFI.

Afin d'améliorer les performances de cette technique et standardiser ses résultats, on propose certaines recommandations relatives au choix et préparations de l'échantillon, méthode d'analyse et d'interprétation des résultats.

Conclusion : La technique du PAIg directe optimisée au niveau de notre laboratoire durant cette étude, est caractérisée par sa simplicité, sa rapidité et son coût très réduit, en plus des bonnes performances analytiques intrinsèques et extrinsèques, elle est donc très prometteuse pour qu'elle soit appliquée en pratique courante dans le diagnostic des thrombopénies immunologiques.

Mots clés : anticorps antiplaquettes, PTI, thrombopénie, cytométrie en flux, PAIg.