



HAL
open science

Optimisation du diagnostic des thrombopénies constitutionnelles par l'utilisation des paramètres plaquettaires morphométriques

François-Xavier Doucet

► **To cite this version:**

François-Xavier Doucet. Optimisation du diagnostic des thrombopénies constitutionnelles par l'utilisation des paramètres plaquettaires morphométriques. Sciences pharmaceutiques. 2016. hal-01731792

HAL Id: hal-01731792

<https://hal.univ-lorraine.fr/hal-01731792>

Submitted on 14 Mar 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-thesesexercice-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

**UNIVERSITE DE LORRAINE
2016**

FACULTE DE PHARMACIE

**MEMOIRE
du DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES
de BIOLOGIE MEDICALE**

Soutenu devant le Jury Interrégional
Le 13 Juin 2016

Par François-Xavier DOUCET
né le 17 Décembre 1989 à Thionville (57)

Conformément aux dispositions de l'arrêté

du 4 octobre 1988 tient lieu de

**THESE
pour le DIPLOME D'ETAT
de DOCTEUR en PHARMACIE**

**Optimisation du diagnostic des thrombopénies constitutionnelles
par l'utilisation des paramètres plaquettaires morphométriques**

Membres du Jury

Président : Mme le Professeur B. FAIVRE, PU, Faculté de Pharmacie de Nancy

Juges : Mme le Docteur V. LATGER-CANNARD, PH, CHRU de Nancy,
Directrice de thèse
M. le Docteur J. PERRIN, MCU-PH, CHRU de Nancy,
Co-directeur de thèse
M. le Professeur T. LECOMPTE, PU-PH, HUG de Genève
M. le Professeur P. FEUGIER, PU-PH, CHRU de Nancy
M. le Docteur S. SALIGNAC, PH, CHRU de Nancy

UNIVERSITÉ DE LORRAINE
FACULTÉ DE PHARMACIE
Année universitaire 2015-2016

DOYEN

Francine PAULUS

Vice-Doyen

Béatrice FAIVRE

Directeur des Etudes

Virginie PICHON

Conseil de la Pédagogie

Président, Brigitte LEININGER-MULLER

Collège d'Enseignement Pharmaceutique Hospitalier

Président, Béatrice DEMORE

Commission Prospective Facultaire

Président, Christophe GANTZER

Vice-Président, Jean-Louis MERLIN

Commission de la Recherche

Président, Raphaël DUVAL

Responsable de la filière Officine

Béatrice FAIVRE

Responsables de la filière Industrie

Isabelle LARTAUD,

Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

Responsable de la filière Hôpital

Béatrice DEMORE

Responsable Pharma Plus ENSIC

Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

Responsable Pharma Plus ENSAIA

Raphaël DUVAL

Responsable de la Communication

Marie-Paule SAUDER

**Responsable de la Cellule de Formation Continue
et individuelle**

Béatrice FAIVRE

**Responsable de la Commission d'agrément
des maîtres de stage**

Béatrice FAIVRE

Responsables des échanges internationaux

Bertrand RIHN

Responsable ERASMUS

Mihayl VARBANOV

DOYENS HONORAIRES

Chantal FINANCE

Claude VIGNERON

PROFESSEURS EMERITES

Jeffrey ATKINSON

Jean-Claude BLOCK

Max HENRY

Gérard SIEST

Claude VIGNERON

PROFESSEURS HONORAIRES

Roger BONALY

Pierre DIXNEUF

Marie-Madeleine GALTEAU

Thérèse GIRARD

Michel JACQUE

Pierre LABRUDE

Vincent LOPPINET

Janine SCHWARTZBROD

Louis SCHWARTZBROD

MAITRES DE CONFERENCES HONORAIRES

Monique ALBERT

Mariette BEAUD

Gérald CATAU

Jean-Claude CHEVIN

Jocelyne COLLOMB

Bernard DANGIEN

Marie-Claude FUZELLIER

Françoise HINZELIN

Francine KEDZIEREWICZ

Marie-Hélène LIVERTOUX

Bernard MIGNOT

Jean-Louis MONAL

Blandine MOREAU

Dominique NOTTER

ASSISTANTS HONORAIRES

Marie-Catherine BERTHE
Annie PAVIS

Christine PERDICAKIS
Marie-France POCHON
Anne ROVEL
Maria WELLMAN-ROUSSEAU

ENSEIGNANTS	<i>Section CNU*</i>	<i>Discipline d'enseignement</i>
PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS		
Danièle BENSOUSSAN-LEJZEROWICZ	82	<i>Thérapie cellulaire</i>
Jean-Louis MERLIN	82	<i>Biologie cellulaire</i>
Alain NICOLAS	80	<i>Chimie analytique et Bromatologie</i>
Jean-Michel SIMON	81	<i>Economie de la santé, Législation pharmaceutique</i>
Nathalie THILLY	81	<i>Santé publique et Epidémiologie</i>
PROFESSEURS DES UNIVERSITES		
Christine CAPDEVILLE-ATKINSON	86	<i>Pharmacologie</i>
Joël DUCOURNEAU	85	<i>Biophysique, Acoustique, Audioprothèse</i>
Raphaël DUVAL	87	<i>Microbiologie clinique</i>
Béatrice FAIVRE	87	<i>Biologie cellulaire, Hématologie</i>
Luc FERRARI	86	<i>Toxicologie</i>
Pascale FRIANT-MICHEL	85	<i>Mathématiques, Physique</i>
Christophe GANTZER	87	<i>Microbiologie</i>
Frédéric JORAND	87	<i>Eau, Santé, Environnement</i>
Isabelle LARTAUD	86	<i>Pharmacologie</i>
Dominique LAURAIN-MATTAR	86	<i>Pharmacognosie</i>
Brigitte LEININGER-MULLER	87	<i>Biochimie</i>
Pierre LEROY	85	<i>Chimie physique</i>
Philippe MAINCENT	85	<i>Pharmacie galénique</i>
Alain MARSURA	32	<i>Chimie organique</i>
Patrick MENU	86	<i>Physiologie</i>
Jean-Bernard REGNOUF de VAINS	86	<i>Chimie thérapeutique</i>
Bertrand RIHN	87	<i>Biochimie, Biologie moléculaire</i>
MAITRES DE CONFÉRENCES DES UNIVERSITÉS - PRATICIENS HOSPITALIERS		
Béatrice DEMORE	81	<i>Pharmacie clinique</i>
Julien PERRIN	82	<i>Hématologie biologique</i>
Marie SOCHA	81	<i>Pharmacie clinique, thérapeutique et biotechnique</i>
MAITRES DE CONFÉRENCES		
Sandrine BANAS	87	<i>Parasitologie</i>
Xavier BELLANGER	87	<i>Parasitologie, Mycologie médicale</i>
Emmanuelle BENOIT	86	<i>Communication et Santé</i>
Isabelle BERTRAND	87	<i>Microbiologie</i>
Michel BOISBRUN	86	<i>Chimie thérapeutique</i>
François BONNEAUX	86	<i>Chimie thérapeutique</i>
Ariane BOUDIER	85	<i>Chimie Physique</i>
Cédric BOURA	86	<i>Physiologie</i>
Igor CLAROT	85	<i>Chimie analytique</i>
Joël COULON	87	<i>Biochimie</i>
Sébastien DADE	85	<i>Bio-informatique</i>
Dominique DECOLIN	85	<i>Chimie analytique</i>
Roudayna DIAB	85	<i>Pharmacie galénique</i>
Natacha DREUMONT	87	<i>Biochimie générale, Biochimie clinique</i>
Florence DUMARCAY	86	<i>Chimie thérapeutique</i>
François DUPUIS	86	<i>Pharmacologie</i>
Adil FAIZ	85	<i>Biophysique, Acoustique</i>
Anthony GANDIN	87	<i>Mycologie, Botanique</i>
Caroline GAUCHER	86	<i>Chimie physique, Pharmacologie</i>
Stéphane GIBAUD	86	<i>Pharmacie clinique</i>
Thierry HUMBERT	86	<i>Chimie organique</i>
Olivier JOUBERT	86	<i>Toxicologie, Sécurité sanitaire</i>

ENSEIGNANTS (suite)	Section CNU*	Discipline d'enseignement
Alexandrine LAMBERT	85	Informatique, Biostatistiques
Julie LEONHARD	86/01	Droit en Santé
Christophe MERLIN	87	Microbiologie environnementale
Maxime MOURER	86	Chimie organique
Coumba NDIAYE	86	Epidémiologie et Santé publique
Francine PAULUS	85	Informatique
Caroline PERRIN-SARRADO	86	Pharmacologie
Virginie PICHON	85	Biophysique
Sophie PINEL	85	Informatique en Santé (e-santé)
Anne SAPIN-MINET	85	Pharmacie galénique
Marie-Paule SAUDER	87	Mycologie, Botanique
Guillaume SAUTREY	85	Chimie analytique
Rosella SPINA	86	Pharmacognosie
Gabriel TROCKLE	86	Pharmacologie
Mihayl VARBANOV	87	Immuno-Virologie
Marie-Noëlle VAULTIER	87	Mycologie, Botanique
Emilie VELOT	86	Physiologie-Physiopathologie humaines
Mohamed ZAILOU	87	Biochimie et Biologie moléculaire
Colette ZINUTTI	85	Pharmacie galénique
PROFESSEUR ASSOCIE		
Anne MAHEUT-BOSSER	86	Sémiologie
MAITRE DE CONFERENCES ASSOCIE		
Alexandre HARLE	82	Biologie cellulaire oncologique
PROFESSEUR AGREGE		
Christophe COCHAUD	11	Anglais

***Disciplines du Conseil National des Universités :**

80 : Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences physico-chimiques et ingénierie appliquée à la santé

81 : Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences du médicament et des autres produits de santé

82 : Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences biologiques, fondamentales et cliniques

85 ; Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences physico-chimiques et ingénierie appliquée à la santé

86 : Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences du médicament et des autres produits de santé

87 : Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences biologiques, fondamentales et cliniques

32 : Personnel enseignant-chercheur de sciences en chimie organique, minérale, industrielle

11 : Professeur agrégé de lettres et sciences humaines en langues et littératures anglaises et anglo-saxonnes

SERMENT DES APOTHICAIRES



Je jure, en présence des maîtres de la Faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

D' honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.



« LA FACULTE N'ENTEND DONNER AUCUNE
APPROBATION, NI IMPROBATION AUX
OPINIONS EMISES DANS LES THESES, CES
OPINIONS DOIVENT ETRE CONSIDEREES
COMME PROPRES A LEUR AUTEUR ».

REMERCIEMENTS

A Madame le Professeur Béatrice FAIVRE,
PU, Faculté de Pharmacie de Nancy, Hématologie.

Vous me faites l'honneur d'accepter la présidence de cette thèse.

Veillez recevoir l'expression de mon respect et de ma profonde reconnaissance.

A Madame le Docteur Véronique LATGER-CANNARD,
PH, Service d'Hématologie Biologique – CHRU de Nancy.

Je vous remercie pour la confiance que vous m'avez accordée en me dirigeant dans ce travail, pour votre soutien et votre motivation. Un grand merci également pour vos encouragements et tout le temps que vous m'avez consacré, pour vos connaissances et vos conseils qui m'ont beaucoup aidé.

Soyez assurée de ma sincère reconnaissance.

A Monsieur le Docteur Julien PERRIN,

MCU-PH, Faculté de Pharmacie de Nancy, Service d'Hématologie Biologique – CHRU de Nancy.

Je te remercie pour l'aide que tu m'as apportée, d'autant plus lors de la finalisation de ce travail. Un grand merci également pour tes conseils et tes connaissances qui m'ont épaulé durant mon internat.

Sois assuré de ma sincère reconnaissance.

A Monsieur le Professeur Thomas LECOMPTE,

PU-PH, Faculté de Médecine de Genève, Service d'Hématologie – HUG de Genève.

Je vous suis très reconnaissant de l'honneur que vous me faites de juger cette thèse et d'apporter vos compétences à la critique de ce travail.

Je vous remercie d'avoir fait le déplacement jusqu'à Nancy pour être présent parmi nous.

Veuillez trouver ici l'expression de mon profond respect.

A Monsieur le Professeur Pierre FEUGIER,

PU-PH, Faculté de Médecine de Nancy, Service d'Hématologie Clinique – CHRU de Nancy.

C'est pour moi un grand honneur de vous compter parmi mes juges et je vous remercie sincèrement pour votre disponibilité.

Soyez assuré de ma reconnaissance et de mon profond respect.

A Monsieur le Docteur Sylvain SALIGNAC,

PH, Service d'Hématologie Biologique – CHRU de Nancy.

Je te remercie pour ton aide dans ce travail, ton analyse critique de mes données ainsi que tes remarques tant sur le plan statistique que technique. Egaleme nt merci pour ton point de vue qualité auquel s'ajoute ta bonne humeur qui ont agrémenté mon travail tout du long.

Sois assuré de toute ma gratitude.

Je tiens également à remercier :

Toute l'équipe du service d'Hématologie Biologique,

Merci pour votre accueil et votre sympathie. Merci pour avoir pris le temps de me former et pour m'avoir donné l'envie de poursuivre dans cette discipline. Merci en particulier à toute l'équipe de cytologie pour leur sympathie et leur joie de vivre. En dépit de tous les problèmes que l'on vous connaît, vous avez fait preuve d'une efficacité remarquable !

Merci à tous les professionnels, pharmaciens et médecins, qui m'ont accueilli durant mon internat et qui m'ont enseigné le savoir-faire et les préceptes du biologiste médical. A tous les techniciennes et techniciens qui ont considérablement participé à ma formation tout au long de ces années d'internat.

A mes parents,

Merci pour votre présence, votre écoute, votre soutien, votre fierté, votre confiance et vos encouragements à toute épreuve.

*Il m'est difficile d'exprimer toute la reconnaissance et l'admiration que j'ai pour vous.
Je vous dédie cette thèse.*

A Pierre-Yves et Aude,

Merci pour votre soutien et à la « course » à laquelle nous avons été confronté pour en arriver à ce dernier mémoire. Ça n'a été que plus de motivation.

A Alex,

Je garde pour nous les démonstrations d'Amour !

Mais MERCI d'être là, si attentionnée et si patiente, c'est tellement précieux pour moi.

A mes grands-parents,

Que je ne vois maintenant que trop peu...merci pour votre soutien et vos attentions qui comptent beaucoup pour moi.

A l'ensemble de ma famille,

Pour vos encouragements et tous les bons moments partagés.

A Sylvain Henry,

*LE technicien qui a largement contribué à ce travail, tes compétences, ta passion, ton esprit critique et ta bonne humeur ont été si précieux ! Je sais qu'un certain contexte t'as été quelque fois difficile à surmonter, je t'en suis d'autant plus reconnaissant.
Reste comme tu es, je n'ai que trop rarement rencontré un technicien aussi investi.*

A mes amis de la fac,

Pol, Romain, Xavier, Nico, *en souvenir des années d'études et tous les moments partagés !
De la balançoire à notre balade en 4L ma tête est pleine de belles images.
En espérant continuer à vous voir très longtemps.*

Aux amis Guillaume et Damien,

Vous êtes partis bien trop loin et on ne se voit que trop peu, merci pour tous les bons moments passés.

A Delphine et Benoit,

Pour toutes ces parties de squash et ces bons moments partagés. Thobe et tous ces kilomètres parcourus à s'instruire et à refaire le monde (je remercie aussi Bernard, Jean-Claude, le cadreur, à la prise de son... !!)

A tous mes co-internes,

*Vous avez rendu encore plus agréables ces années d'internat. A ceux qui ont déjà finis **Lulu** et **Lolo**, **Alain** et Monseigneur **Léon**, sans oublier les plus contemporains. Merci pour tous ces moments de détente et de partage.*

Enfin j'adresse mes remerciements les plus sincères à tous ceux qui ont de près ou de loin contribué à la réussite de mon parcours, à mon épanouissement personnel et qui me sont chers.

TABLE DES MATIERES

Remerciements	7
Liste des abréviations	3
Table des tableaux	5
Table des figures	7
Introduction	8
1 Classification des thrombopénies constitutionnelles.....	10
1.1 Plaquettes de petite taille	13
1.1.1 Syndrome de Wiskott-Aldrich.....	13
1.1.2 Thrombopénie liée à l’X (XLT)	16
1.1.3 Thrombopénie avec absence de radius (TAR)	17
1.1.4 Amégacaryocytose congénitale (CAMT).....	20
1.1.5 Thrombopénie avec mutation du cytochrome c (CYCS-RT).....	21
1.2 Plaquettes de taille normale ou modérément augmentée.....	23
1.2.1 Thrombopénie familiale avec prédisposition aux leucémies aiguës myéloïdes (FPD/AML).....	23
1.2.2 Thrombopénie de Paris-Trousseau (TCPT) / Syndrome de Jacobsen (JBS)	25
1.2.3 Thrombopénies liées à l’X avec mutations GATA-1	26
1.2.3.a Thrombopénie liée à l’X avec thalassémie (XLTT)	26
1.2.3.b Thrombopénie liée à l’X avec dysérythropoïèse.....	27
1.2.4 Thrombopénie avec mutation de l’ANKRD26 (ANKRD26-RT) ou THC2	27
1.2.5 Amégacaryocytose avec synostose radio-cubitale (CTRUS).....	29
1.2.6 Pseudo-Willebrand plaquettaire	30
1.2.7 Thrombopénie liée à ETV6	31
1.3 Plaquettes de taille augmentée.....	33
1.3.1 Macrothrombopénie liée à TUBB-1	33
1.3.2 Syndrome des plaquettes grises (GPS).....	34
1.3.3 Thrombopénie liée à FLNA	36
1.3.4 Thrombopénie liée à GFI1B.....	37
1.3.5 Syndrome de Bernard-Soulier variant monoallélique	37
1.3.6 Thrombopénie liée à ACTN-1.....	39
1.3.7 Thrombopénie liée à ITGA2B/ITGB3	41
1.4 Plaquettes de tailles géantes	42
1.4.1 Syndrome MYH9	42
1.4.2 Syndrome de Bernard-Soulier variant biallélique	46
1.4.3 Macrothrombopénie liée à PRKACG	47
2 Purpura thrombopénique immunologique.....	49
3 Démarche diagnostique	51
3.1 Clinique	51
3.1.1 Histoire médicale personnelle et familiale	52
3.1.2 Examen physique approfondi	53
3.2 Biologique	54
3.2.1 Automate XN SYSMEX®	54
3.2.1.a Principes de l’hématimètre XN SYSMEX®	54
3.2.1.b Numération plaquettaire.....	64
3.2.1.c Paramètres morphométriques automatisés.....	66
3.2.2 Frottis	78
3.2.2.a Taille plaquettaire	78

3.2.2.b	Morphologie plaquettaire.....	79
3.2.2.c	Morphologie des autres lignées cellulaires.....	80
3.2.3	Exploration fonctionnelle.....	80
3.2.3.a	Tests globaux.....	81
3.2.3.b	Analyse des fonctions plaquettares.....	82
3.2.4	Génétique.....	91
4	Objectifs.....	93
5	Matériels.....	95
5.1	Automate utilisé.....	95
5.2	Inclusions des sujets.....	96
5.2.1	Témoins.....	96
5.2.2	Patients.....	96
6	Méthodes.....	98
6.1	Paramètres utilisés.....	98
6.2	Pré-analytique.....	99
6.2.1	Délai pré-analytique.....	99
6.2.2	Choix de l'anticoagulant.....	99
6.3	Extraction des données.....	100
6.4	Statistiques.....	100
6.4.1	Evaluation des paramètres.....	100
6.4.2	Etude de stabilité.....	101
6.4.3	Groupes de TC.....	102
7	Résultats.....	103
7.1	Evaluation des performances des paramètres plaquettares.....	103
7.1.1	Fidélité des paramètres plaquettares.....	103
7.1.2	Incertitudes des paramètres plaquettares.....	105
7.1.3	Stabilité des paramètres plaquettares.....	107
7.2	Valeurs témoins.....	114
7.3	Groupes de TC.....	115
7.3.1	Thrombopénies constitutionnelles à plaquettes géantes.....	117
7.3.2	Thrombopénies constitutionnelles à grandes plaquettes.....	119
7.3.3	Thrombopénies constitutionnelles à plaquettes normales.....	120
7.3.4	Thrombopénies constitutionnelles à petites plaquettes.....	121
7.3.5	Purpura thrombopénique immunologique.....	122
7.4	Seuils discriminants.....	123
7.4.1	Détermination.....	123
7.4.2	Application.....	128
7.4.3	Cas du PTI.....	130
8	Discussion.....	132
8.1	Critères de validation de méthode.....	132
8.2	Etablissement des valeurs témoins.....	136
8.3	Classification paramétrique des TC.....	138
8.4	Distinction avec le purpura thrombopénique immunologique.....	139
8.5	Algorithme diagnostique.....	142
9	Conclusion.....	147
	Bibliographie.....	149
	Annexes.....	164
	Résumé :.....	173

Liste des abréviations

5-HT*	5-HydroxyTryptamine radiomarquée (= sérotonine)
βTG	Béta-thromboglobuline
A	
ADP	Adénosine DiPhosphate
ATP	Adénosine TriPhosphate
AMPc	Adénosine Monophosphate cyclique
ARN	Acides RiboNucléiques
ARNm	ARN messenger
AUC	Aire Sous la Courbe
B	
BAT	<i>Bleeding Assessment Tool</i>
BSS	Syndrome de Bernard-Soulier
BSSm	Syndrome de Bernard-Soulier variant monoallélique
C	
CIQ	Contrôle de Qualité Interne
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CMF	Cytométrie en Flux
COX	Cyclo-oxygénase
C.R.P.P.	Centre de Référence des Pathologies Plaquettaires
CSH	Cellule Souche Hématopoïétique
CV	Coefficient de Variation
E	
EDTA	Acide Ethylène Diamine Tétracétique
EEQ	Evaluation Externe de la Qualité
EFS	Etablissement Français du Sang
F	
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FSC	<i>Forward Scattered light</i>
G	
GDP	Guanosine DiPhosphate
GPS	Syndrome des Plaquettes Grises
GTP	Guanosine TriPhosphate
H	
HTAP	Hypertension Artérielle Pulmonaire
I	
IC	Intervalle de Confiance
ICSH	<i>International Council for Standardization in Haematology</i>
IDP	Indice de Dispersion Plaquettaire
IPF	Indice Plaquettaire de Fluorescence
ISTH	<i>International Society on Thrombosis and Haemostasis</i>

M

MGG May Grünwald Giemsa
MK Mégacaryocytes

N

NABM Nomenclature des Actes de Biologie Médicale
NFS Numération et Formule Sanguine
NGS Séquençage de Nouvelle Génération
NMM-II Myosine Non Musculaire de type II
NMMHC-IIA Chaîne Lourde de Myosine Non Musculaire de type IIA

P

PDW *Platelet size Deviation Width*
PF4 Facteur 4 plaquettaire
PKA Protéine Kinase A
P-LCR *Platelet Large Cell Ratio*
PLT-I Numération Plaquettaire par Impédance
P-MFV Volume Plaquettaire le plus fréquent
PRGC *Platelets Ratio Great Cells*
PPP Plasma Pauvre en Plaquettes
PRP Plasma Riche en Plaquettes
PTI Purpura Thrombopénique Immunologique

R

ROC *Receiver Operating Characteristic*
RP Plaquettes Réticulées

S

SFL *Side Fluorescent light*
SSC *Side Scattered light*

T

TC Thrombopénie Constitutionnelle
TPO Thrombopoïétine
TS Temps de saignement
TXA2 Thromboxane A2

V

VPM Volume Plaquettaire Moyen
VPN Valeur Prédicative Négative
VPP Valeur Prédicative Positive
vWF Facteur Von Willebrand

TABLE DES TABLEAUX

Tableau I : Classification des thrombopénies constitutionnelles en fonction de la taille plaquettaire.....	11
Tableau II : Eléments sémiologiques de différences entre PTI et TC.....	52
Tableau III : Tableau comparatif des volumes sanguins analysés par les trois canaux d'analyse plaquettaire du XN SYSMEX®.....	62
Tableau IV : Tableau présentant les CV des trois canaux du XN SYSMEX® en fonction de deux populations de patients différentes.....	66
Tableau V : Valeurs de référence des principaux indices plaquettares.....	68
Tableau VI: Classification des TC selon la taille plaquettaire.....	79
Tableau VII : Tableau récapitulatif des anomalies d'agrégation plaquettaire dans le cadre des TC.....	85
Tableau VIII : Tableau récapitulatif des anomalies glycoprotéiques dans le cadre des TC. ...	87
Tableau IX : Tableau récapitulatif des anomalies granulaires dans le cadre des TC.....	91
Tableau X : Tableau de répartition des inclusions de patients TC par centre.....	97
Tableau XI : Valeurs de répétabilité des paramètres plaquettaire.....	103
Tableau XII : Valeurs de fidélité intermédiaire des paramètres plaquettares.....	104
Tableau XIII : Calculs d'incertitudes des paramètres plaquettares.....	106
Tableau XIV : Résultats étude de stabilité des paramètres plaquettaire.....	107
Tableau XV : Détermination des biais limite pour l'étude de stabilité.....	109
Tableau XVI : Résultats des biais de l'étude de stabilité des paramètres plaquettaire.....	111
Tableau XVII : Valeurs brutes de l'ensemble des témoins sains.....	114
Tableau XVIII : Valeurs témoins des paramètres obtenus à l'aide du canal fluorescent.....	114
Tableau XIX : Valeurs témoins des paramètres obtenus à l'aide du canal impédance.....	115
Tableau XX : Résultats des valeurs des différents paramètres plaquettares des patients inclus dans le groupe "plaquettes géantes".....	118
Tableau XXI : Liste des mutations retrouvées dans le gène <i>MYH9</i> des patients inclus.....	118
Tableau XXII : Liste des mutations retrouvées chez les patients inclus atteints d'un syndrome de Bernard-Soulier.....	119
Tableau XXIII : Résultats des valeurs des différents paramètres plaquettares des patients inclus dans le groupe "grandes plaquettes".....	119
Tableau XXIV : Liste des mutations retrouvées chez les patients inclus atteints d'un syndrome des plaquettes grises.....	120
Tableau XXV : Liste des mutations retrouvées chez les patients inclus atteints d'une thrombopénie liée à <i>FLNA</i>	120
Tableau XXVI : Résultats des valeurs des différents paramètres plaquettares des patients inclus dans le groupe "plaquettes normales".....	121
Tableau XXVII : Liste des mutations retrouvées chez les patients inclus atteints d'une thrombopénie FPD/AML.....	121
Tableau XXVIII : Liste des mutations retrouvées chez les patients inclus atteints d'une TC liée à <i>ANKRD26</i>	121
Tableau XXIX : Résultats des valeurs des différents paramètres plaquettares des patients inclus dans le groupe "petites plaquettes".....	122
Tableau XXX : Liste des mutations retrouvées chez les patients inclus atteints d'une TC à petites plaquettes.....	122
Tableau XXXI : Résultats des valeurs des différents paramètres plaquettares des patients inclus dans le groupe PTI.....	122
Tableau XXXII : Tableau regroupant les différents seuils déterminés pour chaque paramètre dans le cadre des TC à plaquettes géantes.....	124

Tableau XXXIII : Tableau regroupant les différents seuils déterminés pour chaque paramètre dans le cadre des TC à grandes plaquettes.	125
Tableau XXXIV : Tableau regroupant les différents seuils déterminés pour chaque paramètre dans le cadre des TC à plaquettes de taille normale.....	126
Tableau XXXV : Tableau regroupant les différents seuils déterminés pour chaque paramètre dans le cadre des TC à petites plaquettes.	127
Tableau XXXVI : Tableau récapitulatif des performances des différentes combinaisons paramétriques pour chaque catégorie de TC.	128
Tableau XXXVII : Tableau des résultats de l'application des algorithmes de classement des TC dans la population thrombopénique du CHRU de Nancy pour la période de décembre 2015 à janvier 2016.	129
Tableau XXXVIII : Tableau récapitulatif des données ROC dans les cas de PTI.....	131
Tableau XXXIX : Tableau récapitulatif des valeurs de références des paramètres plaquettaires, selon les auteurs.	136
Tableau XL : Tableau de la classification des TC selon les paramètres automatisés XN SYSMEX® par le canal PLT-F.....	138
Tableau XLI : Tableau récapitulatif des courbes ROC dans la modélisation PTI vs BSS.....	140

TABLE DES FIGURES

Figure 1 : Schéma récapitulatif de la localisation de l'impact de chaque mutation	10
Figure 2 : Schéma de la physiopathologie de l'activation de WASp.....	14
Figure 3 : Un nouveau-né atteint de Thrombopénie avec Absence de Radius.....	18
Figure 4 : Schéma des mutations responsables du syndrome TAR	19
Figure 5 : Ultrastructure des particules intra-cytoplasmiques liées à <i>ANKRD26</i>	28
Figure 6 : Dysmégacaryopoïèse liée à la mutation <i>TUBB-1</i>	34
Figure 7 : Photographies au microscope optique (x1000) de plaquettes optiquement vides dans le cadre d'un patient souffrant de GPS.	35
Figure 8 : Schéma d'organisation d'un réseau de filaments d'actine.....	40
Figure 9 : Frottis sanguin (x1000) d'un patient atteint d'un syndrome MYH9.	43
Figure 10 : Schéma structurel de NMMHC-IIA	44
Figure 11 : Schéma illustrant les phénomènes parasites du comptage par impédance en absence de focalisation hydrodynamique.	55
Figure 12 : Technologie de focalisation hydrodynamique par double manchonnage. XN SYSMEX®.....	56
Figure 13 : Courbe de distribution plaquettaire obtenue par le canal impédance du XN SYSMEX®.....	57
Figure 14 : Schéma simplifié de la technologie de fluorocytométrie tridimensionnelle.	59
Figure 15 : Scattergrammes du canal RET sur SYMEX® XN.....	60
Figure 16 : Caractéristiques du marquage fluorescent sur le canal PLT-F, XN SYSMEX®..	61
Figure 17 : Scattergramme du canal PLT-F sur XN SYSMEX®.....	63
Figure 18 : Graphiques XN SYSMEX® des différents canaux permettant de mettre en évidence les amas plaquettaires.....	65
Figure 19 : Courbe de distribution plaquettaire obtenue par technologie impédance.....	67
Figure 20 : Mécanismes potentiels associant une augmentation du VPM et un facteur de risque cardiovasculaire.....	69
Figure 21 : Variations de taille plaquettaire en microscopie optique.....	78
Figure 22 : Schéma du principe d'agrégation plaquettaire par méthode photométrique.....	83
Figure 23 : Exemple de profils en agrégation plaquettaire en réponse à divers agonistes.....	84
Figure 24 : Scattergrammes de CMF illustrant la technique d'étude des granules denses plaquettaires par le test à la mépacrine.....	89
Figure 25 : Scattergrammes de CMF illustrant la technique d'étude des granules denses plaquettaires par immunomarquage anti-CD63.	90
Figure 26 : Représentations graphiques de la stabilité des paramètres du canal impédance.	112
Figure 27 : Représentations graphiques de la stabilité des paramètres du canal fluorescent.	113
Figure 28 : Représentations graphiques des différents paramètres étudiés par TC.	116
Figure 29 : Arbre généalogique de ce pedigree FPD/AML.	120
Figure 30 : Tableau des performances des différents paramètres utilisés par Noris <i>et al.</i> pour le classement des TC à plaquettes géantes.	124
Figure 31 : Tableau des performances des différents paramètres utilisés par Noris <i>et al.</i> pour le classement des TC à petites plaquettes.....	127
Figure 32 : Arbre diagnostique des TC à plaquettes géantes.	143
Figure 33 : Arbre diagnostique des TC à grandes plaquettes.....	144
Figure 34 : Arbre diagnostique des TC à plaquettes de taille normale.	145
Figure 35 : Arbre diagnostique des TC à plaquettes de petite taille.....	146

INTRODUCTION

Les plaquettes sont les plus petites cellules circulantes sanguines mais elles jouent un rôle important et primordial dans les processus d'hémostase. Ainsi dans les cas de déficit quantitatif en ce type cellulaire ou en cas d'anomalie qualitative, les patients peuvent être exposés à un risque hémorragique plus ou moins important.

De multiples causes peuvent conduire à une thrombopénie et dans la majorité des cas celle-ci est d'origine acquise, comme par exemple les thrombopénies iatrogènes ou liées à diverses affections. Dans de rares cas l'origine peut être génétique, on parle alors de thrombopénie constitutionnelle. Celle-ci peut être transmise de manière héréditaire par les parents ou alors découler d'une mutation *de novo*. Certaines formes sont également associées à d'autres anomalies congénitales à type de malformations ou de déficit immunitaire, on parle alors de formes syndromiques.

Actuellement la littérature a rapporté 23 formes de thrombopénies constitutionnelles (TC) portées par 22 gènes différents. C'est un groupe d'entités qui reste méconnu, tant du côté des cliniciens que des biologistes, bien que depuis quelques années ce sujet fasse l'objet de fréquentes publications internationales.

En effet divers auteurs ont montré qu'un nombre non négligeable de patients ont été initialement diagnostiqués comme souffrant d'une forme acquise de thrombopénie, un purpura thrombopénique immunologique (PTI), alors qu'ils étaient atteints d'une forme de TC. Ceci a conduit, dans de nombreux cas, à des traitements, médicamenteux et/ou chirurgicaux inappropriés pour des pathologies qui pour certaines formes ne nécessitaient aucune thérapeutique.

Ce diagnostic de TC est d'une réelle importance, en sus d'étiqueter la pathologie du patient, il permet une meilleure prise en charge de ce dernier. En effet, pour certaines formes de TC, un risque supérieur à la population générale de survenue d'hémopathies malignes ou de complications touchant divers organes a été démontré. Il est nécessaire pour ces patients, d'établir une surveillance particulière afin de détecter au plus tôt ces complications et ainsi les prendre en charge par des thérapeutiques adaptées. De plus, pour ces dernières entités, la connaissance et la caractérisation de la pathologie est primordiale afin de tenter de garantir la réussite d'éventuelles greffes de cellules souches hématopoïétiques familiales.

Malgré tout, le diagnostic de ces TC reste problématique. En effet, il existe aucune standardisation dans la démarche diagnostique à adopter. Différentes publications rapportent des algorithmes détaillant les examens à réaliser mais aucun consensus n'existe actuellement. Il est souvent fait référence à des tests plus ou moins spécialisés uniquement réalisés dans certains centres experts dans le domaine. Néanmoins des examens de première ligne, disponibles dans de nombreux laboratoires, peuvent permettre une première orientation avant de réaliser des examens plus spécifiques.

De plus, même au niveau de la classification de ces pathologies les points de vue divergent. En effet une grande diversité de classements existe dans la littérature, selon différents aspects de ces pathologies.

Ces deux derniers points concourent probablement à la méconnaissance et au sous-diagnostic de ces pathologies.

Ce présent travail a donc pour objectif d'apporter des éléments de standardisation dans la démarche diagnostique, par l'utilisation de paramètres plaquettaires morphologiques automatisés, répétables, reproductibles et adaptés à la prise en charge en temps réel des patients.

L'étude que nous exposons dans ce travail est multicentrique et rétrospective. En effet nous analysons l'ensemble des paramètres précédents chez des patients diagnostiqués souffrant de thrombopénie constitutionnelle et le choix des paramètres a été fait sur la base de l'étude de leurs performances.

Ce travail a été possible grâce à la collaboration des CHRU de Nancy, Toulouse, Nantes, Lyon, Strasbourg et du CHU Kremlin-Bicêtre

Nous allons dans un premier temps rappeler la grande hétérogénéité des pathologies appartenant au groupe des TC en nous basant sur la dernière classification internationale publiée par Noris *et al.* basée sur la taille plaquettaire. Nous y détaillerons l'ensemble des caractéristiques clinico-biologiques et diagnostiques de l'ensemble de ces entités, allant de l'observation du frottis sanguin aux mutations génétiques responsables.

Puis nous exposerons la démarche diagnostique actuellement utilisée et décrite dans le cadre de la prise en charge des patients suspects de TC. C'est dans cet objectif que le travail de cette étude s'inscrit puisque que nous avons souhaité, par le biais de certains paramètres de l'hématimètre, participer à cette démarche afin de lui apporter standardisation, accessibilité et rapidité.

Après avoir présenté, décrit et analysé l'automate et ses paramètres plaquettaires, nous décrirons la validation de leur utilisation comme l'exige la norme NF EN ISO 15189, en termes de fidélités, d'incertitudes, de stabilité et de valeurs témoins.

Nous tenterons ensuite de reproduire la classification de Noris *et al.*, initialement réalisée par l'étude plaquettaire microscopique, à l'aide de différents paramètres automatisés du canal PLT-F du XN SYSMEX®.

Enfin nous élaborerons différents algorithmes diagnostiques, résumant les différentes avancées que nous avons obtenues au cours de ce travail.

1 CLASSIFICATION DES THROMBOPENIES CONSTITUTIONNELLES

L'avancée des connaissances, tant sur le plan physiopathologique que moléculaire, a permis ces dernières années, d'identifier de nouvelles pathologies mais également d'en améliorer leur caractérisation.

Néanmoins, les thrombopénies constitutionnelles (TC) représentent un groupe de pathologies rares et hétérogènes dont la prévalence est difficilement évaluable. Récemment, une étude internationale a montré qu'environ 14 000 patients par an bénéficient d'une exploration à la recherche d'une TC, alors que pour 60% d'entre eux celle-ci s'avère négative. De plus, parmi les patients restant, à peine 9% sont diagnostiqués avec confirmation moléculaire de leur mutation [1].

D'autres articles illustrent cette difficulté à poser le diagnostic. En effet, dans de nombreux cas c'est à tort que dans un premier temps un purpura thrombopénique immunologique (PTI) est envisagé [2][3][4]. De plus, pour certaines pathologies, une surveillance régulière est nécessaire afin de détecter d'éventuelles complications hématologiques. Un retard diagnostique peut ainsi avoir d'importantes conséquences pour la bonne prise en charge des patients. Ils peuvent, de plus, être impactés par des actes iatrogènes en relation avec ce diagnostic de PTI. Ces derniers allant de la prise de thérapeutiques inappropriées (corticoïdes, immunoglobulines) à la splénectomie [2].

La seconde difficulté à la mise en évidence de ces pathologies est leur grande hétérogénéité, tant sur le plan de la présentation clinique que moléculaire. Plusieurs classifications sont rapportées dans la littérature : par type de transmission génétique, par type de présentation clinique (forme syndromique ou isolée), par susceptibilité aux saignements, par la taille plaquettaire...[5].

Il est également possible de les classer par mécanisme physiopathologique, à savoir par la localisation du point d'impact des mutations retrouvées.

Ceci montre les difficultés à diagnostiquer ces pathologies et ainsi à les dénombrer.

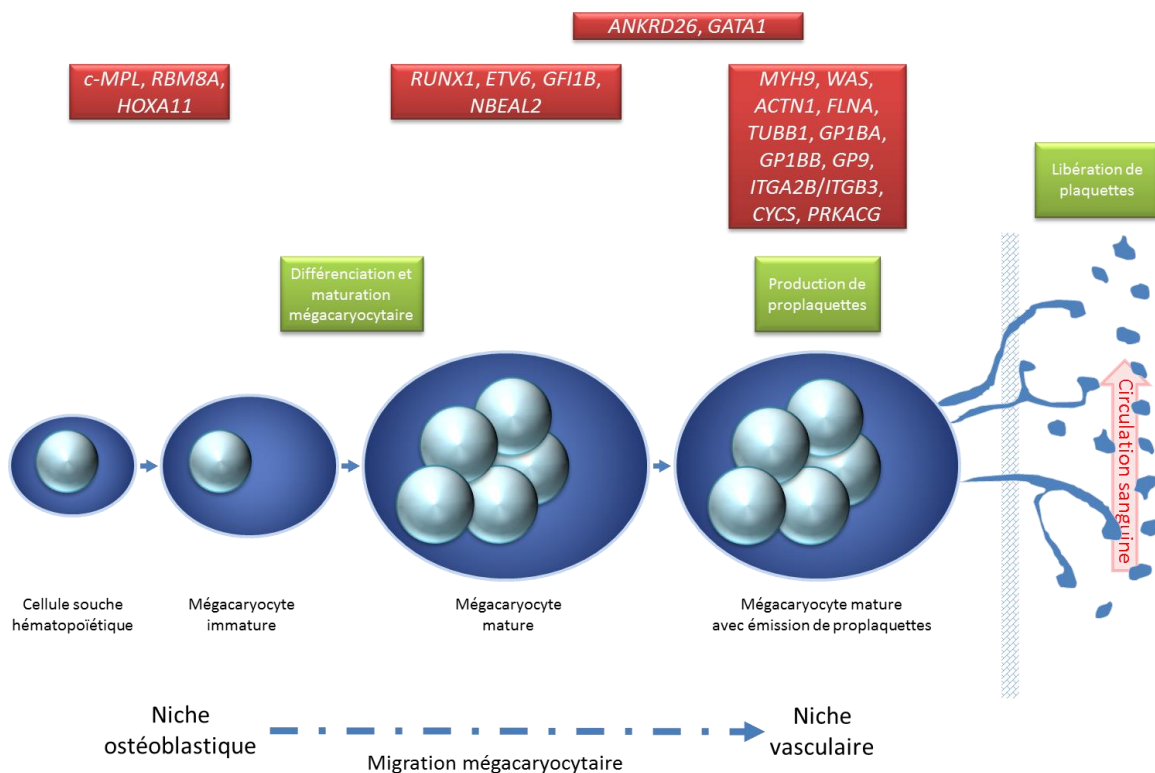


Figure 1 : Schéma récapitulatif de la localisation de l'impact de chaque mutation

Nous avons choisi une présentation en rapport avec l'objectif de notre travail, à savoir un classement en fonction de la taille plaquettaire [5][6][7][8][9][10]. Devant cette multitude de possibilités, nous nous sommes basé initialement sur le travail de l'équipe de Noris *et al* [6] que nous essayerons, par le biais de notre étude, de reproduire à l'aide de critères morphométriques automatisés et manuels.

Cette classification est synthétisée dans le tableau ci-dessous et détaillée dans les paragraphes suivants.

Tableau I : Classification des thrombopénies constitutionnelles en fonction de la taille plaquettaire.

Pathologie	Type	Transmission	Gène (locus)	Principaux aspects cliniques et biologiques
Plaquettes de petite taille				
Syndrome de Wiskott-Aldrich (WAS)	S	XL	<i>WAS</i> (Xp11)	Saignements sévères Déficit immunitaire important Eczéma Manifestations auto-immunes
Thrombopénie liée à l'X (XLT)	NS	XL	<i>WAS</i> (Xp11)	Saignements peu importants Possible déficit immunitaire mineur
Thrombopénie avec absence de radius (TAR)	S	AR	<i>RBM8A</i> (1q21.1)	Saignements sévères Aplasia radiale bilatérale Association possible à d'autres malformations des membres inférieurs et supérieurs Mégacaryocytes en nombre réduit
Amégacaryocytose congénitale (CAMT)	NS	AR	<i>c-MPL</i> (1q34)	Saignements sévères Mégacaryocytes en nombre réduit Evolution vers aplasia médullaire
Thrombopénie avec mutation du cytochrome c (CYCS-RT)	NS	AD	<i>CYCS</i> (7p15.3)	Absence de saignements
Plaquettes de taille normale ou modérément augmentée				
Thrombopénie familiale avec prédisposition aux leucémies aiguës myéloïdes (FPD/AML)	NS	AD	<i>RUNX1</i> (21q22) (=AML1 =CBFA2)	Saignements peu importants Risque de développement d'une hémopathie maligne dans 40% des cas
Thrombopénie de Paris-Trousseau (TCPT) / Syndrome de Jacobsen (JBS)	S	AD	Délétion en 11q23	Saignements modérés à importants Syndrome malformatif (retard mental, malformations cardiovasculaires, faciales...)

Thrombopénie liée à l'X avec thalassémie (XLTT)	NS / S	XL	<i>GATA1</i> (Xp11)	Saignements modérés à importants Anémie hémolytique, splénomégalie
Thrombopénie liée à l'X avec dysérythropoïèse	NS	XL	<i>GATA1</i> (Xp11)	Saignements modérés à importants Anémie sévère avec anisopoïkilocytose
Thrombopénie <i>ANKRD26</i> (ANKRD26-RT ou THC2)	NS	AD	<i>ANKRD26</i> (10p11-12)	Saignements peu importants Risque de développement d'hémopathies myéloïdes
Amégacaryocytose avec synostose radio-cubitale (CTRUS)	S	AD	<i>HOXA11</i> (7p15-14)	Saignements sévères Synostose radio-cubitale bilatérale associées à d'autres malformations Mégacaryocytes en nombres diminués ou absents, évolution possible vers aplasie
Pseudo-Willebrand plaquettaire	NS	AD	<i>GP1BA</i> (17p13)	Saignements peu importants Augmentation de l'agrégation à la ristocétine
Thrombopénie liée à <i>ETV6</i>	NS	AD	<i>ETV6</i> (12p12-13)	Saignements modérés
Plaquettes de taille augmentée				
Macrothrombopénie liée à <i>TUBB1</i> (TUBB1-RT)	NS	AD	<i>TUBB1</i> (20q13)	Saignements peu importants
Syndrome des plaquettes grises (GPS)	NS	AR	<i>NBEAL2</i> (3p21.1)	Saignements modérés à importants Evolution vers la myélofibrose et splénomégalie Concentration augmentée en vitamine B12
Thrombopénie liée à <i>FLNA</i> (FLNA-RT)	S	XL	<i>FLNA</i> (Xq28)	Saignements modérés Développement possible d'une hétérotopie nodulaire périventriculaire
Thrombopénie liée à <i>GFI1B</i> (GFI1b-RT)	NS	AD	<i>GFI1B</i> (9q34)	Saignements modérés à importants
Syndrome de Bernard Soulier variant monoallélique (BSSm)	NS	AD	<i>GP1BA</i> (17p13) <i>GP1BB</i> (22q11)	Saignements peu importants
Thrombopénie liée à <i>ACTN1</i> (ACTN1-RT)	NS	AD	<i>ACTN1</i> (14q24)	Saignements peu importants

Thrombopénie liée à <i>ITGA2B</i> / <i>ITGB3</i> (<i>ITGA2/B3-RT</i>)	NS	AD	<i>ITGA2</i> (17q21) <i>ITGB3</i> (17q21)	Saignements modérés
Plaquettes géantes				
Syndrome MYH9 (<i>MYH9-RD</i>)	NS / S	AD	<i>MYH9</i> (22q12-13)	Saignements peu importants Possible cataracte, néphropathie et altérations auditives Présence d'inclusions intra-leucocytaires
Syndrome de Bernard Soulier variant biallélique (<i>bBSS</i>)	NS	AR	<i>GP1BA</i> (17p13) <i>GP1BB</i> (22q11) <i>GP9</i> (3q21)	Saignements sévères
Macrothrombopénie liée à <i>PRKACG</i>	NS	AR	<i>PRKACG</i> (9q13)	Saignements modérés à importants

S : forme syndromique. NS : forme non syndromique.

XL : transmission liée à l'X. AD : transmission autosomale dominante. AR : transmission autosomale récessive.

1.1 Plaquettes de petite taille

1.1.1 Syndrome de Wiskott-Aldrich

Présentation clinico-biologique

Ce syndrome a été décrit dès 1937 par Alfred Wiskott et en 1954 par Robert Aldrich qui donnèrent leur nom à cette pathologie.

Les principaux aspects caractéristiques de ce syndrome sont la présence d'une microthrombocytopenie, d'un déficit immunitaire se traduisant par une importante susceptibilité aux infections, un eczéma, des phénomènes auto-immuns ainsi qu'un risque majoré de développement d'hémopathies malignes à type lymphoprolifératives principalement [8][11]. La diathèse hémorragique est également sévère et fait craindre des hémorragies cérébrales, gastro-intestinales,...

Sur le frottis sanguin il est classiquement décrit de rares plaquettes ponctiformes.

Présentation génétique

Il est causé par une mutation du gène *WAS*, situé en Xp11 [8] traduisant ainsi une transmission liée à l'X, codant pour la protéine WASp (*Wiskott-Aldrich Syndrome protein*).

Physiopathologie

Cette protéine est uniquement retrouvée dans les cellules hématopoïétiques. De plus, un grand nombre de mutations a été décrit, permettant d'établir un classement phénotype/génotype. En effet, on distingue deux groupes, celles dont résulte une absence totale d'expression de WASp (ou une protéine non fonctionnelle) entraînant le syndrome de Wiskott-Aldrich et celles qui permettent une expression réduite du gène traduisant une forme atténuée de WAS nommée

Thrombocytopénie Liée à l’X (XLT) [12]. Cette dernière sera traitée dans le paragraphe suivant.

Afin de permettre la compréhension de ces différentes présentations, nous rappelons quelques éléments physiopathologiques.

La protéine WASp est une protéine intracellulaire qui joue un rôle majeur dans le relais et la transmission de signaux transmembranaires, c’est-à-dire de la surface cellulaire jusqu’au cytosquelette [8]. Elle appartient aux *Nucleation promoting factors* (NPFs), famille de différentes protéines qui permettent ces transferts transmembranaires de signaux et qui ont une activité activatrice de la polymérisation des monomères d’actine (actine G). Ceci par le biais du recrutement du complexe Arp2/3 (*Actin related protein 2/3*) qui synthétise ainsi de nouveaux filaments d’actine (actine F). La participation de WASp à ce mécanisme est primordiale pour assurer les changements de conformation du cytosquelette de la cellule et ainsi lui permette de jouer ses différentes activités [11].

Cette protéine WASp est constituée de différents domaines, représentés sur le schéma ci-dessous.

- Un domaine EVH1/WH1 qui est le site de fixation de la protéine *WASp-interacting protein* (WIP). Cette dernière est indispensable à la stabilité de WASp mais également à sa bonne localisation cellulaire. En effet, WIP permet un rétrocontrôle négatif sur l’activité de WASp et ainsi sa stabilité dans l’état inactif. De plus, elle assure la localisation de WASp également au sein des podosomes des cellules dendritiques et des phagosomes des macrophages, régions riches en filaments d’actine nécessitant une grande capacité de déformabilité.
- Dans la majorité des autres cellules hématopoïétiques, WASp existe sous forme inactive, grâce à l’interaction de différents domaines : BR, GBD et VCA, stabilisée par WIP.
- Le domaine PPP a été décrit dans diverses publications comme une voie alternative à l’activation de WASp par la liaison de différentes protéines kinases (représentées en rond vert).

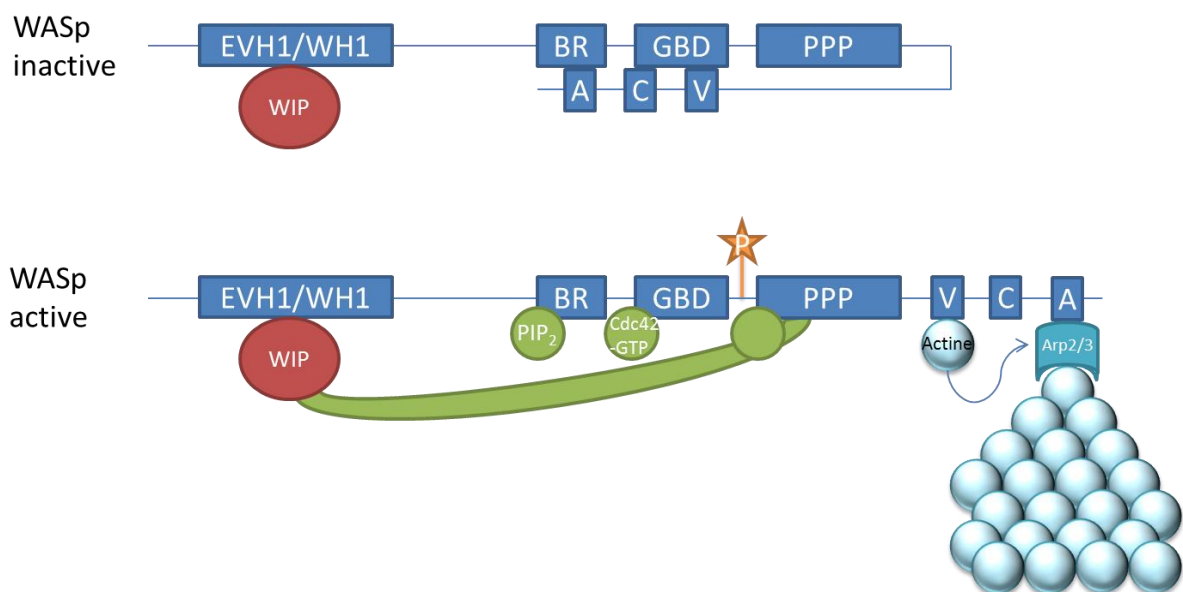


Figure 2 : Schéma de la physiopathologie de l’activation de WASp.

L’activation de WASp est permise par la liaison d’un phosphatidylinositol-biphosphate (PIP_2) au domaine BR et de la forme active phosphorylée de Cdc42 (*Cell Division Control protein*)

42, une protéine du système de régulation du cycle cellulaire) au domaine GBD. Cette activation est garantie par la phosphorylation d'un résidu tyrosine au niveau du domaine GBD. S'en suit le déroulement de la protéine et ainsi l'exposition du domaine VCA. C'est au niveau du sous-domaine V qu'un monomère d'actine (G-actine) se fixe avant d'être transféré au sous-domaine A où est présent le complexe Arp2/3. Il y a ainsi formation d'un nouveau long filament d'actine (F-actine) [11].

De plus, le domaine PPP est décrit comme site de fixation de molécules à activité non tyrosine kinase, permettant ainsi une voie alternative d'activation de WASp, indépendante d'une activité de phosphorylation contrairement à celle précédemment décrite [11].

Ces différents éléments de présentation physiopathologique permettent de mieux appréhender la symptomatologie et les conséquences biologiques des mutations impliquées dans ce syndrome.

Certaines mutations se localisent au niveau des régions codant pour le domaine EVH1/WH1 et induisent ainsi une perte d'affinité entre WASp et WIP. Cela conduit à la dissociation et à la dégradation de WASp par défaut de stabilisation.

Une mutation au niveau de la région codant pour le domaine VCA va entraîner une perte complète de l'activation d'Arp2/3 et ainsi une altération du phénomène de polymérisation des monomères d'actine.

L'ensemble de ces mutations affecte ainsi la formation et les modifications du cytosquelette ce qui conduit à des pertes de fonctions cellulaires.

Il a été montré que WASp s'exprime uniquement dans les cellules hématopoïétiques, mais au niveau de l'ensemble des lignées. Il est ainsi évident de voir des anomalies plaquettaires, lymphoïdes et myéloïdes.

Concernant la lignée lymphoïde et plus particulièrement les cellules T, les anomalies du cytosquelette se traduisent par une impossibilité, lors de leur maturation thymique, à réarranger leur récepteur T (TCR). Ceci conduit à une non sélection, par dégradation, des cellules T reconnaissant le soi et c'est ce qui explique en partie les manifestations auto-immunes au cours du syndrome WAS.

Ce défaut de réarrangement est également à l'origine d'une immunosuppression entraînant la récurrence et la susceptibilité aux infections. En effet les lymphocytes T ne sont plus capables de modifier leur TCR devant la présentation d'antigènes par les CPA (Cellules Présentatrices d'Antigènes). Ce phénomène de présentation s'apparente à une synapse, constituée par une structure riche en filaments d'actine qui est donc défaillante. L'impossibilité également des lymphocytes T à produire de l'interféron $IFN\gamma$ et du $TNF\alpha$ participe à l'immunosuppression. Cette anomalie est expliquée par un défaut de transduction de signaux vers le noyau.

L'immunité cellulaire est donc défaillante ce qui entraîne de graves infections, souvent mortelles à défaut d'un traitement curatif à type de greffe de cellules souches hématopoïétiques ou de thérapie génique.

Dans la lignée lymphoïde, les cellules B sont également impactées. En effet les anomalies du cytosquelette vont conduire à un défaut de mobilité des lymphocytes B ainsi qu'une moindre fixation aux anticorps. Il a également été montré que les patients atteints de WAS présentent une hyper-prolifération des cellules B, ce qui conduit, dans le cas de cassures de tolérance, à des manifestations auto-immunes.

Concernant la lignée plaquettaire, la microthrombocytopenie caractéristique de ce syndrome peut s'expliquer par une augmentation de la destruction mais également par une diminution de la production. La diminution de la production n'est pas liée à un défaut de mégacaryocytes, au contraire les frottis médullaires de patients montrent un nombre normal, voir augmenté de mégacaryocytes. C'est ici une anomalie du cytosquelette qui peut être la cause de cette

diminution de production. En effet nous verrons dans la thrombopénie avec mutation du cytochrome c, qu'il est nécessaire d'avoir une synchronisation entre la migration des mégacaryocytes vers les sinusoides et la formation des proplaquettes [13]. Du fait des anomalies de cytosquelette, et donc de déplacement, il a été observé au niveau de la moelle osseuse, la présence de plaquettes libres liée à la libération précoce des plaquettes.

L'augmentation de la destruction périphérique est prouvée par le fait que la splénectomie induit une légère correction de la numération plaquettaire [11][13]. Ceci s'explique par le fait que les plaquettes peuvent présenter une structure anormale et ainsi une clairance sanguine augmentée par phagocytose splénique.

La lignée des monocytes macrophages est également touchée. La mutation s'exprime alors par une diminution des pseudopodes, de la formation des podosomes ainsi que par une altération de la migration par gradient chimiotactique. Le cytosquelette ne peut alors se réarranger et aucune migration vers les cellules et tissus infectés n'est possible. Ceci contribue également à la favorisation des infections.

Prise en charge thérapeutique

Le traitement de ce syndrome repose sur des mesures conventionnelles pour la prise en charge de formes peu sévères, à savoir la splénectomie associée à des traitements antibiotiques préventifs et à la vaccination ciblant les germes encapsulés.

Néanmoins il semble indispensable d'envisager un traitement curatif, à type de greffe de cellules souches hématopoïétiques. C'est le traitement de référence au long terme pour les patients atteints de WAS, afin d'assurer une reconstitution immunitaire complète [8][11]. En effet après conditionnement myéloablatif et immunosuppresseur, une greffe des cellules souches saines, exemptes de mutations WAS, permettra au patient de développer un ensemble de cellules hématopoïétiques saines et actives.

La thérapie génique est une alternative à la greffe. Elle représente un traitement curatif de cette pathologie. Il s'agit dans ce cas de récupérer des cellules souches hématopoïétiques autologues du patient et de les transfecter par un virus exprimant le gène WAS. Celui-ci va s'intégrer au génome du patient et une fois réinjectées, ces cellules souches vont permettre la reconstitution immunitaire complète. Néanmoins cette solution, encore expérimentale, s'adresse principalement aux patients ne disposant pas de donneurs compatibles et/ou ayant une absence initiale totale de protéine WASp[14].

1.1.2 Thrombopénie liée à l'X (XLT)

Présentation clinico-biologique

La thrombopénie liée à l'X (XLT) a été reconnue en 1967 par Canales et Mauer comme une forme variante du syndrome WAS. Elle est considérée comme la forme non syndromique du WAS mais se caractérise tout de même par une microthrombocytopénie rarement associée à un eczéma et/ou à une immunodépression [11].

Présentation génétique

Cette pathologie est également causée par une mutation du gène *WAS* en Xp11.

On explique ce syndrome par la présence de mutations de type faux sens dans le gène *WAS*, qui ont pour conséquences une expression réduite de la protéine WASp sans qu'elle soit tronquée [8]. Il existe même un troisième type de pathologie dérivée de ce gène, la neutropénie liée à l'X (XLN) caractérisée par une diminution du nombre des polynucléaires neutrophiles [15].

Physiopathologie

Le XLT représente une forme atténuée de WAS et qui, bien que présentant une microthrombocytopenie, n'entraîne que peu de symptomatologie tant sur le plan hémorragique qu'immunitaire.

Certains auteurs décrivent un score permettant de classer, en dehors des données génétiques, les patients soit en WAS soit en XLT [11] :

- Un point pour les patients présentant une microthrombocytopenie sans autre atteinte immunologique
- Deux points pour les patients présentant, en sus de l'atteinte plaquettaire, un eczéma même mineur et/ou associé à des infections
- Trois points dans le cas où le patient présente une microthrombocytopenie associée à un eczéma persistant et multiples et récurrentes infections
- Quatre points pour les formes sévères où l'eczéma apparaît très difficile à traiter et que les infections présentent des critères de gravité

Les patients ayant 1 ou 2 points sont dits atteints de XLT et leur taux de survie est comparable à celui de la population générale, alors que ceux ayant 3 ou 4 points sont dits atteints de WAS. Dans le cadre de la prise en charge des patients XLT, il apparaît nécessaire de réévaluer ce score au cours de la vie, afin de détecter une éventuelle évolution.

Prise en charge thérapeutique

La prise en charge de ces patients reste délicate de par la variabilité des présentations cliniques. En effet, il a été montré que ces patients présentent fréquemment un certain nombre d'autres mutations somatiques [8] qui peuvent altérer et aggraver la symptomatologie. Le traitement de référence du WAS qu'est la greffe de cellule souches hématopoïétique, n'est que très rarement envisagé dans le cadre des XLT. En effet la balance bénéfices/risques de cette intervention est très souvent défavorable, et ce d'autant plus dans le cas d'une présentation par thrombocytopenie et eczéma.

C'est le traitement conventionnel, que nous avons décrit dans le syndrome WAS, qui est dans la majorité des cas utilisé. A savoir une splénectomie associée à des traitements antibiotiques prophylactiques ainsi qu'à une vaccination efficace.

1.1.3 Thrombopénie avec absence de radius (TAR)

Présentation clinique

Le syndrome TAR appartient au groupe des formes syndromiques de TC. Il a été décrit pour la première fois par Shaw et Oliver en 1959, mais c'est en 1969 que Hall J. présente des critères diagnostiques à la suite de son étude portant sur 40 patients.

Il se caractérise par l'association d'une thrombopénie et d'une aplasie radiale bilatérale avec conservation des pouces. Son incidence est estimée à 1 naissance sur 240 000 [16].

La présence des pouces permet de le différencier d'autres syndromes avec malformations squelettiques, comme par exemple l'anémie de Fanconi, le syndrome de Roberts ou encore le syndrome de Holt-Oram [8][17]. D'autres malformations du squelette sont observées chez 50% des patients, incluant des atteintes multiples des membres supérieurs et inférieurs, allant jusqu'à la phocomélie. D'autres anomalies organiques sont également décrites, comme des malformations gastro-intestinales, cardiaques, rénales et faciales [17].

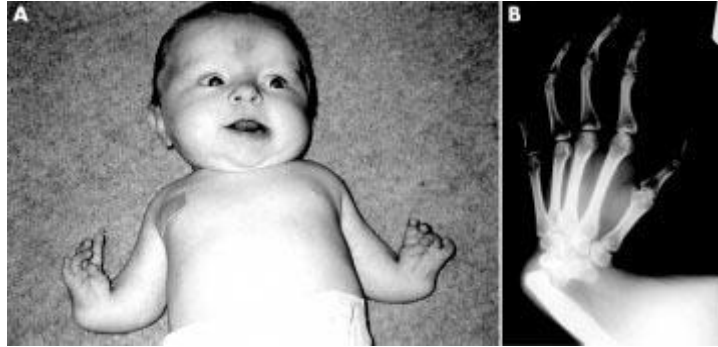


Figure 3 : Un nouveau-né atteint de Thrombopénie avec Absence de Radius.

On peut noter la présence du pouce sur le cliché radiographique avec des os d'apparence normale.

Source : Greenhalgh, et al. *J. Med. Genet.*, 2002 [17].

Présentation biologique

Concernant l'aspect hématologique, ce syndrome est caractérisé par une thrombopénie importante dès la naissance, de l'ordre de 7 à 50 G/L et fluctuant ensuite au cours de la vie pouvant, dans certains cas, se normaliser à l'âge adulte [17]. Néanmoins, cette thrombopénie est présente dans 100% des cas de TAR. Les plaquettes sont décrites de taille diminuée sans anomalies morphologiques notables.

Durant les premières années de vie, le risque d'hémorragies intracrâniennes est le plus important et est responsable d'une importante mortalité. Par la suite, la diathèse hémorragique s'améliore en parallèle de la numération plaquettaire [8][12]. Certains auteurs ont également montré que ce syndrome TAR augmente le risque de développement d'une hémopathie, myéloïde ou lymphoïde [8][18].

L'examen du frottis médullaire montre une hypoplasie, voire une aplasie de la lignée mégacaryoblastique, alors que les lignées érythroblastiques et myéloïdes sont bien représentées. Les mégacaryocytes sont immatures avec un noyau souvent monolobés et leur cytoplasme vacuolé [18]. Ceci oriente probablement vers une anomalie de différenciation des précurseurs plaquettaires [16][17].

A l'heure actuelle, les mutations découvertes responsables de ce syndrome, ne permettent pas d'expliquer ce phénomène. D'autres études devront être entreprises afin d'expliquer cette observation.

Présentation génétique

La transmission de ce syndrome est décrite comme étant autosomale récessive même si de nombreux cas sont dits sporadiques. Les mutations en cause n'ont été que très récemment décrites et c'est l'association de deux éléments qui induit l'apparition de ce syndrome [19][20]. En effet, dès 2007 une micro-délétion en position 1q21.1 est identifiée. Elle est extrêmement rare dans la population générale mais présente chez tous les patients étudiés. Néanmoins, cette seule mutation ne permet pas d'expliquer l'ensemble de la symptomatologie observée. C'est en 2012 qu'un second allèle a été découvert et révélant deux polymorphismes possibles au niveau du gène *RBM8A* : [16]

1. En position 5'UTR G>A du gène *RBM8A*, trouvée chez 41 patients sur 53 étudiés
2. Au niveau de l'intron 1 du gène *RBM8A*, trouvée chez 12 patients sur 53 étudiés

La délétion 1q21.1 n'est retrouvée que chez 51 de ces patients.

Selon cette étude [20], le syndrome malformatif est dû à l'association d'un de ces deux polymorphismes sur le premier allèle et à la délétion en 1q21.1 du second. Les deux derniers

patients du groupe étudié présentent le polymorphisme à l'extrémité 5'UTR associé à une seconde mutation sur le gène *RBM8A*.

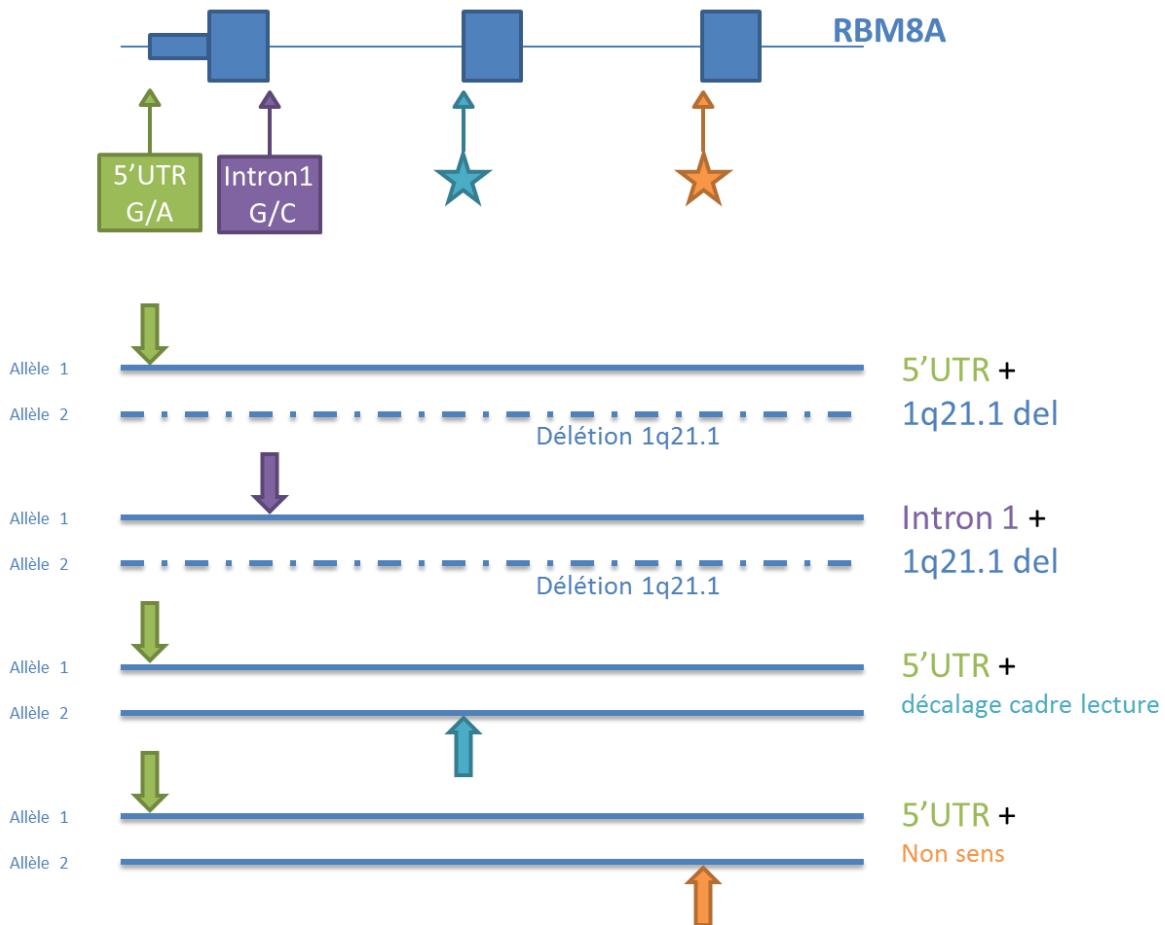


Figure 4 : Schéma des mutations responsables du syndrome TAR

Physiopathologie

Ce gène *RBM8A* code pour une protéine Y14, celle-ci se trouvant diminuée au niveau des plaquettes des patients atteints de TAR. Cette protéine possède un domaine de liaison à l'ARN et représente un composant majeur d'un complexe protéique nommé EJC (*Exon-Junction Complex*). Ce dernier possède des fonctions cellulaires au niveau des plaquettes.

Il est supposé que la présence de ces mutations induit une expression de Y14 diminuée sous un seuil critique, ce qui conduirait à des anomalies dans ce complexe EJC mais sans comprendre actuellement le lien avec la symptomatologie squelettique et hématologique [16].

Une très récente publication de 2015 [21] rapporte que des facteurs environnementaux pourraient jouer un rôle non négligeable dans la pénétrance et l'altération de l'expression de certains gènes, ceci participant au phénotype TAR. De plus, une nouvelle hypothèse a été émise et concerne la possibilité que d'autres gènes que *RBM8A*, mais localisés également dans la région 1q21.1, soient en cause :

1. Le gène *PIAS3* pourrait participer au versant hématologique du phénotype observé et plus particulièrement impliqué dans la thrombopénie.
2. Le gène *Lix1L* pourrait quant à lui être impliqué dans les malformations des membres.

Néanmoins, ces hypothèses doivent encore être étudiées en profondeur afin de clarifier les rôles possibles de ces gènes [21].

1.1.4 Amégacaryocytose congénitale (CAMT)

Présentation clinique

Le syndrome CAMT appartient au sous-groupe des TC non syndromiques. La première description date de 1974 par O’Gorman Hughes. Tout comme de nombreuses TC, son diagnostic est probablement sous-estimé de par la non spécificité de sa présentation clinique et ne permet pas d’en évaluer l’incidence.

Présentation biologique

Cette pathologie se caractérise par une thrombopénie sévère dès la naissance évoluant rapidement, dans les premières années, vers une aplasie médullaire complète aboutissant à une pancytopenie [8][12]. En dehors de la symptomatologie hématologique, qui peut expliquer un diagnostic différentiel avec le syndrome TAR ou l’anémie de Fanconi, il y a ni malformations physiques ni anomalies squelettiques à l’inverse de ces derniers [22]. Néanmoins, il a été démontré que l’altération du gène *c-MPL* et ainsi les modifications de l’impact du TPO peuvent affecter le développement cérébral tant au niveau moteur que mental [23][24]. Même si l’ensemble des patients ne présente pas ce trait commun d’atteinte cérébrale, certaines publications en font preuve dans certains cas.

La majorité des auteurs s’accorde à distinguer deux sous-groupes à l’intérieur de ce syndrome[22][25] :

- Le sous-groupe CAMT-I qui présente une forme sévère avec une profonde thrombopénie (moins de 50 G/L) ainsi qu’un développement rapide vers la pancytopenie (vers l’âge de 22 mois).
- Le sous-groupe CAMT-II qui présente une numération plaquettaire fluctuante et en augmentation (au-delà de 50 G/L) durant la première année de vie et une évolution vers la pancytopenie plus lente que le groupe I (vers l’âge de 48 mois).

Du fait de cette thrombopénie importante à la naissance (moins de 50G/L pour les deux groupes), les premiers signes cliniques sont un purpura associé à des pétéchies dès les premières heures de vie. Par la suite, l’hémorragie cérébrale est une des complications qui peut être fatale ou entraîner des séquelles neurologiques[22].

L’analyse du frottis médullaire retrouve une absence totale de mégacaryocytes, ou un nombre très réduit de ceux-ci présentant une dysplasie (petite taille et hypolobé).

Présentation génétique

Sa transmission est décrite comme autosomale récessive. Ce syndrome est causé par la présence de différentes mutations du gène codant pour le récepteur de la thrombopoïétine (TPO) *c-MPL*. Ce dernier est situé en position 1q34 du chromosome 1 et l’ensemble des diverses mutations décrites sont situées dans les premiers exons de ce gène [25]. De plus a été démontré une corrélation phénotype/génotype [26] entre le type de mutation et le sous-type de CAMT.

En effet, les patients homozygotes pour une mutation non-sens ou une anomalie du cadre de lecture, ont une expression du gène *c-MPL* totalement nulle et appartiennent de ce fait au groupe CAMT-I

Les patients homozygotes pour une mutation faux sens ont une expression affaiblie mais encore présente de ce gène et appartiennent ainsi au groupe CAMT-II. Il en résulte une faible activité et ainsi une forme moins sévère que dans le premier groupe.

Physiopathologie

Les connaissances de la physiopathologie de ce syndrome ont beaucoup progressé au cours des années 2000 et ce afin de comprendre la relation entre la diminution de l'expression du récepteur à la TPO et l'apparition d'une pancytopenie après quelques mois de vie. En effet il a été clairement montré que la diminution de l'expression de ce récepteur sur les progéniteurs plaquettaires induit un défaut de différenciation et de maturation des mégacaryocytes expliquant la thrombopénie majeure. Afin d'expliquer la survenue de la pancytopenie, des études sur souris ont montré que la quantité de progéniteurs érythroïdes et myéloïdes est nettement diminuée chez les souris n'exprimant pas le *c-MPL* [23]. Néanmoins la normalité des lignées non mégacaryocytaires au tout début de la vie peut s'expliquer par un phénomène de compensation, via la multiplication plus intense des cellules souches. Ce phénomène n'étant que transitoire, la décroissance des progéniteurs va apparaître et se présenter sous la forme d'une pancytopenie.

D'autres auteurs [12][26] suggèrent que l'hématopoïèse étant régulée par un grand nombre de facteurs, la conséquence d'un défaut d'activité du TPO induit l'hyper expression de certaines cytokines à action myélosuppressives, comme le TNF- α et l'IFN- γ . Ceci est d'autant plus intéressant que dans l'anémie de Fanconi, conduisant également à une pancytopenie d'origine non immunologique, des taux anormalement élevés de ces cytokines ont été observés au niveau intracellulaire. Certaines études ont prouvé que ceux-ci étaient similaires entre les patients atteints de CAMT et ceux d'anémie de Fanconi.

L'unique traitement curatif de ce syndrome est la greffe de cellules souches hématopoïétiques, qui permet de restaurer une activité *c-MPL* normale. On peut également souligner que la description du type de sous-groupe auquel appartient le patient, permettrait au clinicien de déterminer le moment opportun pour envisager cette thérapeutique.

1.1.5 Thrombopénie avec mutation du cytochrome c (CYCS-RT)

Présentation clinique

La thrombopénie avec mutation du cytochrome c fait partie des formes non syndromiques des TC mais également est l'une des plus rares d'entre elles. En effet, à ce jour uniquement deux familles dans le monde ont été diagnostiquées comme atteintes de cette pathologie. Sur le plan clinique, aucune manifestation n'a été jusqu'à présent décrite en dehors de l'atteinte hématologique. Les patients présentent une espérance de vie et une fertilité comparable à la population saine [27].

Présentation biologique

Sur le plan hématologique, la thrombopénie observée est modérée, de l'ordre de 100 G/L et constituée de plaquettes de taille normale et sans anomalie morphologique [28].

L'étude de la moelle osseuse permet de mettre en évidence une libération intra-médullaire anormalement importante de plaquettes. Il a également été montré que le taux de plaquettes jeunes en circulation ainsi que la durée de vie moyenne des plaquettes sont tout à fait normaux [27].

Présentation génétique

La mutation en cause dans cette pathologie affecte le gène *CYCS* du cytochrome c en position 7p15.

Physiopathologie

Dans un premier temps il est nécessaire de faire quelques brefs rappels sur la physiologie de l'apoptose et de la mégacaryopoïèse.

La mégacaryopoïèse est un mécanisme qui a lieu au niveau de la moelle osseuse mais comportant une phase de maturation sanguine. A partir de la cellule souche hématopoïétique la différenciation en CFU-GEMM donnera ensuite naissance aux progéniteurs mégacaryocytaires. Il s'en suit différentes étapes de maturations et de multiplications afin d'aboutir aux mégacaryocytes matures. Ces derniers vont libérer dans les sinusoides médullaires des proplaquettes qui vont ensuite former les plaquettes matures dans la circulation générale. Elles ont une durée de vie de l'ordre de 10 jours avant de subir un phénomène d'apoptose [29][28].

L'apoptose est un mécanisme physiologique de mort cellulaire programmé, qui permet le renouvellement cellulaire et le développement de l'individu. Plusieurs mécanismes sont possibles et permettent ce processus, mais celui qui nous intéresse ici est celui qui fait intervenir le cytochrome c [30]. Ce dernier est contenu à l'intérieur des mitochondries et sera libéré lors de l'activation de la voie d'apoptose. Une fois celle-ci activée le cytochrome c va interagir avec APAF-1, ce qui va conduire à la formation de corps apoptotiques et à l'activation des caspases. Des enzymes induisent le clivage de certaines protéines cellulaires clés, tant sur le plan fonctionnel que structurel, et engendrent ainsi la destruction de la cellule. Une dérégulation de ce système est à la source de diverses pathologies telles les cancers ou encore des pathologies neurodégénératives...

Sur le plan physiopathologique, cette thrombopénie est liée à une mutation du cytochrome c ce qui va provoquer une augmentation de l'activation de la voie des caspases et le phénomène d'apoptose [27]. Deux hypothèses ont pu être formulées pour expliquer la diminution du nombre de plaquettes, soit une réduction de leur durée de vie, soit une anomalie dans leur production.

Afin d'éliminer la première d'entre elles, Morisson *et al.* [27] ont montré qu'il n'y avait pas de différence significative du nombre de plaquettes immatures en circulation, entre des patients atteints par cette mutation et leur groupe contrôle. Ceci permettant d'éliminer une durée de vie réduite des plaquettes chez les patients.

C'est davantage la deuxième hypothèse qui apparaît la plus probable. En effet, ils ont mis en évidence des anomalies au niveau de la moelle osseuse de patients atteints. Ils ont pu également observer un excès de plaquettes libres dans la moelle ainsi que dans certains macrophages. Ceci prouve une dérégulation de la mégacaryopoïèse par libération trop précoce des plaquettes dans le processus de maturation des mégacaryocytes, qui se retrouvent au niveau de la moelle osseuse au lieu des sinusoides. Ces plaquettes ne peuvent donc pas se retrouver en circulation ce qui explique la thrombopénie périphérique [27][28][31].

On explique également que cette dérégulation de l'apoptose ne touche que la lignée plaquettaire, et non l'ensemble des autres organes, par la physiologie de la mégacaryopoïèse elle-même. En effet, elle est très sensible à cette modification en relation avec le fait qu'au cours du processus de maturation, certaines phases doivent se dérouler dans des endroits très précis et très réduits de la moelle osseuse. Ceci afin d'être assez proche des sinusoides pour y émettre des pseudopodes et y libérer par segmentation les proplaquettes. Ainsi on comprend aisément qu'une accélération du phénomène d'apoptose va précipiter ces processus de maturation et induire une segmentation trop précoce du cytoplasme mégacaryocytaire dans une localisation physiologiquement inadaptée. C'est donc l'extrême précision du mécanisme de production des plaquettes qui est à la source de sa grande sensibilité à la dérégulation du système apoptotique.

1.2 Plaquettes de taille normale ou modérément augmentée

1.2.1 *Thrombopénie familiale avec prédisposition aux leucémies aiguës myéloïdes (FPD/AML)*

Présentation clinique

Cette pathologie est une thrombopénie constitutionnelle de forme non syndromique. La présentation clinique est variable selon les individus et la diathèse hémorragique peut s'exprimer par des ecchymoses pendant l'enfance ou ne pas s'exprimer du tout

Présentation biologique

Elle a été décrite pour la première fois en 1985 par Dowton *et al* [32]. Elle est caractérisée par une dysmégacaryopoïèse qui s'exprime par un déficit quantitatif et qualitatif [33]. En effet, les patients présentent une thrombopénie modérée à plaquettes de taille normale ainsi qu'une thrombopathie associée de type *aspirin like* [8] (anomalie d'agrégation au collagène, à l'ADP et à l'adrénaline).

Sa seconde caractéristique essentielle est, comme son nom l'indique, la susceptibilité au développement d'une hémopathie. En effet, plus de 40% des patients vont développer une pathologie hématologique avec une médiane d'apparition située à 33 ans [32]. Ces dernières sont principalement de type leucémie aiguë myéloïde ou syndrome myélodysplasique mais dans de très rares cas les patients peuvent développer une leucémie aiguë lymphoblastique de type T.

De plus, la thrombopénie n'est pas une caractéristique constante de la pathologie mais est de découverte fortuite lorsqu'elle est présente.

Sur le plan du frottis médullaire, il a été décrit une augmentation du nombre de mégacaryocytes, mais néanmoins de petites tailles. Alors que le frottis sanguin montre des plaquettes avec un contingent de granules alpha diminué [34].

Présentation génétique

Cette pathologie est de transmission autosomale dominante. Le principal gène impliqué dans cette pathologie est *RUNX1* situé en 21q22, également nommé *CBFA2* ou encore *AML1* [32].

Physiopathologie

RUNX1 est un gène codant pour un des trois domaines de liaison à l'ADN de la sous unité alpha du CBF (*Core Binding Factor* : CBF- α) [33]. Cette sous unité s'hétéro-dimérise avec le CBF- β afin de former un complexe qui stabilise *RUNX1* en le protégeant de la dégradation protéolytique et en augmentant son affinité pour l'ADN. Ce gène comporte une région très conservée nommée RHD (*runt-homology domain*) située au niveau N terminal, qui assure la fixation de l'ADN et l'hétéro-dimérisation [32]. La majorité des mutations sont décrites dans cette zone au contraire de la région C terminale [33]. Cette dernière permet l'activation de la transcription ou sa répression selon le contexte cellulaire.

Il a également été démontré que la mutation d'un allèle de *RUNX1* n'est pas suffisante, en elle-même, pour expliquer les complications leucémiques de cette pathologie [32]. Une seconde mutation est nécessaire, touchant soit le second allèle de *RUNX1* soit un autre gène, afin de permettre le développement d'un phénomène d'oncogenèse [35].

Le complexe formé par le CBF permet de réguler l'expression de différents gènes fortement impliqués dans l'hématopoïèse et pour certains ayant un rôle dans le développement de leucémies.

Les patients atteints de FPD/AML montrent une dysmégacaryopoïèse de plusieurs types [33] :

1. Une diminution du nombre de mégacaryocytes,
2. Un défaut de maturation des mégacaryocytes,
3. Une diminution de la ploïdie,
4. Un défaut de formation des proplaquettes.

La physiopathologie de cette forme de TC s'explique en partie par les divers rôles de *RUNX1* même si son implication précise dans la régulation de la mégacaryopoïèse n'est pas encore complètement maîtrisée [33].

RUNX1 participe à la régulation positive de différents gènes impliqués dans l'hématopoïèse et codant pour diverses cytokines et récepteurs. Pour exemple, IL3, M-CSF ou encore GM-CSF, interviennent tous dans le contrôle de ce mécanisme.

RUNX1 est également essentiel pour les lignées myéloïdes, CD4/CD8 ainsi que pour la différenciation terminale des mégacaryocytes. Ceci traduit le fait qu'en cas de défaut de *RUNX1*, la ploïdie et la maturation des mégacaryocytes seront impactées et conduiront ainsi à une thrombopénie.

Un grand nombre d'autres gènes sont impactés et la dérégulation de certains d'entre eux, impliqués dans le cytosquelette et les microtubules cellulaires, conduisent à une formation plaquettaire altérée.

De plus, parmi les gènes cibles de *RUNX1* certains participent à la mégacaryopoïèse et aux fonctions plaquettaires. Le mieux décrit semble être celui codant pour le récepteur à la thrombopoïétine, le récepteur MPL mais bien d'autres sont également en cause (PF4¹⁵, p19^{INK4D}...).

Enfin, il a été montré *in vitro* que l'impact d'une mutation hétérozygote sur des cellules souches hématopoïétiques conduit à une diminution du nombre de précurseurs CFU-MK médullaires et à une taille anormalement diminuée des mégacaryocytes présents.

Néanmoins, afin d'expliquer le mécanisme de la thrombopénie il est important de s'intéresser aux systèmes cellulaires impliquant l'actine et la myosine [33]. Le complexe actomyosine est constitué de la myosine II non musculaire avec des filaments d'actine, et permet la stabilisation du cytosquelette ainsi que la contraction cellulaire. Il est donc impliqué dans les phénomènes de migration, de chimiotactisme ainsi que d'adhésion.

La myosine II est un hexamère formé de 4 chaînes légères (MLC) et de deux chaînes lourdes. Au niveau mégacaryocytaire seules les isoformes de chaînes lourdes MYH9 et MYH10 ont été décrites. Ces dernières, n'étant présentes qu'aux phases précoces de la maturation disparaissent au cours de la mégacaryopoïèse. On sait également que la myosine II est régulée par la phosphorylation de différentes chaînes légères de type régulation (RLC) parmi lesquels on trouve MYL9, MYL12A et MYL12B. Celles-ci s'expriment normalement à haut niveau dans les mégacaryocytes alors que chez les patients FPD/AML on retrouve une dérégulation uniquement de MYL9 et de deux chaînes lourdes MYH9 et MYH10.

MYH10 est directement régulée négativement par *RUNX1* au niveau des mégacaryocytes durant la phase de polyploïdisation et cette inhibition est primordiale afin d'assurer le switch entre mitose et endomitose. On constate chez les patients atteints que l'expression de MYH10 persiste dans les mégacaryocytes et induit ainsi un défaut de ploïdie.

MYHL9 et MYH9 sont également des cibles directes de *RUNX1* et en possèdent toutes les deux des sites de fixation dans leur région promotrice. Il est à noter que MYL9 assure l'activité motrice de MYH9 et l'ensemble joue ainsi un rôle important dans la formation plaquettaire au niveau des mégacaryocytes. On note que chez les patients atteints de FPD/AML ces deux chaînes MYL9 et MYH9 sont en défaut alors qu'elles devraient

s'exprimer dans le cadre d'une mégacaryopoïèse normale. Ceci est un élément qui explique l'anomalie de formation des proplaquettes.

Il faut néanmoins souligner que la différence avec le syndrome de macrothrombopénie MYH9 est l'absence concomitante des deux chaînes alors que dans ce dernier syndrome, uniquement la chaîne lourde est en défaut.

Certains auteurs démontrent également un défaut sur le gène *TUBB-1* qui participerait également à ce défaut de formation plaquettaire [33]. La physiopathologie liée à ce gène sera explicitée dans le paragraphe correspondant à cette pathologie qui est une entité bien distincte (§ 1.3.1).

1.2.2 Thrombopénie de Paris-Trousseau (TCPT) / Syndrome de Jacobsen (JBS)

Présentation clinico-biologique

Ce syndrome de Jacobsen a été décrit pour la première fois par Jacobsen *et al.* en 1973 et sa prévalence est évaluée à 1 naissance sur 100 000 [8].

Ce syndrome fait partie du groupe des formes syndromiques des thrombopénies constitutionnelles et s'exprime par diverses malformations à type de retard de croissance staturo-pondéral, retard mental, dysmorphie faciale, malformations cardiaques ainsi que des anomalies des extrémités [36]. D'autres anomalies ont également été décrites : des atteintes oculaires, digestives, rénales et génito-urinaires [12].

La thrombopénie de Paris-Trousseau correspond à la thrombopénie associée au syndrome de Jacobsen, décrit en 1993 par Favier *et al.* Celle-ci est modérée et s'associe dans 20% des cas à une pancytopénie [36]. Ces perturbations hématologiques peuvent se résoudre partiellement ou totalement au cours de la vie.

Sur le plan biologique cette thrombopénie normocytaire se caractérise par la présence de plaquettes avec une granulation alpha de grande taille. Leur présence peut être rare et nécessite une recherche cytologique attentive. Cette cytopénie n'est pas associée à une thrombopathie comme il serait possible de le penser du fait d'une anomalie des granulations alpha.

Le frottis médullaire révèle, quant à lui, des MK de taille réduite avec une ploïdie diminuée et présentant des défauts de formation des proplaquettes [34].

Présentation génétique

Le syndrome de Jacobsen est une pathologie congénitale de transmission autosomale dominante, bien que souvent d'apparition *de novo* (85%) [36].

Ces deux syndromes partagent la même origine génétique, la délétion du bras long du chromosome 11 en 11q23.

Cependant, ce phénotype pathologie a fait l'objet d'une récente publication rapportant un cas de transmission autosomale récessive. Celui-ci lié à une mutation homozygote au sein de l'exon 9 du gène *FLI-1*, affecte le site de liaison à l'ADN de ce facteur de transcription [37].

Physiopathologie

De cette délétion résulte une haplo-insuffisance du gène *FLI-1* codant pour la protéine fli-1. Cette dernière est un facteur de croissance intervenant au cours de la mégacaryopoïèse et traduit donc en son absence, une dysmégacaryopoïèse avec avortement intramédullaire des mégacaryocytes conduisant à la thrombopénie [38]. Au niveau médullaire on observe également des signes de dysmégacaryopoïèse comme une hyperplasie mégacaryocytaire marquée avec des mégacaryocytes de petites tailles. On constate de plus la présence de micromégacaryocytes sans anomalie sur les autres lignées [38].

La principale caractéristique hématologique de cette pathologie est visible sur un simple frottis sanguin et est représentée par la présence, dans un petit contingent plaquettaire, d'un granule alpha géant [39]. En réalité, il s'agit de la fusion de plusieurs granules alpha en un granule qui apparaît comme géant. Ceux-ci sont incapables de libérer leur contenu, après stimulation par la thrombine, mais du fait du petit nombre de plaquettes impactées (15% selon certains auteurs [40]) aucune thrombopathie n'est décrite.

Cette fusion des granules alpha se réalise très probablement au niveau plaquettaire car il n'est pas fait mention d'observations de ce phénomène au niveau des mégacaryocytes [38].

Ce syndrome est donc caractérisé par la présence anormale d'un granule alpha géant, d'un nombre augmenté de micromégacaryocytes médullaires et de la délétion 11q.

1.2.3 Thrombopénies liées à l'X avec mutations GATA-1

1.2.3.a Thrombopénie liée à l'X avec thalassémie (XLTT)

Présentation clinique

La thrombopénie liée à l'X avec thalassémie est une pathologie décrite pour la première fois en 1977 et appartient au groupe des TC non syndromiques. Néanmoins, il est possible d'observer une symptomatologie hémorragique modérée à sévère.

Présentation biologique et génétique

Cette pathologie résulte de la mutation de *GATA-1* située en Xp11 [41]. Ce dernier code pour un important facteur de transcription régulant l'hématopoïèse. En effet, associé à son cofacteur FOG-1 (*Friend of GATA*) ils régulent (positivement pour certains et négativement pour d'autres) l'expression de gènes de différentes lignées et en particulier des gènes de la mégacaryopoïèse et de l'érythroïèse [41]. La mutation en cause est une mutation faux sens au niveau de l'exon 4 du gène *GATA-1* et se traduit par la substitution en position 216 d'une glutamine en une arginine (R216Q) [42].

Sur le plan hématologique, on constate au niveau médullaire une hyperplasie mégacaryocytaire avec un défaut de maturation et une dystrophie caractérisée par une diminution de leur taille. Au niveau sanguin, on observe une anisopoïkilocytose plaquettaire, avec des plaquettes de tailles augmentées et de formes anormales. De plus, à l'intérieur de ces dernières on observe une diminution des granules alpha [42] pouvant faussement suggérer laissant penser, à un syndrome des plaquettes grises [43]. De plus, on y observe également une splénomégalie avec une dysérythroïèse de type anisopoïkilocytose [41].

Certains auteurs décrivent également la présence de plaquettes vacuolées liées à un défaut du système canaliculaire [44]. D'autres anomalies plaquettaires sont décrites, comme une désorganisation des réseaux de tubuline qui ne sont plus situés en périphérie de la cellule, et engendrent ainsi un défaut de déformabilité des plaquettes. Il est en effet connu, que les microtubules sont nécessaires afin de maintenir la forme discoïde et la formation des pseudopodes lors de l'activation plaquettaire [44]. Ceci peut laisser penser, à tort, à une thrombopathie associée à cette thrombopénie, alors qu'en réalité l'ensemble des glycoprotéines membranaires sont efficaces et totalement fonctionnelles. Néanmoins avec ce défaut de changement morphologique, les plaquettes ne sont plus capables d'effectuer l'hémostase primaire de façon optimale, ce qui traduit une certaine tendance aux saignements.

Physiopathologie

Afin de permettre la compréhension de la physiopathologie et des différences avec la thrombopénie liée à l’X avec dysérythroïèse [43], il est nécessaire d’exposer la structure de la protéine GATA-1.

En effet, cette protéine possède une extrémité N terminale hautement conservée possédant plusieurs sites aux fonctions différentes :

- un site permettant la fixation et l’interaction avec le cofacteur FOG-1,
- un site permettant la fixation de l’ADN.

La mutation en cause dans le XLTT touche le site de liaison à l’ADN tout en conservant la capacité d’interagir avec le cofacteur [42]. On verra dans le paragraphe suivant que dans le cas d’une mutation au niveau de la région du site de fixation à FOG-1, il s’agit de la thrombopénie liée à l’X avec dysérythroïèse [44].

Afin d’expliquer la thrombopénie il faut se rapprocher des mégacaryocytes qui, comme dans d’autres TC, présentent un défaut de formation des plaquettes lié à une anomalie du cytosquelette [44].

Concernant la pseudo β -thalassémie mineure, il a été montré qu’aucunes mutations des gènes codant pour les globines alpha ou bêta ne sont présentes. L’hypothèse avancée est liée à la mutation R216Q qui induit une diminution de la synthèse de la chaîne bêta. En effet, le locus codant celle-ci possède un site de fixation à GATA-1 [44]. On retrouve ainsi sur le frottis sanguin une anisopoïkilocytose érythrocytaire.

A noter qu’on observe également une hémolyse périphérique, conduisant à l’anémie en plus de la dysérythroïèse et de la diminution du nombre de cellules souches érythroïdes.

Ce syndrome est donc caractérisé par une thrombopénie, dans la plupart des cas modérée, associée à une anémie et à des signes de β -thalassémie mineure.

1.2.3.b Thrombopénie liée à l’X avec dysérythroïèse

Comme décrit précédemment dans le cadre du XLTT, la thrombopénie liée à l’X avec dysérythroïèse résulte également d’une mutation de *GATA-1* [45]. Celle-ci est située dans la région codant pour le site de fixation de FOG-1.

La présentation clinique et biologique est identique au syndrome précédent, excepté pour l’aspect thalassémique mais s’y surajoute une anémie sévère associée à des anomalies plaquettaires de type fonctionnelles ainsi qu’une plus profonde thrombopénie [44].

1.2.4 Thrombopénie avec mutation de l’*ANKRD26* (*ANKRD26-RT*) ou *THC2*

Présentation clinique

La thrombopénie liée à *ANKRD26* est une forme non syndromique de TC.

Présentation biologique

La thrombopénie est modérée, aux alentours de 50 G/L (mais pouvant chez certains patients atteindre les 10 G/L) [46], avec des plaquettes de taille normale et sans thrombopathie associée. On observe au niveau médullaire une dysmégacaryopoïèse caractérisée par des mégacaryocytes de petite taille et une hypobulation [8].

Un aspect important de cette pathologie est son association à un facteur de risque, 30 fois plus important que la population générale, à développer une hémopathie maligne, à type de leucémie aiguë myéloïde dans la plupart des cas [46].

Présentation génétique

Elle se caractérise par une transmission autosomale dominante d'une mutation localisée sur le locus *THC2* en 10p11-12 [8].

Plusieurs mutations de gènes ont été décrites sur le locus *THC*, successivement *MAST2* et *ACBD5* puis *ANKRD26*. Cette dernière étant la plus fréquente et retrouvée chez l'ensemble des individus est dite à l'origine de la pathologie, elle est située au niveau de l'extrémité 5'UTR du gène.

Physiopathologie

La physiopathologie exacte est encore mal connue et ce n'est qu'au début 2014 que Bluteau *et al.* ont publiés plusieurs hypothèses permettant d'expliquer les divers aspects de cette pathologie [47].

Néanmoins, certains auteurs ont déjà étudiés des causes possibles de cette susceptibilité à développer des hémopathies. Ils ont ainsi montré la présence de particules intra-plaquettaires et intra-mégacaryocytaires, identifiées comme du protéasome et des protéines ubiquitaires. De plus, ils ont constaté que ces substances n'étaient retrouvées que dans de rares tissus sains mais qu'ils étaient surtout présents dans divers tissus cancéreux et lésions pré-néoplasiques [46].

La présence de ces corps intra-cytoplasmiques pourrait expliquer en partie le risque de survenue d'une hémopathie.

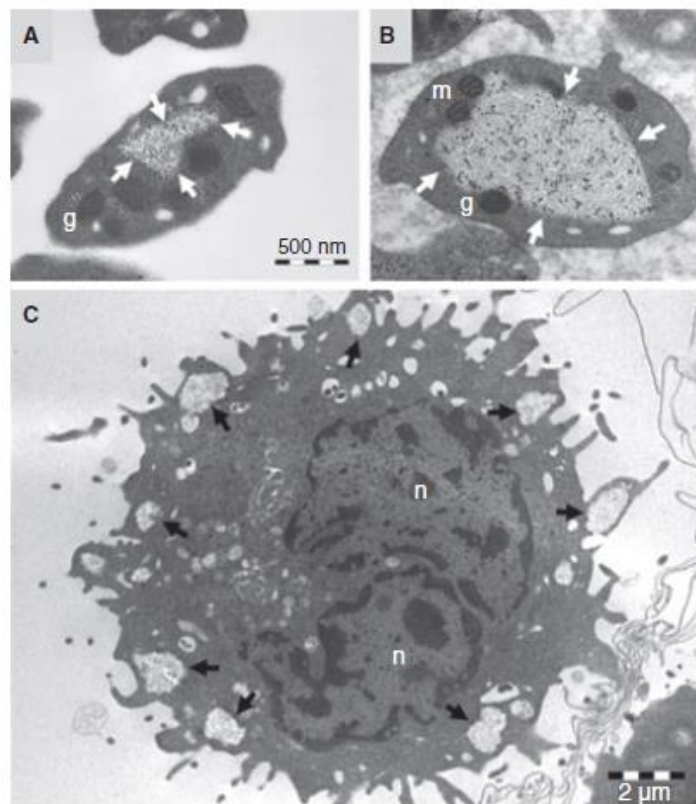


Figure 5 : Ultrastructure des particules intra-cytoplasmiques liées à *ANKRD26*.

A et B : plaquettes possédant des particules intra-cytoplasmiques (flèches blanches). C : mégacaryocyte avec ces mêmes particules (flèches noires).

Source : d'après Balduino C. L. *et al.* [46]

De plus, certains articles ont montré que le gène *ANKRD26* appartient à une famille de gènes spécifiques des primates, nommée POTE (*Prostate, Ovary-, Testis-, and placenta-Expressed genes*) [48]. Ceux-ci étant des gènes pro-apoptotiques, leur dérégulation peut induire des anomalies dans les phénomènes d'apoptose qui peuvent participer aux différents aspects de la pathologie. De plus, l'expression de ce type de gènes est très souvent retrouvée au niveau de tissus cancéreux alors qu'il n'est présent que dans de rares tissus sains [48].

D'après les dernières recherches sur la physiopathologie de cette TC [47], il a été montré que les mutations du gène *ANKRD26* sont situées en 5'UTR au niveau d'une région régulatrice de son expression. Il en résulte ainsi une surexpression du gène au niveau des mégacaryocytes.

Ceci est d'autant plus important qu'il y a une relation étroite entre *RUNX1-FLII* et *ANKRD26*. En effet ce dernier est régulé négativement par le couple *RUNX1-FLII* et en cas de mutation 5'UTR cette inhibition n'est rendue possible et *ANKRD26* peut se sur-exprimer au niveau des mégacaryocytes. Sachant que *RUNX1* et *FLII* codent pour des facteurs intervenant dans la régulation de la mégacaryopoïèse, il apparaît alors que cette mutation induit une dysmégacaryopoïèse affectant la synthèse plaquettaire.

La perte d'expression de *RUNX1* au niveau mégacaryocytaire implique différentes cascades d'événements, dont l'activation d'une voie de signalisation TPO/MPL et plus particulièrement via MAPK/ERK1/2 [47]. De plus, il a été montré que MAPK et ERK1/2 sont nécessaires à différentes phases de la mégacaryopoïèse, et plus particulièrement afin d'initier la différenciation alors que leur inhibition assure la formation des proplaquettes.

La protéine *ANKRD26* est contenue dans la membrane cellulaire et interagit avec différents récepteurs transmembranaires. Il a été montré que la perte de son inhibition par *RUNX1-FLII* induit sa surexpression provoquant ainsi son accumulation au niveau membranaire. Ceci altère probablement la voie TPO/MPL et conduit à une hyper expression de MAPK/ERK1/2 contribuant au défaut de formation des proplaquettes et donc à la thrombopénie.

Il a également été montré que TPO/MPL ne régule pas seulement la différenciation au cours de la mégacaryopoïèse, mais aussi celle de différentes cellules souches hématopoïétiques. Ainsi une mutation *ANKRD26* peut favoriser les transformations leucémiques via une dérégulation de ce système, expliquée par la voie MAPK hyper exprimée assurant une prolifération et une survie cellulaire.

1.2.5 Amégacaryocytose avec synostose radio-cubitale (CTRUS)

Présentation clinico-biologique

L'amégacaryocytose avec synostose radio-cubitale est une forme syndromique de TC caractérisée par une anomalie squelettique comme indiquée dans son nom. Cette fusion, au niveau proximal du radius et de l'ulna, limite chez les patients la pronation et la supination de l'avant-bras [8].

Les patients présentent également une thrombopénie profonde et fortement symptomatique provoquant une forte susceptibilité aux saignements [49]. Dans le cas de pathologies trop bruyantes, le seul traitement curatif reste la greffe de cellules souches hématopoïétiques [12].

Sur le frottis médullaire, on note une absence ou une hypoplasie importante du nombre de mégacaryocytes. De plus, une pancytopénie peut se développer progressivement mais cet aspect n'est pas systématique.

Présentation génétique

Cette pathologie est de transmission autosomique dominante liée à une mutation du gène *HOXA11* situé en 7p14-15 [8] et qui se définit par une délétion d'un seul nucléotide. Celle-ci

induit un décalage du cadre de lecture et provoque ainsi l'apparition prématurée d'un codon STOP aboutissant à une protéine tronquée [49].

Physiopathologie

Les gènes *HOX* (*Homebox*) sont une famille relativement hétérogène et pour la plupart impliqués dans différentes phases de l'hématopoïèse [50]. *HOXA9* et *HOXA10* interviennent dans la synthèse de l'hème, *HOXB4* dans la différenciation de cellules souches hématopoïétiques... Certains d'entre eux, dont *HOXA11*, régulent l'expression de gènes de la différenciation cellulaire et de la morphogenèse.

Néanmoins *HOXA11* est retrouvé ni exprimé au niveau plaquettaire, ni au niveau mégacaryocytaire [49][50].

Cependant une hypothèse est tout de même avancée, afin d'expliquer l'implication de cette mutation dans les aspects hématologiques et squelettiques [49]. Au cours de l'embryogenèse, il a été montré qu'au niveau du lieu où se met en place l'hématopoïèse définitive, de hautes concentrations en transcrits d'*HOXA11* sont retrouvées. Du fait de la perturbation d'interaction entre *HOXA11* et les autres gènes régulant la différenciation mégacaryocytaire (par défaut du site de liaison à l'ADN) il est permis de suspecter que la mutation induit un défaut de mégacaryopoïèse [49].

Cependant, une récente publication [51] rapporte l'existence de cas de CTRUS ne présentant pas de mutation *HOXA11*. C'est ainsi qu'une équipe japonaise a mis en évidence la présence d'une mutation du gène *MECOM* codant pour une protéine EVI1. Différents types de mutations ont été mises en évidence mais toutes touchent la même zone de la protéine EVI1. Ce gène est retrouvé exprimé au sein des cellules souches hématopoïétiques et joue un rôle important dans l'hématopoïèse ainsi que dans l'auto-renouvellement de ces CSH. Au niveau de modèles murins, ce gène a été décrit comme intervenant dans le développement de certains organes (poumons, système urinaire, cœur et membres) ce qui pourrait expliquer le phénotype morphologique CTRUS. La cohorte décrite dans cette étude ne comporte que trois membres atteints de cette pathologie mais il semblerait qu'en comparaison avec les patients *HOXA11*, ceux atteints de mutations *MECOM* souffriraient d'une symptomatologie hématologique plus prononcée. Cependant cette très récente découverte doit encore être davantage étudiée afin d'en affiner les conclusions [51].

1.2.6 Pseudo-Willebrand plaquettaire

Présentation clinico-biologique

Le pseudo-Willebrand plaquettaire est une forme non syndromique de TC. Découverte en 1982 par Weiss *et al.*, il est très proche de la maladie de Willebrand type 2B [8] avec laquelle le diagnostic différentiel n'est pas aisé.

Le facteur Von Willebrand (vWF) possède deux rôles principaux. Dans un premier temps il permet l'adhésion plaquettaire au sous-endothélium vasculaire, par l'interaction entre la glycoprotéine de surface plaquettaire GP1b α et le vWF exposé au niveau d'une lésion vasculaire. Enfin il assure le transport et la protection du facteur VIII de la coagulation, essentiel à l'hémostase [52].

Présentation génétique

Le pseudo-Willebrand plaquettaire est une pathologie à transmission autosomale dominante et concerne une mutation sur le gène *GP1BA*, situé en 17p13, codant la glycoprotéine de surface plaquettaire GP1b α [8].

Physiopathologie

Cette mutation induit une augmentation d'affinité de GP1b α pour vWF provoquant ainsi l'agglutination spontanée des plaquettes avec vWF. Il en résulte une thrombopénie par consommation et une diminution du taux de vWF circulant [8]. Néanmoins les patients atteints ne présentent qu'une faible tendance hémorragique.

Cette thrombopénie peut être fluctuante et s'aggraver dans diverses situations, où l'on provoque une libération de vWF, comme la grossesse, le stress, une infection,... [53], situations où l'agglutination plaquettaire est potentialisée par l'augmentation de vWF exposé.

Sur un plan biologique, le frottis sanguin montre des plaquettes de taille légèrement augmentée, correspondant à des plaquettes plus jeunes liées à un turn-over plus important permettant de compenser la consommation [8].

Bien que la maladie de Willebrand type 2B soit trois fois plus fréquente que le Willebrand plaquettaire, il est important de garantir un bon diagnostic différentiel. En effet, la prise en charge thérapeutique des patients est totalement différente du fait de la physiopathologie de ces deux pathologies [52].

Au cours de la maladie de Willebrand 2B, on retrouve une mutation sur gène du vWF touchant le domaine de liaison du vWF au GP1b α . Ceci conduisant à l'augmentation d'affinité du vWF pour GP1b α plaquettaire. Ainsi, les multimères de haut poids moléculaire de vWF se lient spontanément aux plaquettes (via GP1b α) provoquant leur agglutination et de ce fait une thrombopénie de consommation, semblable à celle du pseudo-Willebrand.

Prise en charge thérapeutique

De cette différence de localisation de la mutation, on comprend l'intérêt du diagnostic différentiel pour la thérapeutique proposée au patient. Dans le cas de la maladie de Willebrand 2B, le vWF étant déficient, il est nécessaire d'en apporter par l'injection de concentrés de vWF. Dans le cas du pseudo-Willebrand, le récepteur plaquettaire étant déficient, il est nécessaire d'apporter, en cas de besoin, des concentrés plaquettaires afin de rétablir une hémostase primaire efficace [53].

De plus, il est primordial de ne pas traiter un pseudo-Willebrand plaquettaire avec de la desmopressine, celle-ci, favorisant la libération du vWF des cellules endothéliales, provoquerait une aggravation de la thrombopénie et donc une aggravation de la symptomatologie hémorragique.

Le diagnostic différentiel est ainsi primordial entre ces deux pathologies. Ce dernier n'est possible que par la recherche de mutations (sur le vWF ou sur le gène du GP1b α) ou encore par des techniques d'agrégation spécialisées. Néanmoins ces dernières n'étant réservées qu'à quelques centres de références, il est plus aisé d'avoir recours aux recherches génétiques. Ceci d'autant plus que le pré-analytique du transport d'ADN est beaucoup plus facile à maîtriser que celui de tubes d'hémostases, dans le cadre d'un envoi vers un centre spécialisé [52].

1.2.7 Thrombopénie liée à ETV6

Présentation clinique

La thrombopénie liée à ETV6 est une nouvelle entité de TC, que très récemment décrite. Seuls de très rares cas ont actuellement été décrits, mais il apparaît que cette pathologie n'aurait pas d'expression clinique particulière. Elle pourrait être classée dans les formes non syndromiques de TC.

Les saignements rapportés chez ces patients sont modérés, avec des tendances aux ecchymoses et aux épistaxis. Il est également possible d'observer des ménorragies chez certaines femmes [54].

Présentation biologique

La principale expression biologique de cette forme de TC est la thrombopénie. Celle-ci est modérée, avec 90 G/L de moyenne [55].

Néanmoins, le frottis sanguin ne rapporte pas d'anomalies morphologiques des plaquettes, ni même de modification de taille. Il est cependant observé des globules rouges macrocytaires.

L'étude médullaire montre une dysmégacaryopoïèse avec une hyperplasie de MK hypolobés et de petites tailles. De plus, une dysplasie érythroblastique est également observée [55][34].

Les patients atteints par cette pathologie présenteraient, comme dans d'autres TC, une plus grande susceptibilité à développer des leucémies aiguës, myéloïdes comme lymphoïdes, et/ou des syndromes myélodysplasiques [54].

Présentation génétique

Le gène en cause dans cette TC est *ETV6* codant pour un facteur suppresseur de tumeur ayant un rôle important dans la régulation de l'hématopoïèse [55]. Actuellement, la transmission est décrite comme étant autosomale dominante [56].

Dans de nombreux cas de leucémies aiguës lymphoïdes de l'enfant, il est retrouvé des mutations somatiques au niveau de ce gène [56]. Les facteurs prédisposant aux leucémies étant encore relativement peu connus, ces observations ont orienté les recherches vers l'impact d'une présence héréditaire de ce type de mutations.

Au niveau de la location des mutations sur le gène, il y a quelques différences selon les origines. En effet, les somatiques peuvent se situer sur l'ensemble du gène, affectant les différents domaines, alors que celles d'origine héréditaire ne sont, pour le moment, retrouvées qu'au niveau de zones codant pour deux des trois domaines d'intérêt de cette protéine [54].

En effet *ETV6* est constituée de trois domaines principaux : [55][34]

1. Un domaine N-terminal (PNT) qui permet l'interaction avec divers facteurs comme FLI-1 par exemple mais qui assure également la dimérisation de la molécule, indispensable à son activité,
2. Un domaine central, mal connu, mais qui assurerait la régulation de l'effet inhibiteur de la protéine,
3. Un domaine C-terminal (ETS) qui permet la liaison à l'ADN.

Les mutations à transmission héréditaire n'ont été retrouvées que le domaine central et C-terminal.

Physiopathologie

La physiopathologie de cette thrombopénie n'est pas encore clairement élucidée.

ETV6 est exprimé dans les cellules souches hématopoïétiques ainsi que dans les progéniteurs mégacaryocytaires et érythrocytaires. Afin d'exercer son activité, la protéine nécessite d'être dimérisée pour permettre son passage au niveau nucléaire [55].

La liaison à l'ADN, par la zone ETS, est normalement auto-inhibée par un domaine C-terminal inhibiteur (CID). Certaines mutations touchent un domaine de liaison qui favorise indirectement la liaison à l'ADN par atténuation de cette inhibition. De plus ce domaine de liaison est essentiel pour l'interaction entre *ETV6* et d'autres facteurs de régulation [54].

D'autres mutations induisent une déstabilisation du domaine ETS, participant à la diminution de la liaison à l'ADN [54].

Ainsi l'ensemble de ces mutations provoque la séquestration d'ETV6 au niveau cytoplasmique, induisant son impossibilité à migrer vers le noyau et à exercer son rôle répresseur sur certains gènes [54].

Néanmoins, le rôle de ces mutations d'ETV6 dans la malignité n'est pas encore totalement décrit. Un lien avec d'autres gènes régulateur type RUNX1-FLI1 et ANKRD26 participerait à cette physiopathologie, mais des études complémentaires doivent encore être mises en œuvre.

1.3 Plaquettes de taille augmentée

1.3.1 Macrothrombopénie liée à *TUBB-1*

Présentation clinico-biologique

La macrothrombopénie liée à *TUBB-1* est une forme rare de TC non syndromique. Seules quelques familles dans le monde ont été décrites. Elle se caractérise uniquement par une macrocytose plaquettaire sans symptomatologie hémorragique évidente.

Présentation génétique

Cette thrombopénie est de transmission autosomale dominante liée à la mutation du gène *TUBB-1* situé en 20q13 et codant pour la β 1-tubuline [8]. Cette dernière est trouvée exclusivement au niveau des plaquettes et des mégacaryocytes [57].

Physiopathologie

La physiopathologie de cette TC, tout comme d'autres formes, est liée à un défaut du cytosquelette induisant une anomalie de formation plaquettaire [58]. L'anomalie en cause dans cette pathologie est la tubuline. La tubuline est formée de dimères d' α - et de β -tubuline qui, une fois organisés, forment les microtubules nécessaires au cytosquelette cellulaire.

Les différentes mutations décrites du gène *TUBB-1* affectent toutes un site particulier de la β 1-tubuline. Un site proche de la zone d'interface α/β provoque ainsi la synthèse d'une β 1-tubuline instable [57]. Selon la mutation en cause, différents impacts sur l'organisation cellulaire de ces microtubules ont été décrits. En effet p.R318W n'induirait pas d'anomalie d'organisation ni de localisation cytoplasmique [57] contrairement à p.D249N [58]. Néanmoins, un défaut quantitatif est systématiquement retrouvé caractérisé par une diminution de l'ordre de 50% du taux de β 1-tubuline par rapport à des patients sains [57][58].

Cette macrothrombocytopenie s'explique donc par une dysmégacaryopoïèse où les mégacaryocytes présentent un défaut de segmentation (lié à l'anomalie du cytosquelette). En effet ceux-ci forment des « blebs » anormalement larges et irréguliers, dont résultent des macroplaquettes en nombre diminué, une macrothrombocytopenie [57].

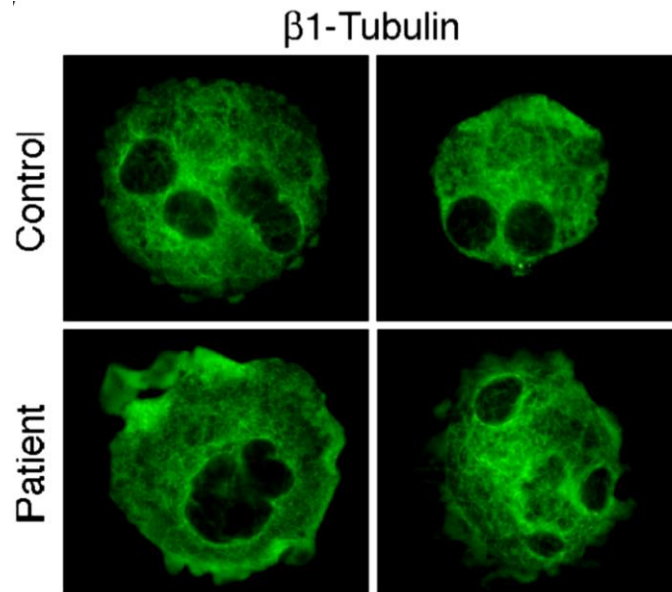


Figure 6 : Dysmégacaryopoïèse liée à la mutation *TUBB-1*

Mégacaryocytes de patients sains comparés à ceux de patients atteints de macrothrombocytopénie liée à *TUBB-1* présentant des bleb anormaux dont résulte la macrothrombopénie.

Source : d'après Kunishima S. *et al.* [57]

1.3.2 Syndrome des plaquettes grises (GPS)

Présentation clinico-biologique

Le syndrome des plaquettes grises (GPS) est une forme non syndromique de TC. Décrit pour la première fois en 1971 par Raccuglia *et al.* il se caractérise par une macrothrombopénie avec absence de granule alpha [8]. Cette absence de granulations alpha se traduit par un défaut de coloration des plaquettes sur le frottis sanguins, qui apparaissent ainsi « grises » au MGG.

Une autre caractéristique essentielle de cette pathologie est l'évolution, plus ou moins rapide, vers une myélofibrose associée à une splénomégalie [59]. Celle-ci se traduit également par un anisopoïkilocytose des globules rouges avec présence de dacryocytes.

Présentation génétique

La transmission est décrite comme étant autosomale récessive mais certains auteurs la décrivent également dominante [8][60]. En effet, 2 types de mutations ont été identifiés :

1. Historiquement la première et la plus décrite, sur le gène *NBEAL2*, serait de transmission autosomique récessive et située en 3p21.3p22.1. Ce gène codant pour une protéine exprimée au niveau des plaquettes et mégacaryocytes, serait essentiel au développement des granules alpha,
2. Plus récemment, certains auteurs ont mis en évidence une mutation *GF11B*, qui serait de transmission autosomique dominante. Ce gène codant pour un facteur de transcription aurait une activité inhibitrice au cours d'étapes de la mégacaryopoïèse.

Physiopathologie

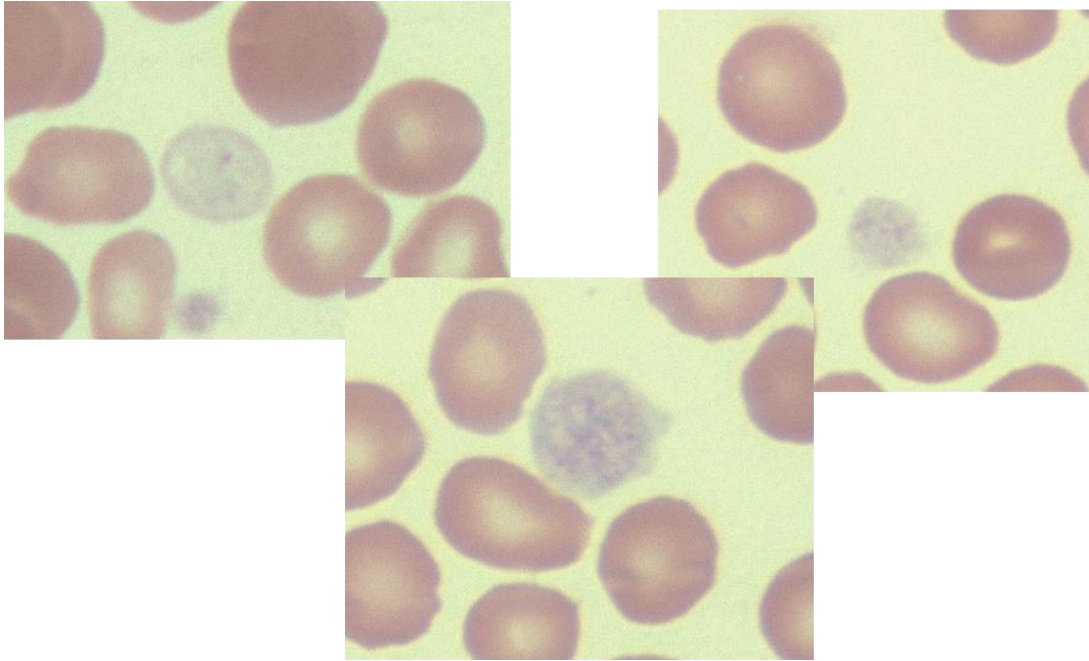


Figure 7 : Photographies au microscope optique (x1000) de plaquettes optiquement vides dans le cadre d'un patient souffrant de GPS.

La physiopathologie de ce syndrome repose sur un défaut de granules alpha. Or celles-ci contiennent plusieurs centaines de protéines [61] ayant différents rôles. En dehors de leurs capacités hémostatiques, ces dernières permettent également des phénomènes d'adhésion plaquettaire, pro-inflammatoires, ... (vWF, fibrinogène, IL-1, PF4, PDGF...) [62].

Une plaquette saine contient environ une quarantaine de granules alpha, qui représentent environ 10% de la taille totale. Ils sont formés très précocement au cours de la mégacaryopoïèse par la fusion de petites vésicules, puis transportées vers les expansions cytoplasmiques (blebs) à l'origine des futures proplaquettes [59].

Diverses études montrent ainsi que l'origine de la pathologie n'est pas un défaut de formation de ces granules alpha, mais leur perte au niveau plaquettaire mais aussi mégacaryocytaire. Cette libération du contenu granulaire, par les mégacaryocytes, dans la moelle osseuse serait à l'origine d'un état inflammatoire de celle-ci, contribuant au développement de la fibrose. En effet de nombreuses protéines pro-inflammatoires ainsi que divers facteurs de croissance seraient libérés, recrutant de ce fait des fibroblastes.

Dérivant de cette fibrose médullaire, le développement d'une hématopoïèse secondaire est à l'origine de la splénomégalie retrouvée chez les patients.

Seul ce phénomène de perte des granulations alpha n'est pas encore clairement élucidé. Diverses hypothèses sont avancées comme l'empérypolèse impliquant mégacaryocytes et leucocytes, fréquemment observé chez ces patients, provoquerait la destruction mégacaryocytaire et la libération du contenu granulaire [59].

Cette thrombopénie s'associe à une clinique hémorragique modérée à sévère liée à une thrombopathie surajoutée. En effet, certains auteurs ont montré un défaut d'agrégation au collagène [12] des plaquettes pathologiques. De plus, le défaut de vWF au niveau plaquettaire (contenu initialement dans les granules alpha) induit une anomalie d'adhésion et d'agrégation, bien que le taux circulant de vWF et celui contenu dans les grains de Weibel-Palade soient

normaux. Ceci prouve que le vWF plaquettaire est donc essentiel à la formation du thrombus [61].

Il s'agit donc d'un syndrome associant une macrothrombopénie, faite de plaquettes ayant un défaut de granule alpha et étant ainsi non colorées au MGG, et une thrombopathie, par manque de certaines protéines granulaires essentielles à l'hémostase, expliquant la symptomatologie hémorragique. S'y surajoute une fibrose médullaire périmégacaryocytaire.

1.3.3 Thrombopénie liée à *FLNA*

Présentation clinico-biologique

La thrombocytopénie liée à *FLNA* est une forme syndromique de TC.

Elle s'exprime par une macrothrombopénie associée, dans la majorité des cas, à une hétérotopie périventriculaire nodulaire. Un syndrome otopalatodigital avec atteintes squelettiques et retard mental a également été décrit. De plus, une atteinte cardiaque, à type de dystrophie valvulaire, ainsi qu'une dysplasie osseuse des extrémités ont été rapportés dans certains articles [63].

Au niveau du frottis sanguin, il est observé en sus de l'anisocytose plaquettaire, une distribution hétérogène des granules alpha ainsi que de rares plaquettes possédant des granules de grandes tailles [64].

Présentation génétique

Elle est causée par la mutation du gène *FLNA*, codant pour la filamine A, situé en Xp28 [8].

Physiopathologie

Il est constaté que *FLNA* interfère avec de nombreuses fonctions au cours de l'évolution.

Il existe trois types de filamines, FLNa, FLNb et FLNc, mais ne s'exprime en majorité au niveau plaquettaire uniquement FLNa [65]. Ce sont des protéines qui stabilisent le réseau de filaments d'actine, en liant le cytosquelette à la membrane cellulaire [66].

Il a été montré que FLNa permet l'ancrage du cytosquelette à la membrane cellulaire via des récepteurs d'adhésion [8]. Certains auteurs ont démontré que FLNa doit se dimériser grâce à une immunoglobuline, et cette dernière se fixe au GPIb α afin d'assurer la fixation au cytosquelette. En cas de mutation de *FLNA*, il y a perte d'interaction GPIb α -FLNa, ce qui déstabilise la membrane plaquettaire et induit un défaut d'expression de GPIb α . Ceci permet d'expliquer la thrombopathie observée chez ces patients, responsable de la symptomatologie hémorragique [65]. De plus, au niveau mégacaryocytaire, on observe que des anomalies du cytosquelette sont responsables, d'une formation de plaquettes de tailles anormales, ainsi que d'une mauvaise maturation des granules alpha. Ainsi les plaquettes n'ayant pas de granules alpha totalement fonctionnelles, participent à la thrombopathie.

Une caractéristique de ce syndrome, visible au frottis sanguin en plus de la macrocytose, est la présence de granules alpha de grandes tailles [66].

Ce syndrome est ainsi causé par une anomalie du cytosquelette, structure indispensable durant la mégacaryopoïèse afin d'assurer la fragmentation correcte du mégacaryocyte en proplaquettes. En effet, durant la maturation, le mégacaryocyte va se réarranger et émettre des expansions cytoplasmiques, au niveau desquelles les réseaux de filaments y amènent les éléments essentiels à la formation de plaquettes. On comprend ainsi qu'un défaut au niveau de ce système induit une formation anormale de plaquettes [66].

1.3.4 Thrombopénie liée à *GFI1B*

Présentation clinique

La thrombopénie liée à *GFI1B* est une forme non syndromique de TC décrite pour la première que très récemment. Elle se caractérise néanmoins par une symptomatologie hémorragique plus ou moins intense. En effet il est rapporté que la sévérité hémorragique présente une variabilité interindividuelle, certains patients étant affectés par des saignements spontanés alors que d'autres ne présentent des saignements anormaux qu'en cas de chirurgie [67].

Présentation biologique

Cette pathologie se caractérise sur le frottis sanguin par une macrothrombopénie sans plaquettes géantes. La cytopénie est généralement modérée et s'y associe une thrombopathie révélée par une défaillance des tests d'agrégation. Il est également observé une dysplasie érythrocytaire de type anisopoïkilocytose [67].

Au niveau du frottis sanguin il est également retrouvé une diminution du nombre de granules alpha au niveau plaquettaire, pouvant laisser penser à un syndrome des plaquettes grises.

Présentation génétique

Cette TC est liée à la mutation du gène *GFI1B* codant pour un facteur de transcription GFI1b ayant un rôle essentiel dans la mégacaryopoïèse et l'érythropoïèse [68]. Cette mutation est de transmission autosomale dominante et située sur le chromosome 9q34.13 [69].

C'est une mutation également décrite dans de rares cas de syndrome des plaquettes grises.

Physiopathologie

Résulte de cette mutation, une altération de l'activité de ce facteur de transcription et ainsi une diminution du contenu des granules alpha associée à une anomalie d'expression de protéines plaquettaires [67].

Des modèles murins ont été élaborés afin d'établir la nécessité de GFI1b pour une hématopoïèse normale, car en effet cette protéine s'exprime au niveau de cellules souches hématopoïétiques, de progéniteurs érythrocytaires ainsi que mégacaryocytaires.

Il a été observé que les mutants exprimant l'anomalie génétique présentent un changement de morphologie plaquettaire et une diminution du nombre de granules alpha. Ce défaut granulaire participerait à l'expression de la thrombopathie par un manque de différents éléments nécessaires à l'hémostase primaire comme le fibrinogène et le vWF. Une diminution de certaines glycoprotéines de surface (GPIIb et GPIIIa) a également été mise en évidence contribuant également à la symptomatologie hémorragique [67][69].

L'hypothèse d'un défaut au niveau du cytosquelette est également possible, provoquant une altération de changement de conformité après stimulation et activation plaquettaire [67].

Néanmoins, le processus de formation et de disparition des granules alpha reste mal connu, même si l'étude de GPS devrait pouvoir éclaircir ces points.

1.3.5 Syndrome de Bernard-Soulier variant monoallélique

Présentation clinique

Le syndrome de Bernard-Soulier variant monoallélique est également souvent dénommé variant Bolzano, pour le nom de la ville de l'un des premiers patients découvert. Il est décrit comme une forme atténuée de syndrome de Bernard-Soulier (BSS) [46]. Néanmoins le terme exact définissant cette pathologie a été proposé par Noris *et al.* comme « syndrome de Bernard-Soulier monoallélique dominant » [70] afin de le distinguer officiellement du BSS classique.

Les manifestations cliniques sont mineures voir absentes. Les patients peuvent dans certains cas présenter des ecchymoses, de fréquents épistaxis, des menstruations importantes mais aucune hémorragie importante lors d'actes chirurgicaux n'a été décrite [71].

Comme beaucoup d'autres formes de TC non syndromiques, le diagnostic de BSSm reste difficile et de nombreux cas sont initialement confondus avec des PTI [70].

Cette pathologie, bien que rare, est une des TC les plus fréquentes en Italie. De plus actuellement les seuls cas décrits sont localisés au niveau de cette péninsule. Néanmoins avec les brassages de populations d'autres cas internationaux vont probablement apparaître [46].

Présentation biologique

Contrairement au BSS homozygote classique, le variant monoallélique se caractérise par une thrombopénie modérée, de l'ordre de 80 G/L ainsi que par une macrocytose plaquettaire également modérée. Le frottis sanguin de cette macrothrombopénie ne retrouve donc pas de plaquettes géantes [46].

Dans la plupart des cas, les tests d'agrégation plaquettaire à la ristocétine montrent des résultats normaux, comparables aux témoins, ce qui initialement ne facilite par le diagnostic [70]. Néanmoins l'expression du GPIb-IX-V est trouvée réduite d'environ 60% chez les patients BSSm [46].

Le frottis médullaire montre un nombre de mégacaryocyte normal [72] mais quelques peu dystrophiques, avec des blebs anormalement larges [46]. La survie plaquettaire ne semble pas être réduite et la différenciation ainsi que la maturation mégacaryocytaire paraissent identiques aux témoins [72].

Présentation génétique

Contrairement au BSS classique qui est de transmission autosomale récessive, le variant Bolzano s'en différencie en étant autosomique dominant.

Les mutations en causes dans le BSS affectent les gènes *GP1BA*, *GP1BB* et *GP9* codant respectivement pour GPIb α , GPIb β et GPIX. Ces trois protéines, associées au GPV, forment le complexe récepteur GPIb-IX-V fondamental dans le processus hémostatique. Concernant le variant hétérozygote du BSS, les mutations décrites affectent principalement *GP1BA* et dans une moindre mesure *GP1BB*. La mutation Bolzano correspond initialement à p.Ala156Val [46] mais d'autres mutations ont été décrites dans la littérature [70][73].

Se pose alors la question de savoir pourquoi certaines mutations, à l'état hétérozygote, impactent la physiologie plaquettaire alors que pour d'autres l'homozygotie est indispensable à la pathologie [70].

Physiopathologie

Les mutations mises en évidence affectent les glycoprotéines du récepteur plaquettaire GPIb-IX-V permettant la fixation du vWF endothélial lors d'une brèche vasculaire. Ainsi il en résulte une désorganisation de ce complexe ce qui devrait conduire à une atteinte des capacités hémostatiques. Néanmoins il apparaît que l'expression de l'allèle sain permet d'assurer une synthèse suffisante de ce récepteur et d'assurer une hémostase primaire suffisante [46]. Ceci explique l'absence de tendance hémorragique des patients BSSm.

Outre l'explication de cette absence de symptomatologie, il est nécessaire d'explorer le mécanisme de la macrothrombopénie.

En effet ce récepteur GPIb-IX-V possède a priori un rôle primordial au cours de la mégacaryopoïèse. Celui-ci est fortement suspecté dans le sens où une interaction avec le fibrinogène et le vWF intervient au moment de la libération vasculaire des plaquettes.

Au cours de la mégacaryopoïèse, les mégacaryoblastes se situent dans une niche ostéoblastique, où le collagène de type I abondant refreine l'extension des proplaquettes à

partir des mégacaryocytes. Celles-ci vont être libérées vers une niche vasculaire où le fibrinogène et le vWF participent à la libération des plaquettes dans la circulation sanguine [72].

Sur le plan structurel, la glycoprotéine GPIb α possède deux domaines d'intérêt : [71]

1. Un domaine terminal globulaire qui porte le site de liaison au vWF. Celui-ci permet d'assurer le mécanisme d'hémostase primaire.
2. Un domaine cytoplasmique qui porte le site d'interaction avec les filaments d'actine du cytosquelette. Celui-ci permet une maturation mégacaryocytaire normale et un ancrage à la membrane cellulaire du cytosquelette.

L'hypothèse avancée par plusieurs auteurs, sur l'origine de la thrombopénie, est l'anomalie de conformation du complexe GPIb-IX-V sur le domaine intracytoplasmique. Ceci compromettrait l'interaction avec le cytosquelette (où une autre structure encore inconnue) qui est nécessaire au cours de la formation des proplaquettes [72]. Une thrombopénie résulterait de ce défaut de proplaquettes. Néanmoins un taux résiduel de GPIb α , grâce à l'allèle sain, permettrait d'assurer une agrégation quasi normale [71].

Il a été déjà démontré que l'organisation des microtubules intracellulaires a un rôle essentiel au cours de la mégacaryopoïèse. Afin de confirmer cette hypothèse de thrombopénie, il a été mis en évidence des anomalies de tubuline au niveau des mégacaryocytes mais également au niveau des proplaquettes et des plaquettes. Ces dernières se présentent par une mauvaise distribution de la tubuline intracellulaire, ce qui conduit à une désorganisation et à un défaut au cours de la maturation et de la différenciation. En résulte enfin des blebs de taille anormalement grande et en nombre réduit, conduisant à la macrothrombopénie [72]. Néanmoins le mécanisme moléculaire liant ces mutations et la désorganisation de la tubuline n'est pas connu.

Cette hypothèse n'est ainsi pas forcément le seul phénomène impliqué. D'autres peuvent être avancées comme la nécessité d'une interaction entre GPIb α et vWF. Cependant aucune macrothrombopénie n'est observée chez les patients atteints de maladie de Willebrand de type III, qui présentent une absence totale de vWF [72].

1.3.6 Thrombopénie liée à ACTN-1

Présentation clinico-biologique

La thrombocytopénie liée à *ACTN-1* est une forme non syndromique de TC.

L'expression de cette pathologie se limite à une macrothrombopénie modérée, aucune anomalie phénotypique récurrente n'ayant été décrite [74]. Néanmoins dans une étude portant sur 18 patients atteints, 3 ont développé une hémopathie maligne de type leucémie [75].

L'étude médullaire retrouve des MK présentant un nombre anormalement diminué de bleb et tailles augmentées. Ceci suggère une anomalie dans la formation des proplaquettes et induit une macrothrombopénie [34].

Présentation génétique

Elle est causée par la mutation du gène *ACTN-1* situé en 11q24. Sa transmission étant autosomale dominante [74].

Physiopathologie

Ce gène *ACTN-1* code pour l'alpha actinine 1, une des deux isoformes non musculaires d'alpha actinine. En effet il existe 4 isoformes différentes codées par, *ACTN-2* et *ACTN-3* au niveau musculaire et *ACTN-1* et *ACTN-4* au niveau non musculaire. Les mégacaryocytes ainsi que les plaquettes expriment essentiellement la forme d'alpha actinine 1 [76]. Cette dernière permet de lier les différents filaments d'actine et permet ainsi d'organiser ces réseaux [77].

Les filaments d' α -actinine réalisent donc des ponts entre ceux d'actine. Ils sont organisés en dimères antiparallèles possédant un domaine de liaison à l'actine au niveau N-terminal [77].

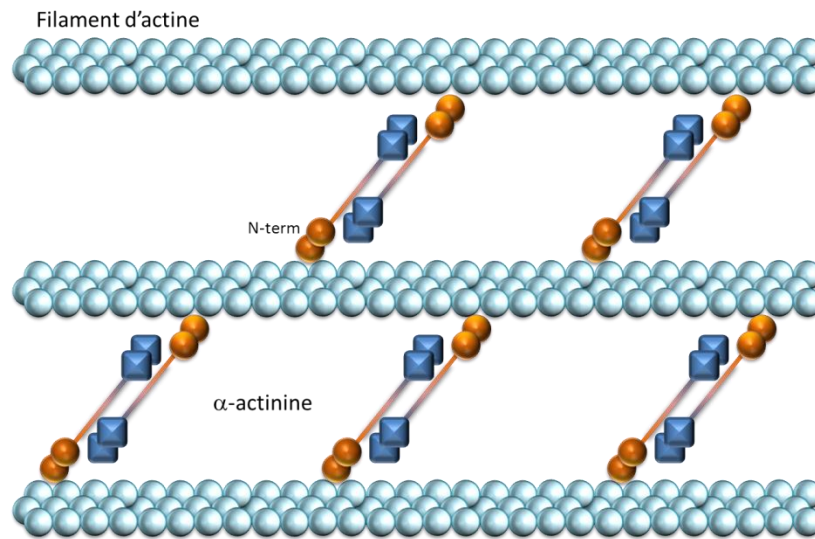


Figure 8 : Schéma d'organisation d'un réseau de filaments d'actine

Ce site de liaison est celui où se situent l'ensemble des mutations décrites dans la littérature. Ainsi elles provoquent une désorganisation du réseau d'actine, et de ce fait du cytosquelette [76].

Ceci joue un rôle important dans la mégacaryopoïèse. En effet la formation des proplaquettes résulte d'expansions cytoplasmiques mégacaryocytaires (« blebs ») qui sont par la suite libérées dans les sinusoides de la moelle. La réorganisation et la déformabilité du cytosquelette ainsi que des signaux de transduction permettent la régulation spatiale et temporelle de ce mécanisme [76].

Bottega *et al.* a montré que l'anomalie responsable de cette macrothrombopénie avait lieu à la phase tardive de la mégacaryopoïèse. En effet, le taux diminué de plaquettes réticulées (plaquettes jeunes) et un taux de thrombopoïétine légèrement augmenté sont en faveur de cette hypothèse [74].

Il est démontré que durant la formation des proplaquettes, les microtubules ainsi que le cytosquelette jouent un rôle critique. De part cette mutation *ACTN-1* et la dérégulation qui s'en suit, on observe une répartition anormale de ces blebs. En effet, sur un mégacaryocyte sain, on en retrouve une répartition uniforme en taille et en nombre sur sa périphérie, alors que pour un mégacaryocyte atteint, on observe une diminution de leur nombre ainsi qu'une augmentation de leur taille. Ceci permet d'expliquer la macrocytose et la thrombopénie qui en découlent [76].

Aucune symptomatologie hémorragique n'est rapportée. En effet, cette pathologie n'est associée à aucune thrombopathie. Les tests d'agrégation ne sont pas perturbés, même si une augmentation de l'expression de certaines glycoprotéines de surface ($GPIb\alpha$, $GPIIb$, $GPIIIa$,...) est constatée. La thrombopénie modérée, l'absence d'anomalie d'agrégation, combinés à cette hyper expression de glycoprotéine permet d'éviter toute tendance hémorragique [76].

1.3.7 Thrombopénie liée à *ITGA2B/ITGB3*

Présentation clinico-biologique

Cette pathologie est une variante du syndrome de Glanzmann. En effet ce-dernier ne présente ni thrombopénie ni anisocytose plaquettaire. Cette variante, en sus de la thrombopathie caractéristique, s'exprime par une macrothrombopénie [78].

Faisant partie du groupe des TC non syndromiques, cette pathologie est limitée dans son expression à une symptomatologie hémorragique modérée [79]. Cette dernière est liée à l'anomalie d'agrégation plaquettaire plus qu'à la thrombopénie.

En effet, la macrothrombopénie associée est modérée, de l'ordre de 80 G/L [80].

Présentation génétique

Bien que le syndrome de Glanzmann soit de transmission autosomale récessive, son variant thrombopénique est quant à lui de transmission autosomale récessive [8][81].

Les gènes en cause sont, comme pour la forme classique, *ITGA2B* et *ITGB3* codant pour l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$. Cette dernière est également nommée GPIIb/IIIa, glycoprotéine la plus abondante de la membrane plaquettaire [79].

Un grand nombre de mutations (~200) ont été décrites concernant le Glanzmann, dont la majorité affectent la synthèse des sous-unités $\alpha_{IIb}\beta_3$. De rares d'entre-elles touchent la fonctionnalité et certains autres encore induisent l'activation de $\alpha_{IIb}\beta_3$ [80][82].

Parmi ces dernières, deux groupes se distinguent : [80]

1. Le premier groupe de mutations localisées sur un résidu cystéine de la partie extracellulaire de β_3 . Néanmoins ces mutations induisent un défaut de ce récepteur mais sans thrombopénie.
2. Le second groupe est localisé au niveau de la région proximale de $\alpha_{IIb}\beta_3$ induit quant à elle une thrombopénie.

Les mutations en cause dans ce variant sont des mutations qui induisent un gain de fonction.

Sur le plan hématologique, le frottis sanguin retrouve une anisocytose plaquettaire avec présence de macroplaquettes sans plaquettes géantes. De plus les tests d'agrégation plaquettaire sont perturbés du fait de cette thrombopathie.

Physiopathologie

Il a été montré que les différentes mutations retrouvées chez les patients, induisent une activation constitutive du récepteur $\alpha_{IIb}\beta_3$. En effet les mutations interviennent dans une zone codant pour la sous-unité β du récepteur, ayant un rôle clé dans le maintien de la conformation de celui-ci. De plus ils expriment ce-dernier en moins grande quantité, que ce soit au niveau mégacaryocytaire que plaquettaire. Il est ainsi observé un nombre diminué de récepteurs au fibrinogène, ce qui impacte la formation plaquettaire comme nous allons le voir [78][79].

Certains auteurs ont montré que cette activation du récepteur induit l'activation de cascades enzymatiques conduisant à la polymérisation de filaments d'actine, impactant de ce fait la structure du cytosquelette et engendrant ainsi une formation plaquettaire anormale [78][80]. En effet la culture de MK *in vitro* montre des blebs anormalement, expliquant la macrocytose observée.

D'autres auteurs se sont intéressés au lien entre le microenvironnement médullaire et le processus de mégacaryopoïèse [83]. Celui-ci apparaît primordial à une formation plaquettaire de qualité. Il a déjà été montré dans des pathologies précédentes, que le facteur vWF intervenait de manière essentielle dans cette synthèse, mais le fibrinogène est également un acteur primordial. Il est présent dans les sinusoides médullaires et, par sa liaison au $\alpha_{IIb}\beta_3$ des MK, permet la formation des proplaquettes. Plus précisément il déclenche la migration des MK de la niche ostéoblastique vers la niche vasculaire [79]. De nombreux auteurs ont en effet

montré qu'un signal transmembranaire émanait de l'interaction entre des protéines de la matrice médullaire et les MK. Ce signal étant lié à la fixation du fibrinogène sur son récepteur GPIIb/IIIa [79].

Ainsi par la défaillance de ce récepteur, il est possible d'expliquer la survenue de cette macrothrombopénie modérée.

1.4 Plaquettes de tailles géantes

1.4.1 Syndrome MYH9

Présentation clinique

Initialement Richard May a découvert la présence d'inclusion intra leucocytaires associées à des plaquettes géantes et c'est en 1945 que Robert Hegglin a démontré la transmission héréditaire de ces anomalies [84]. Aujourd'hui le terme de « syndrome MYH9 » regroupe plusieurs pathologies, à savoir le syndrome d'Epstein, le syndrome de Fechtner, les anomalies de May-Hegglin ainsi que du syndrome Sebastian, car toutes sont l'expression de mutations d'un même gène. De plus c'est la cause la plus fréquente de TC à ce jour [46].

Cette pathologie peut se présenter comme une forme syndromique où totalement asymptomatique [46]. En effet il a été démontré une forte corrélation génotype/phénotype où selon la localisation de la mutation, la présentation clinique peut fortement varier. Néanmoins l'ensemble des cas souffrent d'une macrothrombopénie [64].

Dans certains cas, l'expression de cette pathologie se limite à une macrothrombopénie modérée sans atteinte non-hématologiques alors que pour d'autres cette cytopénie est plus profonde mais également associée à des atteintes organiques. Ces dernières sont représentées, par une atteinte rénale de type glomérulonéphrite évoluant vers une insuffisance rénale, par le développement d'une surdité ainsi que d'une cataracte [8].

La diathèse hémorragique est caractérisée, en cas de mutation défavorable, par des ecchymoses, des épistaxis ainsi que des saignements gingivaux. Des saignements anormaux lors de chirurgies, type extractions dentaires, peuvent être observés [84].

Concernant les atteintes rénales, elles apparaissent chez environ 30% des patients. Une protéinurie est détectée généralement avant l'âge de 30 ans et la majorité d'entre eux évoluent vers une insuffisance rénale terminale. Le recours à la dialyse et à la greffe rénale est fréquente aux stades avancés [84].

La symptomatologie oculaire résulte d'une cataracte précoce touchant environ 16% des patients avant l'âge de 23 ans [84].

Les anomalies auditives, de type surdité, sont les plus fréquentes des atteintes non-hématologiques. Celles-ci sont rapportées pour plus des deux tiers des patients [84].

Même si ces symptômes sont principalement rapportés chez les patients porteurs d'une mutation sur le domaine le plus sensible, une grande hétérogénéité de l'expression clinique est observée pour arriver aux patients ne présentant qu'une macrothrombopénie.

Présentation biologique

Un simple frottis sanguin permet en théorie d'orienter le diagnostic vers cette pathologie. En effet on y observe une anisocytose plaquettaire avec des plaquettes géantes, à savoir aussi voir plus grandes qu'un globule rouge, ainsi que des inclusions intra cytoplasmiques leucocytaires. Ces inclusions sont parfois visibles au frottis coloré au MGG, et y apparaissent colorés en bleu clair, mais toujours observables en immunofluorescence indirecte. Celles-ci sont nommées pseudo corps de Döhle et sont principalement retrouvées dans les polynucléaires neutrophiles (15 à 100% des polynucléaires en possèdent) [84].

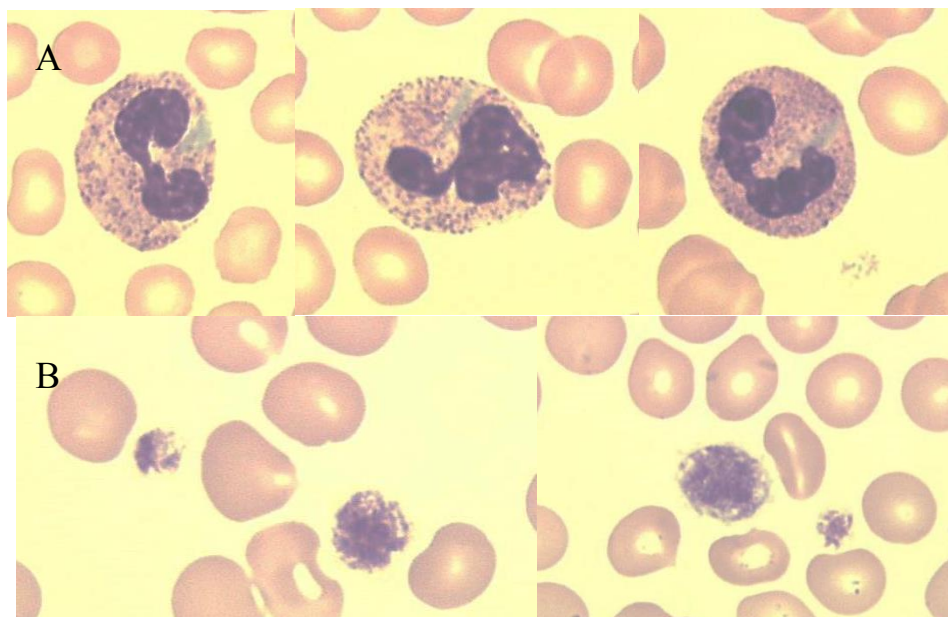


Figure 9 : Frottis sanguin (x1000) d'un patient atteint d'un syndrome MYH9.
 En A, différentes photographies d'inclusions intraleucocytaires basophiles. En B, illustrations de macroplaquettes et plaquettes géantes chez un patient MYH9.

Ces inclusions basophiles intra leucocytaires correspondent à des agrégats de chaînes lourdes de myosine non musculaire type IIA [84][85].

Cette pathologie est caractérisée, outre par la macrocytose plaquettaire, par une thrombopénie. Cette dernière est plus ou moins sévère selon la mutation en cause. On retrouve des patients avec moins de 10 G/L alors que d'autres peuvent quasiment atteindre le seuil des 150 G/L. Néanmoins il est encore difficile pour les hématimètres de les dénombrer avec certitude, les techniques par impédance étant limitées par la taille des plaquettes. Seules les dernières technologies de marquage par anticorps permettent une numération fiable [84]

Concernant les tests d'agrégation, on ne retrouve généralement pas d'anomalies, expliquant l'absence de thrombopathie associée.

Le frottis médullaire, bien qu'inutile au diagnostic, retrouverai une moelle avec des mégacaryocytes de morphologie normale et en nombre légèrement augmenté [84].

Présentation génétique

La mutation en cause dans ce syndrome affecte le gène *MYH9* situé en 22q12.3-13.1 [84]. La transmission est autosomale dominante mais 35% des cas seraient d'apparition *de novo* [64].

Il existe trois isoformes de myosine non musculaire de type II, à savoir NMMHC-IIA codée par *MYH9*, NMMHC-IIB codée par *MYH10* et NMMHC-IIC codée par *MYH14*. Leur nom est basé sur leur unique chaîne lourde.

Il a été noté une forte corrélation génotype/phénotype comme décrit dans le paragraphe de présentation clinique.

En effet deux groupes de mutations sont observés selon leur localisation [12][84] :

1. Les mutations touchant le domaine de tête situé en N-terminal
2. Les mutations touchant le domaine de queue

Le groupe touchant le domaine de tête (situé entre l'exon 1 et 18) induit des manifestations cliniques plus importantes que celles touchant le domaine de queue (situé entre l'exon 20 et 39) [84].

Physiopathologie

La myosine non musculaire de type II (NMM-II) a un rôle primordial dans les processus cellulaires nécessitant force et modifications cytosquelettiques. En effet elle possède un site catalytique à activité ATPase permettant de générer de l'énergie et ainsi favoriser les glissements et la tension des filaments d'actine [84].

Sur le plan structural la NMM-II est composée des deux chaînes lourdes associées à deux paires de chaînes légères : une paire de chaînes légères de régulation (RLC) et de deux chaînes légères essentielles (ELC).

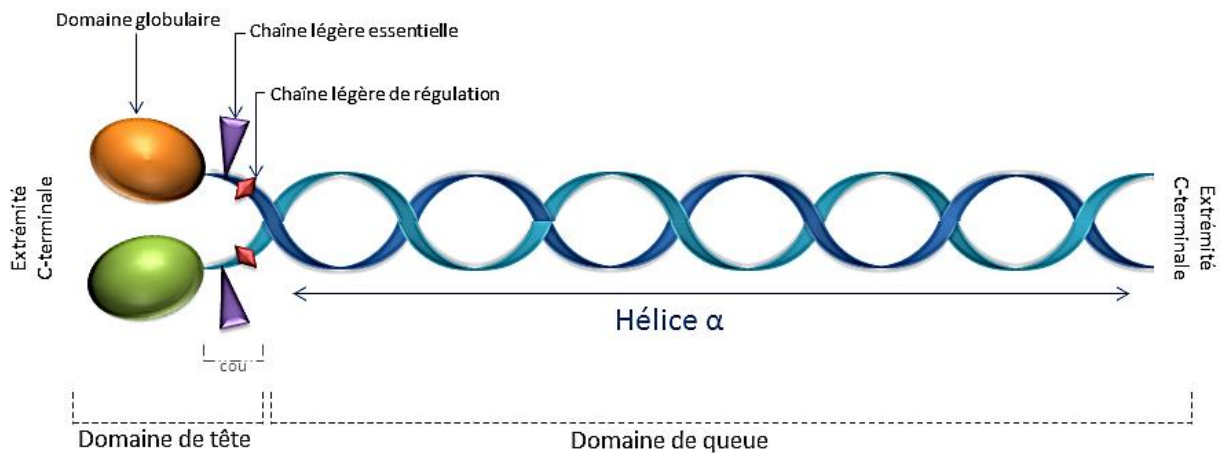


Figure 10 : Schéma structural de NMMHC-IIA

L'isoforme impliquée ici est le type IIA (NMMHC-IIA) caractérisé par une chaîne lourde possédant deux domaines principaux : [84]

1. Le domaine N-terminal en tête, domaine globulaire, également nommé moteur. En effet, c'est à ce niveau que se trouvent le site catalytique et le site d'interaction avec les filaments d'actine. Il apparaît que les mutations affectant ce site s'expriment plus bruyamment que celles affectant le second domaine d'intérêt. Ce site porte de plus, un « cou » pour la transmission de l'énergie et la fixation des chaînes légères.
2. Le domaine de queue, constitué d'une longue hélice alpha, nécessaire pour la dimérisation des NMMHC-IIA. Cette partie comporte également une partie C-terminale non hélicoïdale.

Il est ainsi observé, qu'en cas de mutations du domaine tête, une perte de la capacité à générer l'énergie par défaut d'hydrolyse de l'ATP ce qui s'exprime par une atteinte sévère des principaux organes, comme décrit dans le paragraphe précédent. Alors qu'en cas de mutations dans le domaine de queue, les conséquences sont moins importantes et les patients ne présentent généralement qu'une macrothrombopénie modérée.

Ces chaînes se dimérisent, via leurs sites hélicoïdaux, afin de former un ensemble d'une trentaine de molécules. Leur activation/inhibition passe par un mécanisme de phosphorylation des chaînes légères de régulation, induisant un changement de conformation de NMMHC-IIA. En effet en cas de non phosphorylation, il y a interaction entre le domaine de queue et le domaine de tête ce qui conduit à une forme compacte empêchant tout assemblage. En cas de phosphorylation, il y a rupture de cette interaction et ainsi mise en place d'une forme détendue autorisant la polymérisation en filaments bipolaires [84].

La distribution des différentes isoformes diffère selon les cellules. La plupart possèdent deux ou trois types différents mais certaines d'entre-elles n'en possèdent qu'un seul type. C'est le

cas de cellules hématopoïétiques granulocytaires et mégacaryocytaires qui ne contiennent que NMMHC-IIA. Les cellules érythrocytaires et lymphocytes ainsi que monocytaires possèdent NMMHC-IIA et IIB [84].

Il est ainsi possible d'expliquer la symptomatologie hématologique. Il est connu qu'au cours de la mégacaryopoïèse les MK migrent vers différentes niches, où au niveau de certaines, l'interaction avec le collagène de type I inhibe la libération prématurée des proplaquettes. Ceci permettant d'assurer la libération au bon endroit et au bon moment. Cette liaison au collagène de type I va induire l'activation d'une protéine kinase, phosphorylant les RLC et ainsi provoquant le changement de conformation de NMMHC-IIA. Ceci conduit à l'inhibition de la libération des proplaquettes. Mais en cas de mutations, il y a libération de celles-ci même en présence de collagène de type I. nous assistons donc à une libération ectopique anormale de plaquettes au niveau médullaire. En résulte une production inefficace de plaquettes et ainsi une thrombopénie.

La macrocytose peut s'expliquer par la présence de MK présentant des bleb de taille anormalement grande et en nombre anormalement diminué. Il n'y a donc pas d'atteinte de la maturation ni de la différenciation mégacaryocytaire, mais une anomalie au niveau de la phase tardive de la formation plaquettaire [84].

Concernant les atteintes organiques, la physiopathologie du développement de la cataracte n'est pas connue. Néanmoins des hypothèses sont avancées afin d'expliquer la symptomatologie rénale et auditive.

En effet au niveau du rein, NMMHC-IIA est exprimée dans les cellules glomérulaires. A ce niveau son rôle est de permettre l'adhésion des cellules entre-elles. Ainsi une mutation provoque une désorganisation de ces cellules et l'apparition d'une protéinurie de type glomérulaire. Cette anomalie va conduire dans la très grande majorité des cas à une insuffisance rénale terminale [84].

Au niveau auditif, NMMHC-IIA est retrouvée dans le système cochléaire et principalement dans l'organe de Corti. Une mutation induirait ainsi une désorganisation de la structure des cellules cillées et ainsi l'apparition d'une surdité [84].

Afin d'expliquer le fait que les atteintes organiques ne se limitent qu'à certains tissus, l'hypothèse la plus probable est que les chaînes NMMHC-IIB et IIC auraient un rôle compensateur quand associées à une NMMHC-IIA non fonctionnelle.

Prise en charge thérapeutique

La tendance hémorragique est l'élément primordial de cette prise en charge. En effet il est conseillé aux patients d'éviter toute prise médicamenteuse pouvant interférer avec les fonctions plaquettaires (type AINS, ...). Une bonne hygiène dentaire est également souhaitable [84].

Aucune transfusion plaquettaire n'apparaît nécessaire, du fait de l'absence de thrombopathie associée, et leurs seules indications restent celles de la population générale qui se basent sur la numération plaquettaire.

De récentes études, portant sur l'eltrombopag, suggèrent un effet bénéfique chez les patients, qui remonteraient ainsi leur numération plaquettaire en quelques semaines [84]. Une discussion sur cette thérapeutique fera l'objet d'un paragraphe particulier.

Concernant les atteintes organiques précédemment décrites, la prise en charge de la surdité ne pourrait se faire que par des implants cochléaires, néanmoins aucun cas n'a été rapporté dans la littérature. Il est conseillé aux patients de limiter, autant que possible, les traitements

ototoxiques (certains antibiotiques, ...). De même pour les atteintes rénales, la prise de thérapeutiques ayant un impact sur les fonctions rénales est à limiter (produits de contraste iodés, antibiotiques...). Le recours à la dialyse et à la transplantation sont les seules possibilités en cas d'insuffisance rénale terminale [84].

Il apparaît donc évident que les patients diagnostiqués atteints du syndrome MYH9, doivent bénéficier d'une surveillance rapprochée à la recherche de ces diverses complications.

1.4.2 Syndrome de Bernard-Soulier variant biallélique

Présentation clinique

Ce syndrome a été décrit pour la première fois en 1948 par Jean Bernard et Jean-Pierre Soulier. Il a été une des premières formes de thrombopénies décrite. Il fait partie des formes non syndromiques de TC même si la symptomatologie hémorragique est très importante. En effet, nous verrons qu'une thrombopathie s'associe à la macrothrombopénie observée [86]

Présentation biologique

Le frottis sanguin permet d'apprécier une des caractéristiques du syndrome de Bernard-Soulier (BSS) à savoir une dystrophie plaquettaire avec présence de plaquettes géantes. En microscopie électronique, certains auteurs rapportent également la présence de vacuoles cytoplasmique au niveau plaquettaire [87].

De plus les tests d'agrégation *in vitro* mettent en évidence des capacités de réponse très diminuées [8] ce qui se traduit par une diathèse hémorragique sévère.

Du fait de cette thrombopathie, le myélogramme n'est que très exceptionnellement réalisé. De plus il n'apporte pas d'éléments spécifiques au diagnostic et s'avère donc très peu contributif. Néanmoins dans le cas où ce dernier est réalisé, le frottis présente des MK très légèrement augmentés de taille ainsi qu'un aspect vacuolé pour certains d'entre eux [86].

Présentation génétique

Le BSS est de transmission autosomale récessive. Il est lié à une mutation d'un ou plusieurs gènes parmi *GP1BA*, *GP1BB* et *GP9* [8].

Contrairement aux mutations en causes dans le syndrome de Bernard-Soulier monoallélique, il faut ici un état homozygote pour que les mutations puissent s'exprimer.

Tout comme décrit dans ce précédemment syndrome, les gènes en causes codent respectivement pour GPIb α , GPIb β et GPIX, éléments du complexe récepteur GPIb/IX/V essentiel à l'hémostase primaire.

Physiopathologie

Concernant l'aspect hémorragique, celui-ci a été abordé dans le paragraphe du BSSm et a donc également pour origine l'absence du récepteur plaquettaire GPIb/IX/V. Les anomalies retrouvées sont à la fois quantitatives et qualitatives. Ce dernier assurant la fixation au vWF endothélial lors d'une brèche vasculaire, les plaquettes ne peuvent donc plus assurer leur rôle primordial d'hémostase primaire. Contrairement au variant monoallélique, le BSS biallélique présente une absence quasi-totale du récepteur, expliquant les saignements sévères.

La cause exacte de la macrothrombopénie n'est quant à elle pas encore clairement comprise. Les hypothèses physiopathologiques sont identiques à celles décrites pour le variant monoallélique. En effet un défaut d'interaction entre le cytosquelette et le récepteur GPIb/IX/V serait une des causes d'anomalie de formation des proplaquettes [86].

Néanmoins la différence entre ces deux pathologies, sur le plan hémorragique est bien comprise et liée à la persistance d'un allèle sain, mais sur le plan cytologique, la présence de plaquettes géantes en cas de mutation homozygote reste à approfondir.

1.4.3 Macrothrombopénie liée à PRKACG

Présentation clinique

La macrothrombopénie liée à *PRKACG* n'a été que très récemment décrite, et actuellement retrouvée dans qu'une famille consanguine [88]. Elle fait partie, *a priori*, du groupe des TC non syndromiques. En effet les patients atteints ne présentent pas d'autres signes en dehors de la symptomatologie hémorragique. Cette dernière se caractérise par des épistaxis, une susceptibilité aux hématomes ainsi qu'aux ménorragies [89].

Présentation biologique

Cette pathologie se caractérise sur le frottis sanguin par une macrocytose pour laquelle il a été décrit 90% de macroplaquettes dont des plaquettes géantes. De plus la thrombopénie est sévère, de l'ordre de 5-10 G/L [88].

L'étude médullaire retrouve la présence inhabituelle de MK organisés en cluster mais sans anomalie de différenciation ni de ploïdie [88].

Cette macrothrombopénie est également associée à une thrombopathie. En effet il est montré une altération de l'activation plaquettaire, par un défaut de mobilisation du calcium et une altération des récepteurs GPIb.

Présentation génétique

Cette pathologie est de transmission autosomale récessive et liée à la mutation du gène *PRKACG* porté par le chromosome 9q13 [90]. Ce dernier code pour l'isoforme γ de la sous-unité catalytique ($C\gamma$) de la Protéine Kinase A (PKA) [88].

Physiopathologie

PKA est une enzyme composée de deux sous-unités catalytiques et de deux sous-unités de régulation. Pour chacune de deux il existe différentes isoformes : [89]

- Trois isoformes catalytiques : $C\alpha$, $C\beta$ et $C\gamma$. Au niveau plaquettaire il est retrouvé deux fois moins de $C\gamma$ que des deux autres.
- Quatre isoformes de régulation : $RI\alpha$, $RI\beta$ et $RII\alpha$, $RII\beta$.

En fonctionnement normal, l'AMPc (Adénosine MonoPhosphate cyclique), régulée au niveau plaquettaire par le système des récepteurs aux protéines G, se fixe aux sous-unités de régulation provoquant ainsi la dissociation de celles catalytiques. De ce fait, elles vont pouvoir exercer leur activité de phosphorylation de leur substrat [88]. Un défaut de ce mécanisme de phosphorylation va provoquer une accumulation d'AMPc intracytoplasmique et ainsi altérer les fonctions plaquettaires.

Il a été découvert différents substrats, qu'il est possible de différencier en deux groupes : [88]

1. Un premier groupe composé de protéines régulatrices de signaux, comme par exemple GPIb β ...
2. Un second composé de protéines de liaison à l'actine, comme par exemple VASP ou FLNa...

Ce sont ces deux protéines, GPIb β et FLNa, qui interviennent davantage dans la physiopathologie de cette TC. En effet il est retrouvé chez les patients, un taux réduit de

FLNa, probablement lié à un défaut de phosphorylation par PKA. Ceci est observé tant au niveau plaquettaire que mégacaryocytaire.

FLNa n'étant plus phosphorylée, elle n'est plus protégée de la protéolyse et provoque ainsi une thrombopénie par désorganisation du cytosquelette. En effet il a été décrit précédemment, dans le cadre des filamopathies, qu'un défaut au niveau de FLNa induisait un désordre de formation des proplaquettes par anomalie de réorganisation du cytosquelette [88].

Il a également déjà été démontré que le récepteur au vWF, GPIb-IX-V, nécessite l'interaction avec FLNa afin de permettre son ancrage à la membrane cytoplasmique et assurant ainsi sa stabilité. Il est donc normal d'observer chez ces patients un désordre au niveau du cytosquelette, participant à la thrombopénie ainsi qu'à la thrombopathie par défaut de GPIb-IX-V [88].

Enfin, cette thrombopathie s'explique également par un défaut de mobilisation du calcium intracellulaire lors d'une stimulation plaquettaire.

Cette nouvelle forme de TC se caractérise donc par un nouveau mécanisme physiopathologique conduisant à une dysfonction plaquettaire : l'augmentation du taux d'AMPc [90].

2 PURPURA THROMBOPENIQUE IMMUNOLOGIQUE

La difficulté majeure de cette thématique plaquettaire est de pouvoir distinguer le PTI des TC, ce qui est d'autant plus difficile avec les formes non syndromiques. L'ensemble des algorithmes et des publications actuellement disponibles, montrent la grande difficulté de ce diagnostic différentiel. De plus que très peu de données bibliographiques, concernant le diagnostic du PTI, ne suggère la recherche et l'élimination d'une cause constitutionnelle de la thrombopénie. Bien qu'un diagnostic d'exclusion, seule quelques publications signalent la possibilité d'une TC. Le guide de la HAS [91], publié en 2009 sur le PTI, indique la nécessité d'éliminer une TC avant d'envisager un PTI chez l'enfant. Dans ce contexte il est rappelé l'importance de l'analyse du frottis sanguin, pouvant quelque fois orienter la décision clinique et il est également rappelé l'importance de l'analyse de l'histoire familiale, que ce soit concernant les antécédents hémorragiques et/ou thrombopéniques.

Présentation clinique

Le PTI se définit par l'existence d'une thrombopénie isolée inférieure à 150 G/L sans contexte évocateur. De plus elle est associée ou non à une symptomatologie hémorragique. L'incidence estimée en 2009 était de 1.6 cas pour 100 000 adultes par an avec un sexe ratio à prédominance féminine de 1.3 [91]. L'âge n'apparaît pas comme un facteur favorisant. Néanmoins les enfants atteints de PTI guérissent dans plus 80 % des cas alors que chez les adultes, l'évolution conduit chez 70 % d'entre eux à la chronicité. L'histoire de la maladie peut se différencier en trois phases : [92]

1. PTI aiguë, nouvellement diagnostiqué. Cette phase dure moins de trois mois.
2. PTI persistant moins de 12 mois, pendant lesquels la maladie peut varier et même présenter une rémission mais sans que celle-ci n'informe sur l'évolution à plus long terme.
3. PTI chronique évoluant sur plus de 12 mois. Ces formes présentent une probabilité de rémission spontanée très faible.

Présentation biologique

Sur le plan du diagnostic biologique, outre la thrombopénie isolée, il existe des analyses permettant de rechercher la présence des anticorps anti-plaquettes pathogènes. Néanmoins ces tests ne présentent en réalité que peu d'intérêt car souffrent d'une mauvaise spécificité. En effet les anticorps en cause dans le PTI présentent une très large hétérogénéité de spécificité, et il n'est pas possible de détecter l'ensemble du répertoire d'anticorps avec les kits commerciaux. De ce fait ils sont très peu utilisés en routine [93].

L'étude du frottis médullaire n'est pas recommandée pour l'ensemble des patients. Les dernières recommandations de l'*American Society of Hematology* suggèrent en effet que le myélogramme n'est pas nécessaire chez des enfants ayant des signes typiques de PTI ainsi qu'initialement chez ceux qui bénéficient d'une thérapeutique par corticostéroïdes ou splénectomie [94].

Ainsi l'examen physique ainsi que la revue du frottis sanguin sont des éléments clé du diagnostic du PTI.

Présentation génétique

Il ne s'agit pas d'une pathologie génétique et les formes familiales sont exceptionnellement décrites. Ainsi aucune mutation n'est décrite dans ce cadre [91].

Physiopathologie

Le PTI est une pathologie auto-immune caractérisée par une destruction immunitaire des plaquettes. Le stimulus initial reste encore inconnu pour les formes primaires de PTI alors qu'il a été montré des formes secondaires. Ces dernières peuvent être dues à différents agents, infectieux, immuns ou encore exogènes : [93][94]

- Désordres auto-immuns comme le syndrome des anti-phospholipides.
- Infections virales comme le VIH, l'hépatite C ou encore le cytomégalovirus...
- Des médicaments comme par exemple les anti-inflammatoires non stéroïdiens, certains antibiotiques...
- Des hémopathies malignes à type de lymphomes.

Cette thrombopénie est ainsi due à la présence d'auto-anticorps antiplaquettaires provoquant la destruction périphérique des plaquettes. Celle-ci est réalisée par les phagocytes mononuclées et ce principalement au niveau splénique. Certaines publications rapportent également l'implication d'un défaut de production médullaire.

3 DEMARCHE DIAGNOSTIQUE

Lors de la découverte d'une thrombopénie, plusieurs éléments sont à prendre en compte initialement. En effet il est dans un premier temps nécessaire de s'assurer de la réalité de la cytopénie et d'éliminer des erreurs potentielles du laboratoire (amas plaquettaires liés à l'EDTA, fibrine, identité...). Les différentes autres étiologies conduisant à une pseudo-thrombopénie ne seront pas évoquées dans cette thèse [9][95]. Nous allons, dans ce travail, nous placer dans le cas de conditions pré-analytiques optimales et en dehors de tout phénomène extra-hématologique pouvant conduire à une fausse thrombopénie.

Bien que les connaissances sur la caractérisation de ces pathologies aient énormément évoluées durant la dernière décennie, la prévalence des TC reste probablement sous-évaluée [7]. En effet, même avec les avancées technologiques nous ayant permis de mieux définir génétiquement et phénotypiquement ces entités, elles restent difficiles à mettre en évidence. La difficulté majeure est d'en faire le diagnostic différentiel avec un purpura thrombopénique immunologique (PTI). Un consensus international a récemment été publié afin d'étayer le diagnostic du PTI [96] mais celui-ci relègue les TC loin dans la liste des différentes étiologies possibles de thrombopénie. Il rapporte également qu'une TC doit être envisagée devant une thrombopénie persistante après traitement et dans les cas présentant des antécédents familiaux de thrombopénie ou de signes hémorragiques.

Une récente méta-analyse des diverses publications sur les TC montre de nombreux cas de patients initialement diagnostiqués PTI, atteints de formes constitutionnelles. Leur incidence est difficilement évaluable mais selon les publications il serait possible de l'estimer jusqu'à 5% des PTI. Parmi eux, même si la splénectomie est référencée comme deuxième ligne de traitement du PTI [96], plus de la moitié ont subi une telle ablation, inutile dans la prise en charge de leur réelle pathologie [2][97].

Nous allons essayer, dans les paragraphes suivants, de détailler la démarche diagnostique qui permet d'aboutir à la mise en évidence d'une TC, à travers les différents aspects cliniques et biologiques.

En effet la démarche à suivre peut être divisée en deux grandes phases : [7]

1. La première étape devant un patient présentant une thrombopénie, est d'établir s'il est ou non susceptible d'être atteint d'une TC. Il est donc nécessaire **d'identifier les patients thrombopéniques ayant une cause génétique.**
2. La seconde étape consiste à la réalisation de diverses examens et analyses dans le but d'établir de quelle entité de TC il s'agit. Le but est ainsi de réaliser un **diagnostic différentiel** parmi l'ensemble du groupe de ces pathologies.

Afin de satisfaire ces deux grandes étapes nous aborderons au travers de ce chapitre les différents points clés à savoir : [7][98]

- Les antécédents médicaux personnels et familiaux
- Un examen physique approfondi
- Une étude du frottis sanguin
- Des examens biologiques plus spécialisés

3.1 Clinique

Il est primordial dans un premier temps d'identifier les patients susceptibles de présenter une forme génétique de thrombopénie. Pour ce faire l'examen et l'interrogatoire clinique sont essentiels.

3.1.1 Histoire médicale personnelle et familiale

Il est important de se concentrer initialement sur les antécédents médicaux du patient ainsi que de sa famille à la recherche d'une symptomatologie hémorragique et/ou thrombopénique connue. De même le développement d'une hémopathie maligne dans l'entourage du patient peut contribuer au diagnostic. Nous avons en effet présenté différentes pathologies induisant un risque accru de développement d'une hémopathie, comme FPD/AML...

Afin de faciliter la recherche d'une histoire personnelle et familiale, il existe des outils d'évaluation du saignement. Certains axés uniquement sur certaines pathologies comme la maladie de Willebrand ou l'hémophilie, l'*International Society on Thrombosis and Haemostasis* (ISTH) a édité un *Bleeding Assessment Tool* (BAT), questionnaire orienté vers les pathologies plaquettaires héréditaires [99][100].

D'autres tableaux simplifiés permettent de différencier les causes génétiques de causes acquises [95] :

Tableau II : Eléments sémiologiques de différences entre PTI et TC.

Source : Drachman [95]

Signes hémorragiques	Etiologie immune	Etiologie constitutionnelle
Point de départ de la symptomatologie hémorragique ? (saignements, ecchymoses, ...)	Récente	Depuis la naissance
Prise de nouveaux médicaments ou changements de l'état de santé général ?	OUI	NON
Présence de signes hémorragiques excessifs après traumatismes mineurs, actes chirurgicaux, menstruations, ... ?	NON	OUI
Histoire familiale de thrombopénie ou de symptomatologie hémorragique ?	NON	OUI
Présence d'une numération plaquettaire antérieure dans les valeurs de référence ?	OUI	NON
Quel type de réponse aux traitements du PTI ? (corticoïdes, immunoglobulines, ...)	Augmentation numération plaquettaire importante	Sans effet (où augmentation minimale de la numération plaquettaire)
Efficacité de transfusions plaquettaires ?	Faible	Bonne

Ces exemples de questionnaires, permettent au clinicien d'orienter son diagnostic vers une étiologie immune ou constitutionnelle.

En effet, dans les cas non syndromiques et avec une symptomatologie hémorragique modérée, les signes cliniques ne peuvent apparaître qu'en cas de chirurgie, extraction dentaire ou encore après prise médicamenteuse.

Afin d'étoffer ces arguments, il faut s'appuyer sur d'autres données de l'histoire du patient. L'âge ne doit pas être un facteur influençant directement vers l'une ou l'autre des étiologies. En effet, même si pour les formes associées à une thrombopathie et/ou à des saignements importants le diagnostic est précoce dans l'enfance, car faciles à mettre en évidence à un âge

où les blessures sont fréquentes, elles peuvent être découvertes à l'âge adulte car évoluant à bas bruit. Pour les formes non syndromiques de TC, la pathologie peut rester non précisément diagnostiquée jusqu'à l'âge adulte, comme par exemple le syndrome MYH9, la thrombopénie liée à la mutation *ANKRD26*, *FPD/AML*,...[7]

La notion d'antécédent de numération plaquettaire normale est un argument fort en faveur d'une étiologie immune. Néanmoins pour de nombreux patients cette donnée n'est pas connue et il est nécessaire de rechercher d'autres signes clinico- biologiques.

Concernant l'histoire familiale, même si très évocatrice d'une origine constitutionnelle en cas de positivité, son absence ne permet cependant pas d'exclure une origine héréditaire. En effet, nous avons décrit dans certaines pathologies, une importante proportion de cas sporadiques, c'est-à-dire de mutations *de novo*, comme c'est le cas pour environ 40% des patients souffrant du syndrome MYH9.

Néanmoins dans l'ensemble des cas, il est nécessaire de rechercher dans la famille la présence de signes cliniques, car ces pathologies peuvent présenter une variabilité interindividuelle importante et ainsi ne s'exprimer cliniquement que chez certains individus [7].

En dehors de ces signes en lien avec le désordre plaquettaire, l'apparition et/ou les antécédents d'hémopathie maligne, quel qu'en soit le type, peuvent être un argument supplémentaire. En effet, les patients atteints de *FPD/AML* présentent une propension à développer dans 40% des cas une leucémie aiguë ou un syndrome myélodysplasique. Cette probabilité est de l'ordre de 10% en cas de mutation *ANKRD26*. Quant à la mutation *ETV6*, il est davantage décrit le développement de néoplasies lymphoïdes et myéloïdes [54][55].

3.1.2 Examen physique approfondi

L'examen physique du patient lui-même peut s'avérer très utile afin de mettre en évidence les anomalies associées à la thrombopénie. Ceci principalement pour les formes syndromiques de TC, pour lesquelles il est parfois suffisant pour orienter le diagnostic.

Pour exemple le syndrome TAR est mis en évidence par une anomalie morphologique squelettique avec une aplasie du radius bilatérale. Néanmoins pour d'autres formes syndromiques, l'examen clinique doit être davantage ciblé et approfondi afin de mettre en évidence des anomalies moins évidentes. Pour exemple le syndrome CTRUS qui se caractérise par une synostose radio-cubitale, ne peut se détecter (en dehors de clichés radiographiques) que par l'observation d'une limitation dans la pronation et la supination [7].

Cependant certaines formes de TC peuvent être toutefois suspectées via des examens supplémentaires. En effet, un audiogramme où un bilan ophtalmique pourraient mettre en évidence des anomalies associées au syndrome MYH9, de même qu'une analyse des protéines urinaires mettant en évidence une protéinurie de type glomérulaire laisserait suspecter une atteinte rénale de ce même syndrome [98].

Ainsi un examen clinique bien conduit, et quelque peu dirigé vers les principaux signes de TC, associé à certains examens complémentaires permettraient au clinicien d'envisager la présence d'une pathologie plaquettaire de type génétique.

Comme nous allons le voir dans le paragraphe suivant, d'autres éléments, plus ou moins faciles d'accès, peuvent permettre d'étayer le faisceau d'arguments en faveur d'une TC et ainsi, *in fine* aboutir à un diagnostic.

3.2 Biologique

Afin d'étayer davantage les soupçons de l'interrogatoire clinique et/ou pour confirmer le diagnostic de TC, certains examens de biologie médicale sont essentiels.

En effet, en sus de la méconnaissance de ces pathologies rares, la nécessité de faire appel à un centre équipé de technologies et de compétences spécialisées pour leur recherche contribue à leur sous-diagnostic [101]. C'est pourquoi nous allons détailler les différentes étapes qui conduisent au diagnostic de certitude, via des analyses de première ligne disponibles dans tout laboratoire de biologie médicale. Nous avons choisi, là encore, de présenter les différentes données dans l'ordre chronologique de la prise en charge du patient au laboratoire.

Dans un premier temps, nous allons étudier les paramètres automatisés disponibles avec les résultats de la NFS, puis l'étude du frottis sanguin pour finalement aboutir aux analyses spécialisées de deuxième ligne.

3.2.1 Automate XN SYSMEX®

Les hématimètres, appareils automatisés pour la réalisation de la numération et formule sanguine, constituent un moyen rapide et facile d'obtenir des informations sur les différentes lignées cellulaires. Différentes technologies portant sur l'étude des plaquettes existent selon les fabricants [102].

Dans notre étude nous nous intéresserons plus particulièrement à l'automate XN9000 de la société SYSMEX®. Nous allons développer les différents paramètres plaquettaires généraux et de recherches, disponibles sur cette nouvelle génération d'appareils de routine. Ces indices plaquettaires sont directement disponibles et n'engendrent, dans la majorité des cas, aucun coût supplémentaire que ce soit au niveau réactif que temps technique. En effet ils sont obtenus lors du même passage de l'échantillon biologique dans le système analytique que pour la NFS. Exception faite de l'utilisation d'un canal particulier du XN que nous allons définir.

Les tentatives de recours aux données automatisées des hématimètres sont très intéressantes et en plein développement, principalement du fait que l'analyse manuelle des frottis sanguins est très chronophage. Et ce d'autant plus en cas de thrombopénie, où l'analyse d'un nombre significatif de plaquettes est manuellement difficile. Ces paramètres automatisés pourraient être davantage utilisés afin de caractériser la morphologie plaquettaire (dont des paramètres de recherche qui seront utilisés au cours de ce travail) d'autant plus qu'ils permettent de surseoir à la variabilité inter-opérateur. Cette dernière est un inconvénient majeur de la lecture manuelle et de la classification des plaquettes dans les différents groupes de tailles que nous allons décrire dans le paragraphe dédié à l'étude du frottis sanguin [5].

3.2.1.a Principes de l'hématimètre XN SYSMEX®

La technique de référence pour la numération plaquettaire fût pendant longtemps la lecture manuelle en contraste de phase. Elle a été désignée comme telle en 1988. C'est une technique qui a l'avantage d'être simple d'application, peu coûteuse mais qui nécessite un temps de lecture long ainsi qu'une solide expérience afin d'obtenir des résultats relativement fiables. En effet les coefficients de variations retrouvés en techniques manuelles sont de l'ordre de 15 à 25%. Ce n'est qu'avec l'apparition de l'automatisation dans les années 1970 que la précision s'est grandement améliorée, évoluant encore au fil des générations d'automates, atteignant aujourd'hui des CV de l'ordre de 3 à 5 %. Cette quête de précision ayant pour principal intérêt une meilleure gestion des transfusions plaquettaires [103].

Impédance

C'est en 1953 que Wallace Coulter a découvert le principe du comptage par impédance. Il est basé sur le fait que les cellules sont des particules ne conduisant pas le courant électrique mais possédant une résistance.

Ces cellules passent individuellement entre deux électrodes et la variation d'impédance produite à chaque passage est proportionnelle au volume de la cellule. De ce fait il est possible de déterminer le nombre d'évènements passant au travers de la cellule de mesure, correspondant à la numération cellulaire, mais également le volume de chaque évènement. L'ensemble de ces données se traduit par une courbe d'impédance. A partir de cette dernière il est possible de déterminer différents indices volumétriques plaquettaires, que nous détaillerons dans un prochain paragraphe.

Néanmoins, d'un point de vue technologique, cette méthode présente deux principaux inconvénients.

Le premier est la difficulté à distinguer les plaquettes des hématies. Initialement ces méthodes automatisées étaient utilisées avec des plasmas riches en plaquettes (PRP) afin d'éliminer au mieux les globules rouges. Ces PRP sont obtenus par récupération de la phase enrichie en plaquettes après centrifugation d'un sang anticoagulé. Cette technique, éliminant au mieux les hématies, manque cependant de sensibilité du fait de l'impossibilité de récupérer l'intégralité des plaquettes [103].

Le second problème rencontré est la possibilité d'un passage simultané de plusieurs éléments au travers de la cellule de mesure. Ce phénomène est appelé coïncidence. De par cette interférence, résulte une erreur dans la numération, qui sera alors sous-estimée. De même les mesures volumétriques vont être impactées et seront alors surestimées.

Le schéma ci-dessous illustre les différentes possibilités d'interférences.

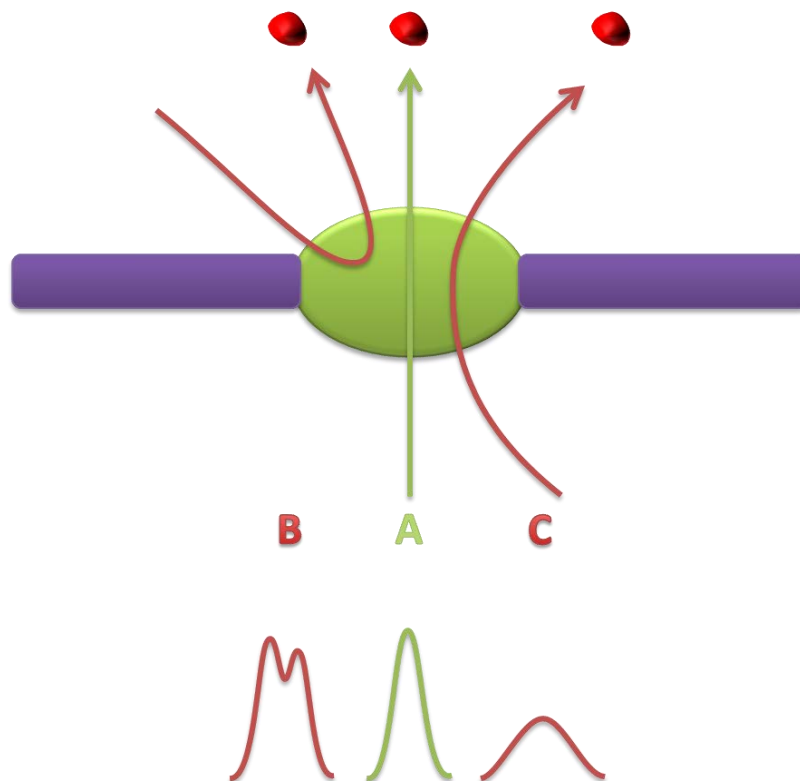


Figure 11 : Schéma illustrant les phénomènes parasites du comptage par impédance en absence de focalisation hydrodynamique.

A : trajectoire idéale de passage. B : trajectoire illustrant le repassage d'une cellule au niveau du capteur. C : trajectoire d'un passage en coïncidence de deux cellules simultanée au niveau du capteur.

La trajectoire A représente le passage idéal d'une cellule au travers de la chambre de mesure, donnant lieu à un histogramme parfaitement interprétable. Les trajectoires B et C représentent des phénomènes parasites. Le premier est dû au « repassage » d'une cellule en aval de la cellule de mesure. Cette cellule étant comptée à deux reprises, un double pic est observé sur le graphe correspondant. La dernière trajectoire schématise le passage en coïncidence de deux éléments cellulaires, se traduisant sur le graphique par un étalement de la courbe, aboutissant ainsi à une mesure faussée du volume.

Afin de corriger ces interférences, il a dans un premier temps été élaboré un modèle mathématique permettant de prédire la probabilité d'apparition du phénomène de coïncidence. Les automates intègrent ainsi dans leur logiciel cette correction automatique permettant d'assurer un comptage le plus précis possible [103]. Dans un second temps s'est également développée une technologie de focalisation hydrodynamique permettant de garantir le passage unitaire des éléments dans la chambre de mesure.

Le XN SYSMEX® est ainsi équipé d'une focalisation hydrodynamique avec double manchonnage [104].

Cette focalisation hydrodynamique est assurée par un fluide de gainage, qui permet d'assurer une trajectoire parfaitement centrée dans la cellule ainsi qu'un passage individuel des cellules, évitant tout phénomène parasite. Ce fluide, représenté en traits bleus sur le schéma ci-dessous, assure un courant permettant de guider et d'aligner les cellules les unes derrière les autres en amont de la zone de mesure. En aval de cette dernière, le courant de guidage permet d'éviter le passage multiple des éléments (trajectoire B figure 11).

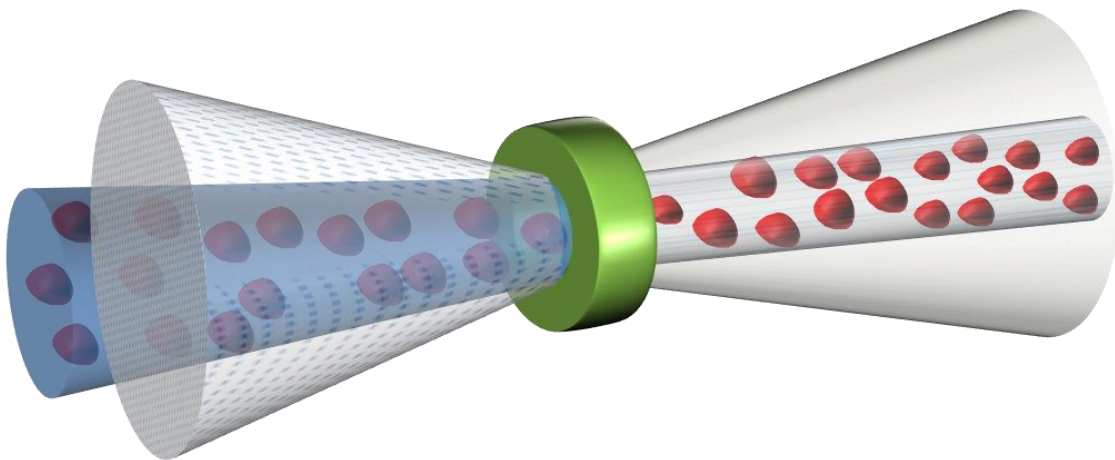


Figure 12 : Technologie de focalisation hydrodynamique par double manchonnage. XN SYSMEX®.

Cette technique permet ainsi d'obtenir une excellente sensibilité et linéarité. Les variations d'impédance observées au fur et à mesure du passage des cellules se traduisent sur une courbe de distribution, visible sur un histogramme comme représenté sur la figure 13.

Du graphique de ce canal impédance, plusieurs paramètres sont disponibles :

- La numération plaquettaire en impédance : PLT-I
- Le volume plaquettaire moyen : VPM
- L'indice de dispersion plaquettaire : IDP ou PDW
- Le plaquettocrite : PCT
- Le pourcentage de grandes plaquettes : P-LCR ou PRGC
- Le volume plaquettaire le plus fréquent : P-MFV

Pour assurer la distinction des hématies et des plaquettes sur ce canal, les automates utilisent un seuil de taille. Selon les fournisseurs, la plage de mesure volumétrique est différente, expliquant les différences observées entre les hématimètres concernant les indices plaquettaires. Pour exemple, le LH750 de BECKMAN COULTER® détermine les événements comme étant des plaquettes entre 2 et 20 fL alors que l'ADVIA2120 de SIEMENS® utilise l'intervalle 0 à 30 fL [9].

Le XN SYSMEX®, quant à lui, utilise une plage allant de 2 à 40 fL mais cette dernière a la particularité d'être mobile. En effet elle s'adapte, par le biais de deux discriminateurs, au profil du patient. Ceci permet une meilleure distinction entre les hématies et les plaquettes, principalement en cas de microcytose érythrocytaire.

Sur ce canal il existe trois seuils différents :

1. Un **discriminateur bas** (PL), variant entre 2 et 6 fL, permet d'éviter la sélection de débris cellulaires ou bruit de fond. Ce seuil minimal, mobile, s'adapte ainsi selon les patients et selon la taille des éléments mesurés.
2. Un **seuil fixe à 12 fL**, qui définit le pourcentage de grandes plaquettes (P-LCR ou PRGC) par le calcul du rapport entre le nombre d'évènements associés à une taille supérieure à 12 fL et le nombre total de plaquettes. C'est la fraction de plaquettes de grandes tailles.
3. Un **discriminateur haut** (PU), variant entre 12 et 40 fL, permet de définir le seuil maximal au-delà duquel les évènements détectés ne seront plus associés à la numération plaquettaire.

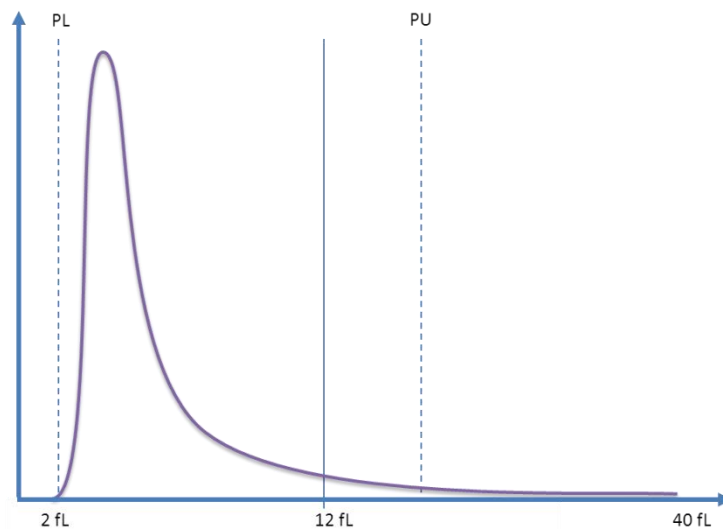


Figure 13 : Courbe de distribution plaquettaire obtenue par le canal impédance du XN SYSMEX®.
PL : discriminateur bas. PU : discriminateur haut.

Les technologies mises en place sur ce canal impédance sont identiques, que ce soit pour la numération des plaquettes, ou pour la numération des hématies. Il ne présente également aucune modification par rapport à celui présent sur la génération précédente d'automates, le XE SYSMEX® [105].

Néanmoins, malgré l'ensemble de ces technologies essayant de parvenir à une numération précise, sensible et spécifique, l'impédance présente encore des limites, imputables à la technique elle-même.

La cellule de mesure ne pouvant distinguer les éléments que par leur taille, il n'est techniquement pas possible de différencier une plaquette d'un débris cellulaire faisant la

même taille. De même cette technologie n'est pas capable de séparer les populations en cas de microcytose érythrocytaire associée à des plaquettes de grande taille. Ces macroplaquettes se situant dans la zone de comptage des globules rouges, elles interfèrent dans la séparation de ces deux populations.

La présence de bactéries, de fragments de globules blancs (observés au cours de chimiothérapies ou des fragments de blastes), d'agrégats plaquettaires, de fragments d'hématies, ... interfèrent aussi avec la numération plaquettaire par impédance [106].

L'automate est tout même capable d'avertir l'utilisateur d'une anomalie concernant la numération des plaquettes, via une alarme « Distribution plaquettaire anormale ». Ceci est en lien avec la violation de règles de validation de la courbe de distribution plaquettaire : [107]

- La courbe ne revient pas à la ligne de base au niveau du discriminateur bas, traduisant la présence possible de débris cellulaires ou d'un bruit de fond trop important.
- La courbe de revient pas à la ligne de base au niveau du discriminateur haut, traduisant par exemple la présence de plaquettes de grande taille ou de microcytes.
- Une fraction de grandes plaquettes supérieure à 43 %.

La présence de ce type d'alarme provoque l'impossibilité d'interpréter la courbe de distribution plaquettaire et ainsi l'impossibilité de rendre une numération et des indices plaquettaires. Ceci nécessite un contrôle, soit par méthode manuelle, soit par un autre canal de l'automate.

Optique

Cette gestion des différents canaux disponibles est assurée par un algorithme complexe et interne à l'hématimètre. Néanmoins le recours à une autre technique de numération ne donne pas systématiquement de meilleurs résultats. En effet certains auteurs ont comparés les valeurs obtenues en impédance et en optique par rapport à la méthode de référence actuelle, à savoir la cytométrie en flux avec marquage CD41/CD61. Il apparaît dans leurs résultats que c'est l'algorithme de choix automatique du canal (entre impédance et optique) qui donne les meilleurs résultats par rapport à la cytométrie plutôt que le recours systématique à l'optique [106][108].

Cette mesure optique des paramètres plaquettaires n'est disponible que sur le canal RET de l'automate XN SYSMEX®. C'est un canal initialement mis en place afin de dénombrer les réticulocytes. Ceci implique qu'il est nécessaire d'acquérir l'option RET sur le module XN pour bénéficier de cette technologie. Contrairement au canal impédance, il n'est en effet pas systématiquement installé sur l'ensemble des modules XN.

Cependant ce module est resté identique à celui disponible sur l'ancienne génération d'automates, SYSMEX® XE et XT [109].

Cette technologie est basée sur un principe de fluorocytométrie, où les éléments plaquettaires sont marqués spécifiquement par un fluorochrome.

Ce développement n'a pu être possible qu'avec l'avènement de la cytométrie en flux et l'analyse des scattergrammes. Grâce à cette technique, il est possible d'identifier les plaquettes (où l'élément qui nous intéresse) par sa taille et son index de réfraction.

De manière plus pratique, la cellule à identifier passe de manière unitaire devant un faisceau laser et l'automate analyse la lumière par différents angles. Initialement l'analyse cellulaire était bidimensionnelle :

1. La lumière transmise au petit angle FSC (*Forward Scattered light*) correspond au rayon lumineux traversant l'élément cellulaire. Il renseigne sur la taille cellulaire.
2. La lumière diffractée au grand angle SSC (*Side Scattered light*) correspond au rayon lumineux diffracté par l'élément cellulaire et renseigne sur la structure de celui-ci.

Une troisième dimension a été apportée via le marquage fluorescent. En effet il est possible d'analyser l'intensité de cette fluorescence, correspondant à l'intensité de marquage et ainsi à la quantité du contenu cellulaire marqué par le fluorochrome. Il est obtenu sur le canal SFL (*Side Fluorescent light*). Ceci permet, en théorie, d'apporter une grande spécificité, cette dernière dépendant de celle du fluorochrome.

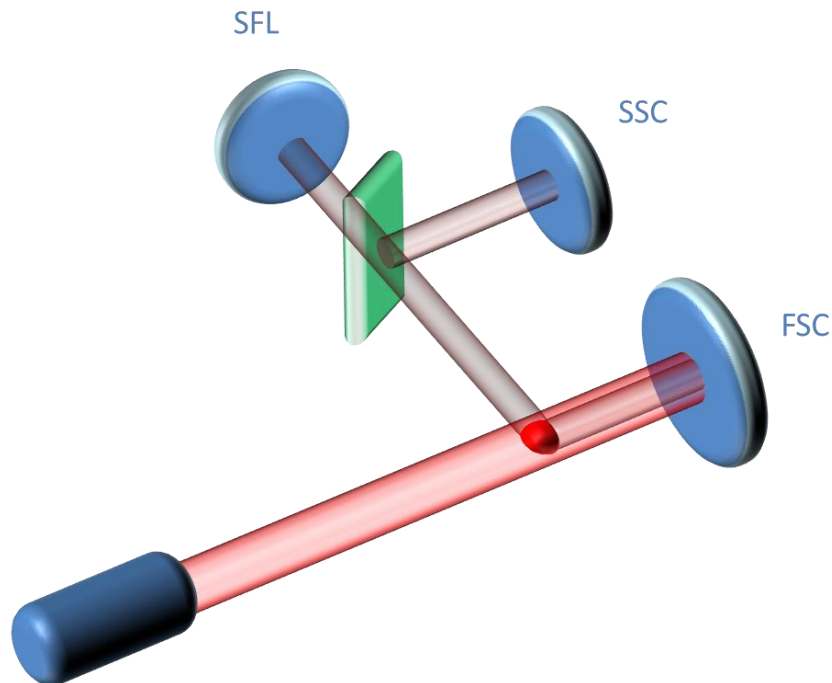


Figure 14 : Schéma simplifié de la technologie de fluorocytométrie tridimensionnelle.
 FSC : *Forward Scattered Light*. SSC : *Side Scattered Light*. SFL : *Side Fluorescent light*.

Concernant l'analyse plaquettaire, le marqueur utilisé sur le canal RET est un marqueur polyméthine qui se fixe spécifiquement sur les acides nucléiques, ADN ou ARN. Il marque de ce fait l'ensemble des cellules réticulées (leucocytes, réticulocytes, plaquettes). Au niveau plaquettaire il se fixe sur la membrane plasmique ainsi qu'au niveau des granules. Cette fixation, associée à la distinction de taille, devrait permettre d'éliminer de la numération les éléments non plaquettaires mais d'inclure les plaquettes de grande taille. Il serait normal, dans ce cas, d'observer une meilleure corrélation de la numération avec la méthode de référence qu'avec le canal impédance. Néanmoins dans certains cas cette comparaison donne de mauvais résultats, ceci étant probablement liés à la fixation non spécifique du marqueur sur des débris de globules blancs, principalement observé chez les patients sous chimiothérapie [103].

L'utilisateur a cependant la possibilité de passer l'échantillon directement en mode RET ou bien laisser l'hématimètre assurer le potentiel repassage dans ce canal après avoir analysé l'impédance.

Ce canal fournit deux scattergrammes différents. Tous deux construits sur la base de la taille cellulaire (FSC) en fonction de leur degré de fluorescence (SFL). La population plaquettaire, de petite taille, se trouve située sur la partie inférieure du graphique alors que les hématies et réticulocytes sont sur la partie supérieure.

La première représentation (en A sur la figure 15 ci-dessous) permet l'analyse du statut érythropoïétique avec différentes populations de réticulocytes, distinguées selon leur degré de

maturité. Plus ils sont immatures, plus leur fluorescence est importante et plus ils sont donc localisés vers la droite du graphique.

La seconde représentation (en B sur la figure 15 ci-dessous) permet l'analyse des plaquettes avec la distinction, selon leur stade de maturité, des plaquettes immatures regroupées dans l'IPF (Indice Plaquettaire de Fluorescence). En effet, les plaquettes immatures, contenant davantage d'acides nucléiques, sont d'autant plus marquées par le fluorochrome et présentent donc un degré de fluorescence plus important en SFL que les plaquettes matures. Un seuil de fluorescence a été défini afin de distinguer les plaquettes matures des immatures. Seuil à partir duquel les éléments sont ainsi comptés dans l'IPF.

L'intérêt de ce paramètre sera détaillé dans un prochain paragraphe.

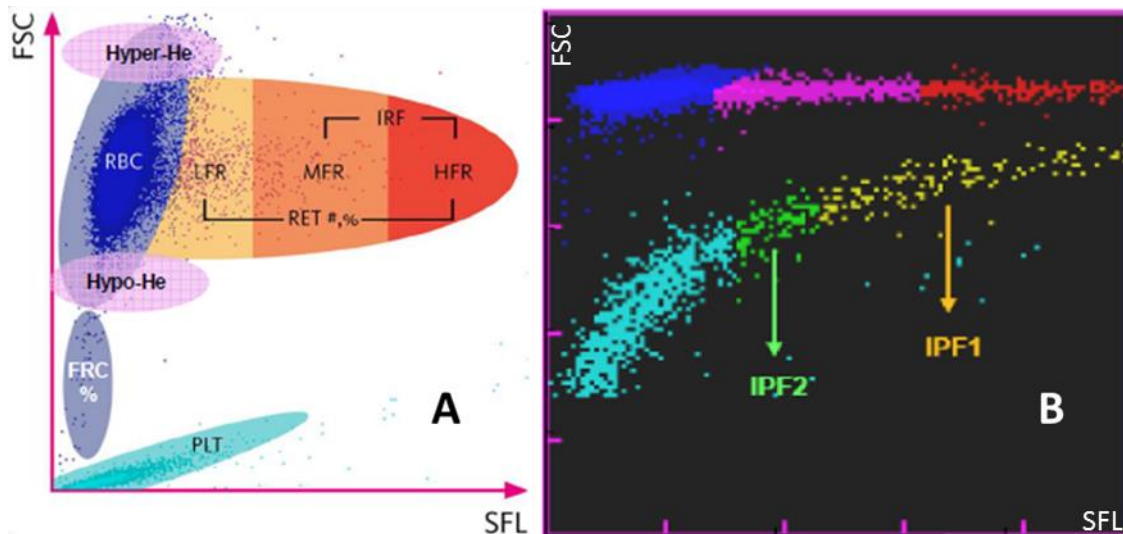


Figure 15 : Scattergrammes du canal RET sur SYMEX® XN.

A : Scattergramme analysant les réticulocytes. B : Scattergramme analysant les plaquettes en mode optique.

Source : Documentation SYMEX® [104]

Concernant le graphique de distribution des plaquettes, il peut être accompagné d'une alarme type « Scattergramme PLQ anormal » signifiant que la numération plaquettaire ne peut être interprétée de façon optimale. Ceci peut être dû à la présence de points fluorescents au-dessus de celui des plaquettes, perturbant la séparation des nuages érythrocytaires et plaquettaires. Il peut s'agir par exemple de cryoglobulines ou d'une population d'éléments de taille similaire (ou légèrement inférieure) aux plaquettes et présentant une fluorescence. C'est le cas des débris de leucocytes qui peuvent ainsi se situer également dans le prolongement du nuage plaquettaire [107].

Bien que présenté comme un canal permettant de résoudre l'ensemble des problèmes de l'impédance, nous avons précisé quelques insuffisances de celui-ci. Celles-ci ont probablement conduit le fournisseur à mettre au point une nouvelle technologie intégrée à sa dernière génération d'automates.

Fluorescence

Les deux canaux précédents montrent des avantages mais, même avec les multiples solutions techniques mises au point, ils présentent encore quelques inconvénients. Les fabricants ont donc optimisé la réalisation de la numération plaquettaire, afin de garantir une précision dans

toute la gamme de valeurs pathologiques, de manière fiable, rapide et avec des coûts maîtrisés.

Ce canal de fluorescence est, technologiquement parlant, identique à la technologie optique du canal RET, car basé sur le principe de fluorocytométrie. Le principal changement réside en la nature du fluorochrome. En effet il est ici basé sur un marqueur oxazine qui marque beaucoup plus spécifiquement les plaquettes que l'ancienne génération.

Des études ont porté sur la spécificité de ce marquage, en comparant la fixation du fluorochrome à celle d'un anticorps monoclonal plaquettaire CD41 (voir figure 16). Les hématies ne sont marquées qu'en périphérie et qu'avec une faible intensité, alors que les plaquettes présentent une fixation intracellulaire de forte expression. Cette fixation se réalise sur des éléments cellulaires riches en acides nucléiques, comme les mitochondries – possédant de l'ADN mitochondrial – et le réticulum endoplasmique – possédant de l'ARN ribosomal [109].

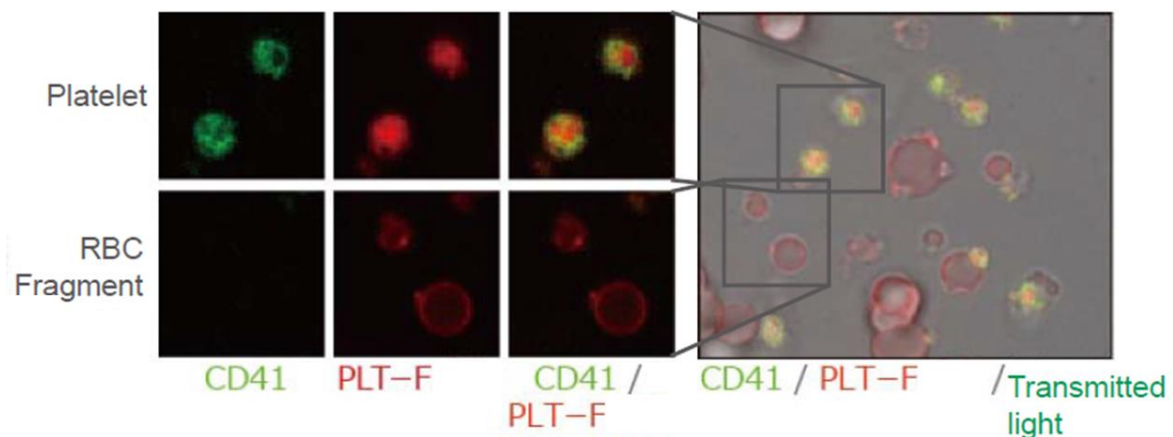


Figure 16 : Caractéristiques du marquage fluorescent sur le canal PLT-F, XN SYSMEX®.
 Source : Documentation SYSMEX® [110]

De récentes publications ont confirmé les spécificités du marquage du PLT-F, avec davantage de fluorescence au niveau intra-plaquettaire et une faible expression membranaire du marqueur, avec de plus un léger marquage de la membrane des hématies. A l'inverse au niveau du canal PLT-O, le marquage fort se fait sur les membranes plaquettaires ainsi qu'érythrocytaires. Wada *et al.* a également mis en évidence, de manière plus précise, la localisation intra-plaquettaire de ce marqueur. En effet ils ont étudiés en CMF différents anticorps, spécifiques des différents types de granules, afin de détecter l'endroit du marquage : [111]

- Un anticorps anti-CD62/P-sélectine spécifique des granules alpha.
- Un anticorps anti-CD63 spécifique des granules denses.
- Un anticorps anti-Grp75/Mortaline spécifique des mitochondries.
- Un anticorps anti-Calréticuline spécifique du réticulum endoplasmique.

Ainsi par immunofluorescence ils ont démontré une localisation du marqueur PLT-F au niveau des mitochondries et de l'ARN messager cytosolique [111].

Ceci est corrélé au fait que les hématies matures, n'ayant ni mitochondrie ni ARNm, ne sont pas marquées par ce fluorochrome type phénoxazine.

Différentes études rapportent que la numération obtenue à partir de ce canal est la mieux corrélée, par rapport à l'impédance et à l'optique, à la technique de référence qu'est la cytométrie en flux CD41/CD61 [112]. Ceci est également prouvé dans l'ensemble des cas testés, que ce soit avec des fragments érythrocytaires ou des fragments leucocytaires

[105][109]. Cette amélioration par rapport au marquage utilisé sur le canal RET prouve bien la meilleure spécificité du fluorochrome type oxazine par rapport au type polyméthine.

Les études rapportent également une franche amélioration sur la sensibilité de la numération plaquettaire, et ce principalement dans les valeurs basses. Le PLT-F est le canal rapportant la meilleure corrélation par rapport à la cytométrie en flux, concernant la numération plaquettaire, ceci étant encore plus vrai pour d'importantes thrombopénies [109]. Ceci peut s'expliquer d'un point de vue technologique, du fait que le PLT-F analyse une quantité de sang quasiment cinq fois plus importante que les autres canaux : [104]

Tableau III : Tableau comparatif des volumes sanguins analysés par les trois canaux d'analyse plaquettaire du XN SYSMEX®.

	Volume de sang mesuré (µL)	Dilution initiale	Volume de sang patient analysé ($\cdot 10^{-3}$ µL)
PLT-I	9,3	1:498	18,7
PLT-O	3,3	1:204	16,2
PLT-F	18,2	1:204	89

Pour ce canal PLT-F, le fournisseur annonce un CV inférieur à 5 % pour des numérations plaquettaires de l'ordre de 10 G/L, très inférieur à celui des autres canaux pour ce même ordre de numération [104]. En pratique, au laboratoire nous avons déterminé un CV d'environ 2,15% pour une numération de l'ordre de 45 G/L. Aucun échantillon de contrôle n'étant disponible pour des valeurs encore plus basses, nous n'avons pu déterminer le CV correspondant.

Tout comme le canal RET, ce canal PLT-F peut être utilisé seul ou en repassage automatique lors d'anomalies sur l'impédance. Tout comme son prédécesseur optique, le PLT-F est un module optionnel du XN et doit être acquis initialement sur l'automate. Une fois installé, celui ne permet plus de rendre la numération optique, le repassage automatique se faisant obligatoirement sur le canal PLT-F.

Ce canal fournit un scattergramme type FSC/SFL, schématisant ainsi la taille la taille cellulaire en fonction de son intensité de fluorescence. La distribution cellulaire est ainsi retrouvée comme sur la figure 17 ci-dessous :

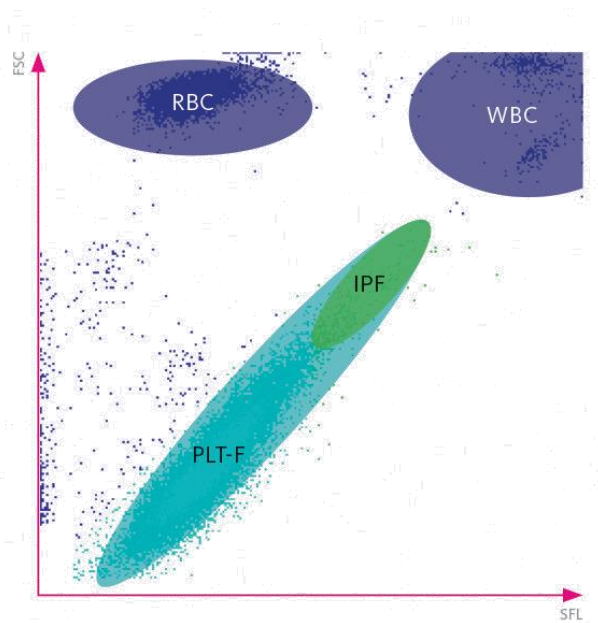


Figure 17 : Scattergramme du canal PLT-F sur XN SYSMEX®.

Source : Documentation SYSMEX® [104]

PLT-F : représentation du nuage plaquettaire global. IPF : *Immature Platelet Fraction*. RBC : *Red Blood Cell*.
WBC : *White Blood Cell*.

Le PLT-F permet également la mesure de pourcentage de plaquettes immatures, en évaluant l'IPF de la même manière que le canal RET. Plus les plaquettes sont jeunes et immatures, plus elles sont fluorescentes, se situant ainsi à l'extrémité de la fusée formée par le nuage plaquettaire. Un seuil arbitraire définit la limite au-delà de laquelle les éléments sont considérés comme immatures.

Ce canal PLT-F va nous permettre d'analyser différents indices :

- PLT-F : la numération plaquettaire en fluorescence.
- IPF / H-IPF : indice plaquettaire de fluorescence (IPF) et la fraction la plus immature de l'IPF correspondant à H-IPF. Ce dernier est à l'image du P-LCR, la fraction des plaquettes immatures dépassant un certain seuil de fluorescence défini par le constructeur.
 - L'IPF est rendu sous deux formes : IPF% correspondant au pourcentage de plaquettes immatures de l'ensemble de la numération et IPF# correspondant à la valeur absolue exprimée en G/L.
 - L'H-IPF est rendu uniquement en pourcentage.
- PLT-F-X : paramètre permettant d'analyser la structure de l'élément cellulaire, obtenu par diffraction au grand angle en cytométrie.
- PLT-F-Y : paramètre permettant l'analyse de l'intensité de fluorescence, correspondant à l'intensité de marquage de l'élément cellulaire.
- PLT-F-Z : paramètre permettant l'analyse de taille, par la diffusion au petit angle en cytométrie.

3.2.1.b Numération plaquettaire

Dans le cadre de la prise en charge des patients thrombopéniques, il est dans un premier temps nécessaire de s'assurer de la réalité de la faible numération plaquettaire.

Nous n'allons pas approfondir la démarche mais en exposer quelques éléments.

Dans un premier temps, les vérifications pré-analytiques sont indispensables :

- Risque de dilution par une perfusion si le prélèvement est réalisé à proximité du cathéter. Ceci conduisant à une dilution de l'ensemble de la numération.
- La présence d'un coagulum dans le tube va sous-évaluer l'ensemble des paramètres de la numération et en particulier les plaquettes qui en sont un des éléments des plus sensibles. La présence de fibrine va également piéger les plaquettes et perturber la numération.
- S'assurer du correct remplissage du tube. En effet dans le cas contraire, un rapport anticoagulant / volume sanguin va induire également une sous-évaluation de la numération plaquettaire. Ceci est d'autant plus important avec les tubes citratés.

Dans ces diverses situations de thrombopénie, en l'absence d'antécédents connus, il s'avère nécessaire de réaliser un état frais ainsi qu'un frottis sanguin. Ceci va permettre d'observer la présence d'éventuels amas plaquettaires accompagnés ou non de fibrine. Le frottis pouvant également mettre en évidence diverses situations d'interférences comme des plaquettes géantes ou un satellitisme plaquettaire autour de polynucléaires neutrophiles [113][114].

Afin de limiter le rendu de numérations plaquettaire faussement abaissées, les hématimètres sont équipés de règles d'alarmes signalant à l'opérateur la possible présence d'une interférence.

Le XN SYSMEX® possède trois types d'alarmes concernant les plaquettes : [107]

1. **Distribution anormale des plaquettes** : comme décrit dans le paragraphe portant sur la technologie impédance, cette alarme correspond à une mauvaise courbe de distribution (non-retour à la ligne de base au niveau des discriminateurs) et n'est activée que par l'impédance. La présence de microcytes, de plaquettes géantes, de fragments d'hématies ou encore de débris cellulaires sur le frottis sanguin, doivent être recherchés afin d'expliquer l'alarme.
2. Présence d'**agrégats plaquettaires** : alarme pouvant être activée par différents canaux comme le WNR (réalisant la numération des basophiles), le WDF (réalisant la formule sanguine) et PLT-F. Dans ces différents canaux la présence d'un nuage à différents endroits permet de suspecter la présence d'amas plaquettaires (voir image ci-dessous). Concernant le PLT-F, on explique la localisation de ces événements par le fait que les amas ont une taille hétérogène, naturellement plus grande qu'une plaquette, et que le fluorochrome n'arrive pas pénétrer et se fixer dans l'ensemble des éléments. Ceci explique un nuage placé dans les grandes tailles (en FSC) et relativement faiblement fluorescent (en SFL) en rapport à la grande taille de cet « élément ».
3. **Scattergramme anormal des plaquettes** : alarme uniquement déclenchée par le canal PLT-F et nécessite la réalisation d'un frottis sanguin afin de confirmer la numération plaquettaire et/ou la présence d'interférences possibles.

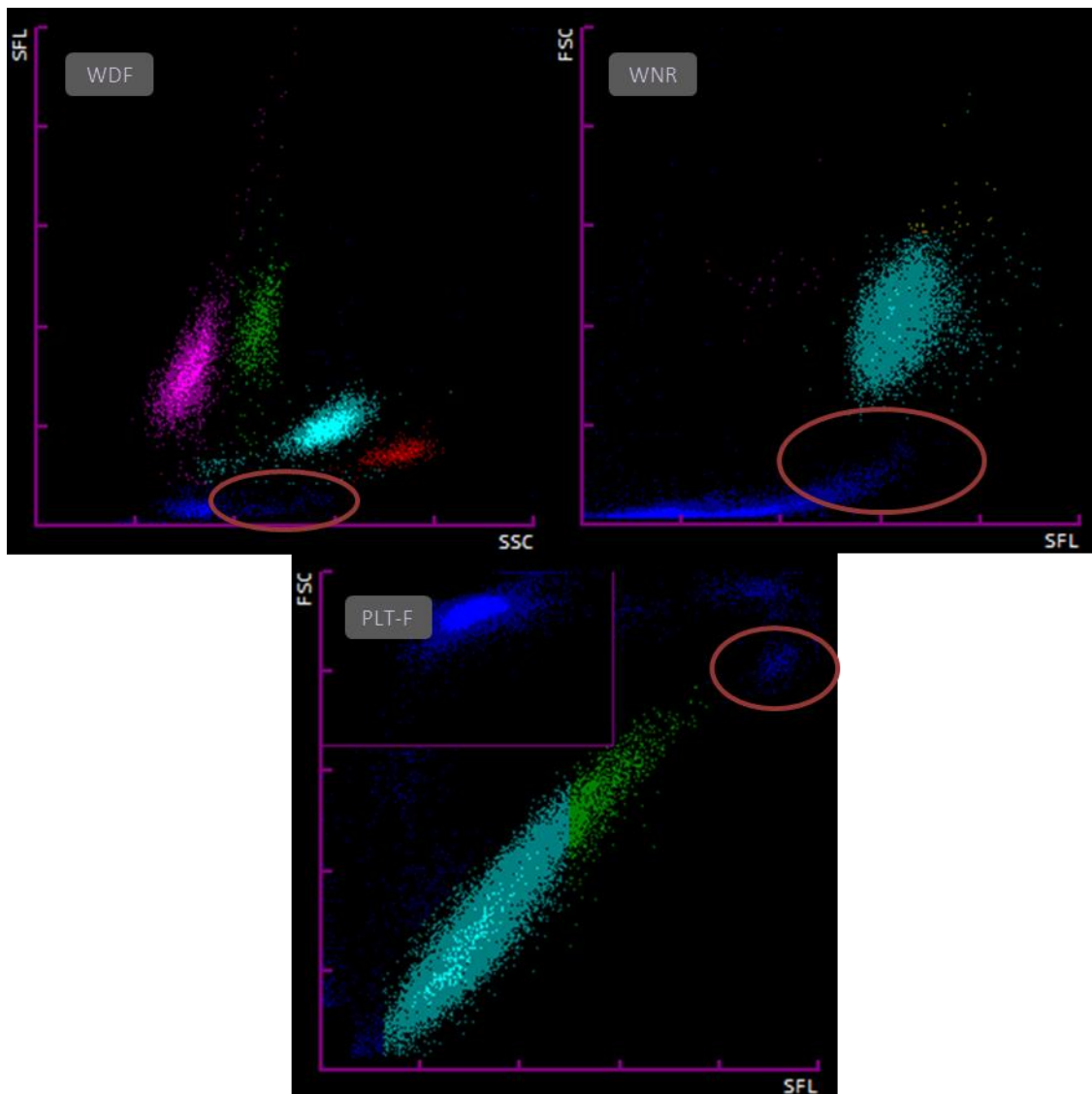


Figure 18 : Graphiques XN SYSMEX® des différents canaux permettant de mettre en évidence les amas plaquettaires.

WDF : canal permettant la réalisation de la formule leucocytaire. WNR : canal permettant spécifiquement la détermination des basophiles et érythroblastes. PLT-F : canal permettant spécifiquement la détermination des plaquettes par marqueur fluorescent. En rouge sont entourées les zones de positionnement des amas plaquettaires.

En cas de présence d'amas plaquettaires, liés à l'utilisation de l'EDTA comme anticoagulant dans le tube, il peut être envisagé d'effectuer un nouveau prélèvement avec un autre type d'anticoagulant. Des tubes citratés ou contenant du CTAD (acide Citrique, Théophylline, Adénosine et Dypyridamole) peuvent permettre, après correction par le facteur de dilution de l'anticoagulant, d'éviter cette interférence liée à l'EDTA.

En cas de présence de fibrine, un nouveau prélèvement, correctement effectué, sur tube standard EDTA est suffisant. En effet l'interférence ne provient que d'une mauvaise manipulation lors du recueil, le tube ayant pu être mal homogénéisé ou le prélèvement ayant pu être traumatique au moment de la ponction veineuse activant ainsi la coagulation.

En termes de performances, diverses études ont montré que le XN SYSMEX® est très bien corrélé à la méthode de référence, en cytométrie en flux, concernant la numération via son canal PLT-F.

Quel que soit la plage de numération, le canal PLT-F est plus performant que l'impédance et l'optique. Seo *et al.* [115] retrouve le plus petit coefficient de variation avec le PLT-F pour la répétabilité d'une numération aux alentours de 50-70 G/L. Des chiffres confirmés par d'autres auteurs, montrent la supériorité de ce nouveau canal sur les deux autres [105][109].

Des comparaisons ont également été effectuées sur des patients souffrant de leucémies aiguës, et pouvant présenter des débris de leucocytes circulants, ainsi que sur des grands brûlés, présentant des débris de globules rouges. Dans ces diverses situations où la numération plaquettaire est basse et alarmée d'une distribution anormale en impédance, le PLT-F montre une excellente corrélation avec la CMF [109].

Tableau IV : Tableau présentant les CV des trois canaux du XN SYSMEX® en fonction de deux populations de patients différentes.

Source : Tanaka *et al.* [109]

Canal	CV patients sains (40 à 400 G/L)	CV patients avec alarme de distribution anormale
PLT - I	1 – 4.6 %	10.9 – 27.9 %
PLT - O	1.6 – 6.3 %	3.3 – 11.4 %
PLT - F	<u>0.7 – 1.6 %</u>	<u>1.9 – 8.3 %</u>

3.2.1.c Paramètres morphométriques automatisés

Les paramètres morphométriques sont l'ensemble des caractéristiques de taille, de forme et d'aspect que peuvent présenter les plaquettes. Ce sont des paramètres directement disponibles lors de la réalisation d'un hémogramme (code 1104 NABM) ou lors de la demande d'étude isolée des plaquettes (code 1107 NABM). Ces paramètres ont été décrits, technologiquement parlant, dans un paragraphe précédent.

Nous allons ainsi étudier la morphologie plaquettaire ainsi que la présence d'anomalies d'autres lignées afin de consolider les suspicions diagnostiques ou de participer au diagnostic différentiel. Ces éléments sont divisés en deux groupes, l'un provenant de l'exploitation des données de l'hématimètre, l'autre de l'étude du frottis sanguin. Ce dernier point sera abordé dans le chapitre suivant de ce travail (§ 3.2.2).

Afin d'aider à l'approche et à la compréhension des paramètres plaquettaires, le schéma ci-dessous représente la courbe de distribution plaquettaire normale obtenue par technologie impédance.

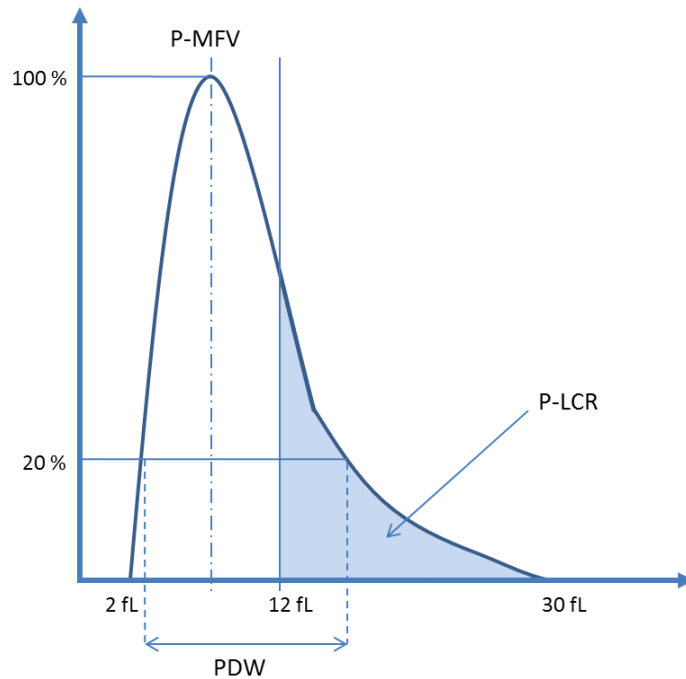


Figure 19 : Courbe de distribution plaquettaire obtenue par technologie impédance.

Le PDW représentant la largeur de la courbe de distribution à 20 % de sa hauteur. P-LCR étant le pourcentage de plaquettes ayant une taille supérieure à 12 fL et P-MFV étant le volume plaquettaire le plus fréquent, correspondant au pic de la distribution.

Comme nous l'avons décrit dans le chapitre technique portant sur cette technologie, une importante limitation réside dans le fait que ces indices plaquettaires impédance ne sont pas systématiquement exploitables, principalement en cas d'anomalie de distribution plaquettaire. De plus certains auteurs ont démontré que l'ensemble des automates, toutes technologies et fournisseurs confondus, ne donnent pas des résultats comparables au niveau de ces indices plaquettaires. Ceci a été plus particulièrement prouvé concernant le VPM, mais il serait logique de s'attendre à la même conclusion concernant les paramètres qui en découlent [116]. Une des explications possible de cette différence réside dans une non harmonisation des plages de mesure ainsi que des seuils discriminatoires selon les hématimètres [9]. Ce qui induit des différences significatives dans les valeurs retrouvées pour un même échantillon passé sur plusieurs automates différents [117].

Nous présentons ici, à titre indicatif, des valeurs de référence issues de la littérature, mais celles-ci doivent être nécessairement réévaluées au sein de chaque laboratoire. Ceci permettant, en sus de la satisfaction de l'exigence normative NF EN ISO 15189 du dossier de validation de méthode, d'adapter son propre référentiel.

Tableau V : Valeurs de référence des principaux indices plaquettaires.

Paramètre	VPM (fL)	PDW (fL)	P-LCR (%)	PCT (%)	P-MFV (fL)	IPF (%)	IPF# (G/L)
Valeurs de référence	7,5-11,5 [118]	11,1-14,4 [118]	21,5-37 [118]	0,2-0,31 [118]	7,5-10 [119]	1,1-6,6 [120]	1,1-16,9 2-17 [120]
	9,3-12,1	10,1-16,1	18,5-42,3	0,17-0,32		0,8-6,3	2,3-12,7
	9,1-11,9 [121]	9,9-15,4 [121]	17,5-42,3 [121]	0,18-0,39 [121]		0,8-6,2 [121]	[121]
		10,0-17,9 [122]				1,1-6,1 [123]	2,49-15,64 [124]
					1,0-7,3 [124]		

Ce tableau rapporte différentes valeurs de référence pour des indices plaquettaires, basés sur des mesures d'automates SYSMEX®. Le cas échéant, deux intervalles sont disponibles avec celui des hommes en premier et celui des femmes en dessous.

Volume plaquettaire moyen (VPM)

Description technologique

Le VPM est l'indice plaquettaire le plus fréquemment décrit, d'autant plus dans le contexte des TC. Il provient, dans le cas de notre automate XN SYSMEX® du canal impédance.

Il correspond au volume plaquettaire moyen. Comme décrit précédemment, cette technologie est basée sur une différence de potentiel électrique entre deux électrodes, cette dernière étant proportionnelle à la taille de l'élément mesuré [116].

Sur le XN le VPM est calculé sur la base de deux autres indices plaquettaires :

$$VPM = \frac{PCT}{PLT - I}$$

PCT étant le plaquettocrite (développé ci-dessous) et PLT-I la numération plaquettaire par impédance.

Même si certains auteurs ont tenté de déterminer des valeurs de référence pour ce paramètre [125][126] il apparaît difficile à standardiser, sans prendre en compte l'automate utilisé.

Certains auteurs rapportent également des différences non négligeables selon l'anticoagulant utilisé pour le prélèvement. Les résultats obtenus avec le citrate de sodium montrent une sous-estimation par rapport à ceux obtenus avec l'EDTA [117]. De même que le délai pré-analytique entre le prélèvement et le passage sur automate apparaît impacter le résultat. Un gonflement des plaquettes serait observé au cours des 120 premières minutes [127].

Utilisation clinico-biologique

Ce paramètre a été étudié dans de nombreux articles, et ce principalement dans les contextes thrombotique et d'athérosclérose. Il a été démontré que les plaquettes de grande taille sont métaboliquement et enzymatiquement plus actives que les plaquettes de taille normale. Elles possèdent davantage de contenu intracellulaire dont une augmentation du contingent de granules alpha. Au niveau des zones de lésions vasculaires, les plaquettes libèrent de nombreux médiateurs de la coagulation, de l'inflammation, de la thrombose et de

l'athérosclérose. De part cette augmentation des cytokines, le potentiel prothrombotique apparaît plus important. Il est ainsi décrit qu'une augmentation de VPM est en lien avec un risque cardiovasculaire plus important.

Le schéma ci-dessous présente les mécanismes potentiels du lien entre l'augmentation de VPM et le risque cardiovasculaire [128].

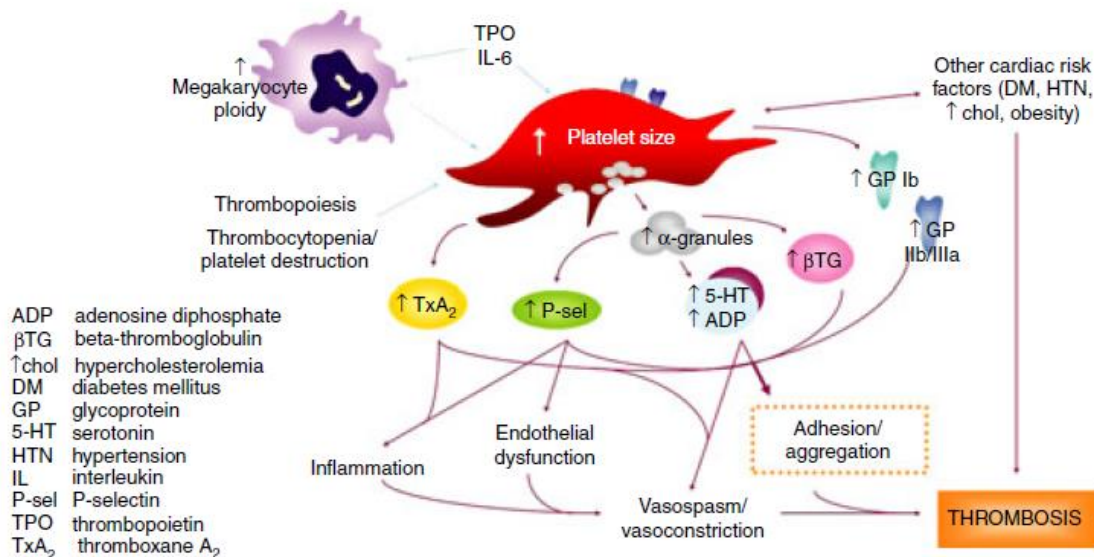


Figure 20 : Mécanismes potentiels associant une augmentation du VPM et un facteur de risque cardiovasculaire.

Source : d'après CHU *et al.* [128]

Il a également été montré, dans le cadre du diabète, que le VPM est habituellement élevé chez ces patients, et ce d'autant plus que le contrôle glycémique est faible. Plusieurs hypothèses possibles sont avancées, comme par exemple un effet osmotique provoquant une augmentation de la taille des plaquettes où encore un effet de l'insuline sur les mégacaryocytes. Néanmoins le mécanisme exact n'est pas encore clairement élucidé [129].

Les travaux qui nous intéressent principalement ici, sont ceux concernant les TC. Initialement c'est ce paramètre, reflet de la taille plaquettaire, qui a permis la construction des principales classifications de ces pathologies rares. Nombreuses sont également les publications essayant de l'utiliser afin de distinguer les PTI d'autres formes de thrombopénies, mais généralement sans grand succès du fait de l'importante hétérogénéité des TC [2][4][130]. Nous verrons par la suite, que l'association de ce paramètre avec d'autres indices plaquettaires, a permis d'améliorer ces distinctions.

Ainsi, bien que ce paramètre soit à la base de nombreux travaux, tant sur les TC qu'à propos d'autres pathologies comme les maladies cardiovasculaires, le diabète... [129][131][128], il apparaît relativement difficile à appréhender.

Il est donc primordial que chaque laboratoire, selon ses spécificités, établisse ses propres valeurs de référence de VPM afin d'exploiter et d'interpréter au mieux cet indice plaquettaire. Néanmoins, un VPM anormalement élevé associé à une thrombopénie permet au biologiste de s'orienter possiblement vers une TC où tout du moins, de l'aider dans l'interprétation clinico-biologique. Cependant un VPM normal n'exclue en rien la présence d'anomalies plaquettaires, des plaquettes géantes par exemple, peuvent être éliminées de la numération par des seuils discriminatifs, sous évaluant ainsi les indices plaquettaires.

Nous avons de plus observé que le VPM n'est pas systématiquement rendu dans le cadre de l'utilisation d'un automate XN®, mais ce sujet sera traité et approfondie dans une prochaine partie de ce travail. Ceci s'explique par le fait que la courbe de distribution plaquettaire, obtenue par impédance, ne respecte pas les critères de validation intrinsèques à l'automate [116]. Ceux-ci ont été abordés dans la partie technique impédance précédente.

Indice de distribution plaquettaire (PDW ou IDP)

Description technologique

Il s'agit ici également d'un paramètre obtenu sur le canal impédance du XN.

Comme précédemment décrit, les automates équipés de technologie par impédance, fournissent une courbe de distribution plaquettaire afin de dénombrer et rapporter divers indices plaquettaires. Parmi eux le PDW représente la largeur de cette courbe à 20% de sa hauteur.

Ainsi on l'interprète comme étant un indice du degré d'anisocytose plaquettaire. Plus le PDW est élevé, plus l'anisocytose est importante.

Sur les automates à technologie optique, ce paramètre est également dénommé PDW.

Utilisation clinico-biologique

Ce paramètre a principalement été étudié dans le cadre des pathologies thrombotiques, aucune publication n'ayant été jusqu'à présent rapportée afin d'évaluer son intérêt dans les TC.

Il a été démontré que lors de l'activation plaquettaire, se produit un changement morphologique, les plaquettes passant d'une forme discoïde à une forme sphérique avec émission de pseudopodes [132]. Plus larges, ces plaquettes seraient hémostatiquement plus actives [123]. Par les différences de taille et de nombre de ces pseudopodes, les plaquettes présentent des tailles variables, faisant ainsi varier le VPM et surtout le PDW.

Les plaquettes activées sont donc décrites comme étant plus larges, et ce quelle que soit la technologie utilisée.

Cette donnée a ainsi été évaluée afin de tenter d'obtenir une orientation diagnostic rapide dans le contexte des maladies thromboemboliques. Certains auteurs ont montrés, par exemple, que le PDW associé au VPM pourrait être utilisé comme facteur prédictif de thrombose veineuse au niveau cérébral [133].

D'autres études portent sur l'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP), où les plaquettes semblent jouer un rôle essentiel dans la physiopathologie. En effet l'altération de l'endothélium vasculaire pulmonaire ainsi que la composante inflammatoire et immunitaire observées dans cette pathologie seraient des mécanismes favorisant l'activation plaquettaire. Ces plaquettes se fixeraient à l'endothélium lésé, favorisant la thrombose, et leur activation provoquerait la libération des contenus granulaires et la sécrétion de cytokines, participant au remodelage des vaisseaux pulmonaires [134].

Dans ce type de pathologie, les auteurs rapportent que le VPM ainsi que le PDW sont augmentés, mais ceci n'a pas de valeur pronostique, ces élévations étant probablement en rapport avec l'activation plaquettaire.

Ces observations ont été également rapportées au cours de la pré-éclampsie ou encore dans des pathologies coronaires, où le PDW est supérieur aux valeurs retrouvées chez les cas témoins [133][135][136].

De plus, ce paramètre d'anisocytose a également été décrit dans certaines pathologies thrombopéniques. Il a été montré que son association avec le VPM permet, en cas d'élévation simultanée, de s'orienter vers une origine périphérique de destruction plaquettaire plutôt

qu'une hypoproduction médullaire [123][137][138]. En effet, lors de PTI, où la destruction est d'origine immune et périphérique, il est observé une importante augmentation du VPM et du PDW, permettant aisément la distinction avec d'autres causes de thrombopénies (infections, séquestration splénique...) où ces paramètres montrent des variations plus réduites et associées à d'autres données clinico-biologiques [137]. Certains auteurs ont cependant démontré que la distinction entre le PTI – destruction périphérique – et certaines pathologies liées à une hypoproduction médullaire reste très délicate sur la base de ces seuls paramètres. C'est le cas pour des syndromes myélodysplasiques avec une unique composante thrombopénique et certaines macrothrombopénies constitutionnelles. Dans ces trois cas, des valeurs fortement perturbées dans les indices plaquettaires sont retrouvés et le diagnostic différentiel est quasi impossible sur leur seule base [137].

Le PDW, qu'il soit ou non associé au VPM, permet de faire la distinction entre une thrombopénie d'origine centrale et périphérique, mais avec une faible sensibilité et spécificité. Cette approche non-invasive (en comparaison avec le myélogramme) et à faible coût (car paramètre obtenu en routine) permettrait, en combinaison avec d'autres paramètres morphométriques, d'aboutir à davantage de spécificité.

Néanmoins, comme nous l'exposerons dans notre étude, c'est un paramètre obtenu par le biais de l'impédance, et il est ainsi imputé de toutes les limitations liées à cette technologie. Ceci principalement dans le contexte des TC où les indices plaquettaires d'impédance ne sont généralement pas exploitables du fait d'une courbe de distribution anormale [139].

Pourcentage de plaquettes larges (P-LCR ou PRGC)

Description technologique

Le P-LCR est également un paramètre issu du canal impédance et celui-ci correspond au pourcentage de plaquettes ayant une taille supérieure à 12 fL.

Comme la majorité des indices plaquettaires impédance, il subit les limitations de cette technologie et n'est ainsi pas rendu systématiquement, en cas de non-respect des critères de validation de la courbe de distribution plaquettaire.

Utilisation clinico-biologique

Néanmoins ce paramètre est, comme ceux précédemment décrits, facile d'accès et directement disponible. Il est rarement utilisé et son intérêt clinique n'est pas clairement identifié. Il a cependant été étudié selon deux axes différents :

1. Dans le contexte de thrombose, en tant que témoin d'activation plaquettaire.
2. Dans le contexte de thrombopénies afin de tenter de distinguer le PTI d'une autre cause de thrombopénie.

Etant un témoin de taille plaquettaire augmentée, il devrait être un paramètre intéressant afin d'améliorer les performances des différents algorithmes utilisant la taille plaquettaire comme moyen de classification.

Néanmoins c'est un paramètre rarement étudié dans la littérature, même s'il en est fait référence dans quelques articles sur les facteurs de risque thrombotiques ou encore dans les essais de distinction entre PTI et autre causes de thrombopénies.

Concernant le risque cardiovasculaire, l'ensemble des données disponibles sont discordantes car certaines d'entre elles ne montrent aucune corrélation entre ce paramètre et des pathologies impliquant les artères coronaires [140].

Toutefois il serait logique de s'attendre à ce que le P-LCR apporte des informations utiles du fait du recrutement unique des plaquettes de grande taille, davantage actives et au potentiel prothrombotique probablement supérieur.

Concernant l'utilisation de ce paramètre dans la distinction entre PTI des autres thrombopénies, davantage de données sont disponibles [137][139].

Les études ont principalement porté sur la différence entre un PTI et des formes d'hypoproduction plaquettaire (chimiothérapies, aplasie médullaire...). La perturbation des indices plaquettaires en cas de mécanisme hyperdestructif a depuis longtemps été rapportée, et c'est l'association VPM et PDW qui fut depuis 1983 à la base d'algorithmes [137]. Du fait de la découverte de nombreuses formes de TC, interférant largement dans cette distinction, les auteurs ont tenté d'utiliser l'association VPM – PDW et P-LCR afin d'améliorer les performances. Néanmoins, en pratique cela reste actuellement difficile de se baser uniquement sur ces trois paramètres afin d'orienter le clinicien vers une origine acquise ou constitutionnelle de la thrombopénie [130].

Cependant des évolutions de tendance ont été démontrées. Le P-LCR évolue ainsi de manière inversement proportionnelle à la numération plaquettaire mais directement proportionnelle au PDW et VPM [140][141].

Plaquettochrome (PCT)

Description technologique

Le plaquettochrome est un paramètre mesuré via le canal impédance du XN par la somme des impulsions électriques. Il permet par la suite de calculer le VPM dans la formule décrite précédemment.

Ainsi il devrait évoluer, et être impliqué dans les mêmes conditions que le VPM et/ou la numération plaquettaire du fait que le PCT est le résultat du produit de ces derniers.

Utilisation clinico-biologique

Aucune donnée pour ce paramètre n'est pour autant rapportée concernant les TC. Néanmoins dans le cadre du PTI, il a été montré utile de suivre son évolution au cours de la pathologie. En effet il a été observé un retour à la normale plus rapide pour le PCT que pour la numération plaquettaire [142].

Certains auteurs se sont intéressés depuis quelques années à l'intérêt de l'étude de cette masse plaquettaire afin de modifier les recommandations de transfusion chez les nouveau-nés de soins intensifs. Les données disponibles sur le sujet ne sont pas toutes cohérentes et une dernière publication a montré que les schémas se basant sur le PCT plutôt que sur la numération plaquettaire, ne réduisent pas le nombre de transfusions. D'autre part il n'est observé aucune différence significative, que ce soit au niveau de la mortalité, des saignements ou du nombre de poches transfusées [143][144]. Initialement ces travaux se basaient sur l'idée que le rôle hémostatique des plaquettes était davantage lié à la masse plaquettaire qu'à sa numération. Les plaquettes jeunes (et plus larges) étant plus actives du point de vue métabolique. Ainsi un patient ayant une numération plaquettaire de 120 G/L et un VPM à 7 fL bénéficierait du même potentiel hémostatique qu'un patient ayant 70 G/L mais un VPM à 12 fL [144]. Néanmoins l'application de cet algorithme ne semble pas montrer de bénéfices.

La masse plaquettaire a également été évaluée dans d'autres domaines. Même si l'association VPM et numération plaquettaire ne sont pas de très bon marqueurs concernant les pathologies coronaires, le PCT semble plus pertinent dans le cadre de l'évaluation des risques de syndromes coronariens aigus [145].

Dans le même domaine, il est montré que le PCT peut apporter des informations essentielles dans le cadre de la pathologie de non fermeture du canal artériel chez les nouveau-nés. Aucune corrélation n'a été retrouvée entre le PDW et la numération, dans le cadre de cette pathologie, alors que le PCT et le VPM pourraient avoir un rôle. D'un point de vue

physiopathologique, l'ensemble du mécanisme de fermeture du canal artériel n'est pas complètement connu. Une agrégation plaquettaire à ce niveau pourrait contribuer au rétrécissement de la lumière vasculaire. De plus dans les cas pathologiques, les patients présentent habituellement des défauts d'agrégation ou d'adhésion ou encore de synthèse au niveau plaquettaire.

Ainsi le PCT abaissé est associé avec un risque majoré de pathologie de non fermeture du canal artériel [146].

Une dernière étude rapporte l'utilisation de ce paramètre dans le cadre de la gestion des patients souffrant de maladie de Crohn. Chez ces patients, les indices P-LCR et PDW semblent diminués alors que le PCT et la numération semblent significativement augmentés en comparaison à des témoins et/ou à des patients en rémission de cette pathologie. Il apparaît que le PCT est un marqueur sensible et spécifique afin de déterminer l'activité de la pathologie, et ce surtout dans les cas où la protéine C réactive (marqueur d'inflammation habituellement utilisé) n'est pas interprétable, du fait d'une valeur restant normale [147].

Néanmoins il est important de nuancer l'impact de ce paramètre dans ces divers contextes, du fait justement de l'implication de nombreux facteurs dans ses variations. Des conditions environnementales, d'hygiène de vie ainsi que diverses pathologies peuvent influencer ces indices plaquettaires (tabac, pathologies hépatiques, alcool, ...) [147].

Volume plaquettaire le plus fréquent (P-MFV)

Description technologique et physiopathologique

Cet indice plaquettaire est obtenu grâce au canal impédance et traduit le volume plaquettaire le plus fréquent. C'est ainsi un indicateur de taille plaquettaire. Il correspond au pic de la courbe de distribution des plaquettes. Ainsi il est systématiquement rendu, indépendamment de l'aspect de la courbe et du respect ou non des règles de validation de celle-ci [148].

Utilisation clinico-biologique

Aucune publication ne rapporte l'utilisation de ce paramètre en clinique. Il n'est pas non plus rapporté de corrélation entre la taille des plaquettes sur le frottis sanguin et les valeurs de cet indice. De même qu'aucune corrélation entre VPM et P-MFV n'est démontrée, en cas de validation du canal impédance.

Nous étudierons dans le chapitre correspondant à notre étude, l'intérêt potentiel de cet indice.

Plaquettes immatures fluorescentes (IPF)

Description technologique

L'IPF est un indice plaquettaire représentant la fraction des plaquettes les plus jeunes. Il est obtenu via le canal PLT-F du XN SYSMEX®. Cependant il peut également être obtenu par le biais du canal RET de l'automate. A la différence que le marqueur fluorochrome est différent selon le canal. Nous n'allons ainsi étudier ici que les données issues du canal PLT-F.

Les plaquettes marquées par ce fluorochrome représentent la fraction des plaquettes immatures. Celles-ci également appelées plaquettes réticulées (RP) ont été décrites la première fois en 1969 [120]. Elles sont généralement comparées aux réticulocytes de la lignée érythrocytaire.

En effet, d'un point de vue physiologique, lors de la libération des plaquettes par les mégacaryocytes, les plaquettes contiennent une faible proportion d'ARN. Longtemps considérés comme des éléments résiduels de la mégacaryopoïèse, de récentes études ont montré le possible intérêt de ces acides nucléiques à des fins de synthèse protéique [120].

Il a été en effet montré que ces plaquettes immatures contiennent deux groupes d'ARNm qui se distinguent par des fonctionnalités différentes : [149]

1. Une partie de ces ARNm participe de **manière constitutive** à la traduction de certaines protéines, comme par exemple $\alpha_{IIb}\beta_3$ essentielle à l'activation plaquettaire.
2. Le second groupe correspond à des ARNm qui participent de **manière inductible** à la traduction de certaines protéines. Les signaux permettant ceci sont d'origine extracellulaire et sont relayés par des intégrines en surface plaquettaire. Ainsi cette production protéique peut être initiée lors de l'activation plaquettaire. En résulte la synthèse de différents éléments comme du facteur tissulaire, élément essentiel à l'initiation de la voie extrinsèque de la cascade de coagulation.

Leur durée de vie est différente de celle des plaquettes matures, passant de 7-10 jours à 24 heures ou moins. Le taux de ce type plaquettaire a été montré comme le reflet de l'activité des mégacaryocytes médullaire et du turn-over des plaquettes [149].

C'est ainsi que depuis de nombreuses années, un grand nombre d'auteurs se sont intéressés à l'impact clinique de ce paramètre, ayant l'intérêt certain d'être non invasif en comparaison à la ponction médullaire. Il a été étudié dans diverses pathologies comme les thrombopénies, les thrombocytoses ou encore les TC, mais aussi dans des pathologies rénales, cardiovasculaires et également et surtout dans le suivi des patients ayant bénéficiés de transplantations d'organes et de greffes de cellules souches hématopoïétiques.

Néanmoins l'inconvénient majeur de cet indice plaquettaire est l'absence de standardisation. Ce n'est que depuis 1995 que la mesure de l'IPF est automatisée et seuls deux fournisseurs proposent des hématimètres capables d'établir cette valeur : ABBOTT® et SYSMEX® [119]. Aucune méthode de référence n'est actuellement mise en place mais l'*International Council for Standardization in Haematology* (ICSH) a comme projet d'en établir une afin de permettre une corrélation des différentes technologies disponibles [120]. Dans la littérature, c'est la mesure par cytométrie en flux (CMF), via un marquage par le thiazole orange, qui fait généralement référence [150]. Cependant les différences technologiques sont importantes, que ce soit concernant le type de marqueur utilisé, sa concentration ou encore les temps et températures d'incubations, rendant difficile la mise en place de valeurs de référence communes et internationales. Actuellement, il semble donc nécessaire que chaque laboratoire établisse ses propres bornes selon son environnement technologique. De ce manque de standardisation découle également le défaut de contrôle qualité sur ce paramètre, que ce soit en interne (CIQ) ou en évaluation externe (EEQ).

En 2005, la FDA a approuvée ce paramètre IPF SYSMEX® via la procédure américaine 510(k). Son numéro d'attribution étant 510(k) K051199. De part ceci la société a prouvée l'équivalence de la méthode automatisée par rapport à une technique de CMF décrite dans le rapport de la FDA. En France, ce paramètre n'est pas un indice plaquettaire autorisé à être rendu dans le cadre de la routine. De plus il n'est pas compris dans la nomenclature des actes de biologie médicale.

D'un point de vue technologique, notre étude se base sur l'utilisation de cet indice obtenu par le canal PLT-F sur XN SYSMEX®.

Concernant le pré-analytique, certaines études montrent une stabilité des paramètres de l'ordre de 24 à 48 heures à température ambiante, alors que d'autres auteurs ne retrouvent qu'une stabilité de 3 à 8 heures [120]. A ce niveau également aucun consensus ne fait foi et il appartient à chaque laboratoire d'utiliser ses propres données.

Comme nous l'avons décrit dans le chapitre portant sur les technologies, les études comparatives entre les deux dernières générations d'automates SYSMEX®, le XE plus ancien et le XN, affirment que cette dernière génération est plus performante et présente moins

d'interférences sur le comptage de cet IPF en comparaison à la CMF et/ou à la clinique du patient [115][120].

De plus, au niveau post-analytique il n'y a pas de consensus sur l'intérêt supérieur de l'IPF# ou IPF%, les études utilisant soit l'un soit l'autre comme indicateur.

Utilisation clinico-biologique

En termes d'études cliniques, il est possible de les distinguer en deux groupes : [120]

1. Les études s'attachant à séparer les thrombopénies d'origine centrale de celles d'origine périphérique. Du fait que ces premières sont caractérisées par un défaut de production plaquettaire, il est normal de retrouver ainsi un indice IPF diminué. En comparaison aux causes d'origine périphérique, liées à une destruction où il est attendu de retrouver un IPF augmenté, du fait de l'augmentation de la mégacaryopoïèse qui compense cette destruction plaquettaire [103][123].
2. Le second groupe d'études analyse l'intérêt de cet indicateur d'immaturité dans les suivis de numérations plaquettaire chez les patients ayant bénéficiés d'une chimiothérapie ou d'une transplantation (d'organes ou de cellules souches hématopoïétiques). Le but principal de ces suivis est d'anticiper la restauration de la numération plaquettaire permettant ainsi de limiter les transfusions prophylactiques [103][123].

De nombreux autres champs sont également explorés via cet indice plaquettaire, mais les études s'y rapportant sont actuellement relativement peu contributives du fait de trop faibles effectifs. Néanmoins nous aborderons le cas des pathologies coronaires où certaines données peuvent être intéressantes [120].

Comme pour les autres paramètres plaquettaires, rares sont les publications s'intéressant aux TC. Cependant certains papiers se sont attachés à étudier les cas de WAS et de certaines macrothrombopénies.

Dans le cas des WAS, Sokolic *et al.* [151] s'est attaché à utiliser d'autres données plaquettaires que la microthrombopénie afin de mettre en évidence cette pathologie. En effet cette observation morphologique ne serait pas présente systématiquement chez les enfants souffrant de WAS. Afin d'essayer de distinguer ces cas d'un PTI et d'étayer le diagnostic de WAS, l'utilisation de l'IPF peut contribuer au diagnostic différentiel. Comme nous l'avons déjà rapporté, il met également en évidence que les indices plaquettaires par impédance ne sont pas systématiquement disponibles, il rapporte même 26 % de sa cohorte n'ayant pas de données impédance (VPM,...) du fait de la mauvaise distribution plaquettaire.

Comme nous l'avons décrit dans le paragraphe portant sur la physiopathologie de cette forme de TC, elle associe une part de destruction périphérique ainsi qu'une hypoproduction centrale avec tout de même un nombre normal de MK au frottis médullaire. Il a été montré dans cette récente étude que l'IPF des patients WAS était significativement plus bas que celui des patients souffrant de PTI. Ceci met de plus en évidence que la part d'hypoproduction médullaire est majoritaire expliquant la baisse de l'IPF. Néanmoins, il est intéressant de constater que l'ensemble des cas décrits dans cet article montrent des VPM systématiquement plus faibles dans le cas des WAS par rapport aux PTI. L'auteur justifie cependant l'utilisation et l'intérêt de l'IPF du fait que la littérature ne rapporte pas constamment la diminution de la taille plaquettaire dans les cas de WAS et/ou de XLT.

Une seconde publication rapporte l'intérêt de ce paramètre dans la prise en charge des TC, l'évaluant dans le cas de diverses macrothrombopénies en comparaison à des PTI [152]. Miyazaki *et al.* montre ainsi que l'IPF% est cinq fois plus élevé dans le syndrome MYH9 que dans les PTI et qu'il est également environ deux fois plus important pour d'autres macrothrombopénies. Ceci permet de montrer l'importance et l'intérêt potentiel de ce

paramètre dans les TC, Nous verrons dans la partie analysant les résultats de notre étude, l'utilisation de l'IPF dans la classification des TC.

Concernant le premier groupe d'études que nous avons décrit au début de ce paragraphe, certains auteurs se sont attachés à établir des seuils discriminants afin de distinguer le PTI des formes d'hypoproduction plaquettaire. En effet le diagnostic de PTI est relativement difficile et se base principalement sur le diagnostic différentiel. D'un point de vue biologique, les éléments à prendre en compte sont la recherche des anticorps anti-plaquettes, la mesure du taux de plaquettes réticulées ainsi que le taux de thrombopoïétine (TPO) [150]. Du fait du manque de performances des tests de détection des anticorps, il apparaît intéressant de s'aider d'autres éléments afin de participer au diagnostic différentiel. En effet les tests de recherche d'anticorps souffrent d'un manque de sensibilité bien que leur spécificité est très bonne [93][150].

Les études comparent ainsi les PTI à des causes d'hypoproduction plaquettaire, telles les hémopathies malignes où des formes de thrombopénies isolées dues à des pathologies aplasiantes. Ainsi différents seuils ont été publiés, au-delà desquels il est possible de suspecter un PTI. Ce dernier présentant un indice IPF significativement plus important que ces autres pathologies [150][153]. Nous ne rapporterons pas les détails de ces seuils, ceux-ci étant établis à l'aide de XE SYSMEX® et n'étant ainsi pas totalement comparables aux valeurs obtenues avec la dernière génération de XN.

Concernant le second groupe d'études, portant sur le suivi de la numération plaquettaire chez des patients en sortie d'aplasie, les auteurs ont également tenté de déterminer un seuil d'IPF permettant de classer les patients comme ayant ou non un besoin de transfusion prophylactique en plaquettes. Ainsi Van der Linden *et al.* [154] a défini un *cutoff* à 5,3 % (données XN SYSMEX®) afin de prédire la restauration de la numération plaquettaire. Ainsi les patients présentant un IPF supérieur à ce seuil à 8 jours de la greffe vont rétablir leur numération dans un délai d'environ deux jours. D'autres auteurs ont déterminés des seuils ainsi que des délais légèrement différents. Ces études ont néanmoins permis de distinguer l'IPF% et l'IPF#. En effet ce dernier ne présente pas d'intérêt en tant qu'indicateur prévisionnel car suit exactement les variations du compte de plaquettes. Seul le suivi de l'IPF% a été retenu.

Dans le cadre de la transplantation hépatique, où la production de TPO est diminuée, les patients présentent une chute de plaquettes accrue. Il a été ainsi observé que l'IPF% augmente dès le premier jour post-greffe jusqu'à un pic vers le cinquième jour alors que la numération plaquettaire n'augmente qu'à partir de trois ou quatre jours après ce pic [155].

Concernant le suivi des patients post-chimiothérapie, il est observé que ceux dont l'IPF dépasse le seuil de 10 % (données XN SYSMEX®) montrent une reconstitution de leur capital plaquettaire plus précoce que ceux dont l'IPF est en-dessous du seuil [153]. Une fois la normalisation effectuée, l'IPF décroît rapidement.

Cet indice plaquettaire, témoin d'un renouvellement et de la production mégacaryocytaire va pouvoir conduire à la remise en question de quelques phénomènes physiopathologiques. En effet certains auteurs ont montré qu'au cours de leucémies aigües lymphoïdes, l'IPF était augmenté contrairement à ce qu'on pourrait attendre. Le frottis médullaire ne montre généralement que très peu de MK chez ces patients. Il est ainsi possible de se poser la question de la mise en place d'une mégacaryopoïèse périphérique, au niveau hépatique et/ou splénique... de nouvelles voies de recherches peuvent probablement s'intéresser à la formation plaquettaire durant les leucémies aiguës [119].

Concernant le contexte des pathologies cardiovasculaires, les données ne sont pas toutes concordantes, certaines études ne montrant pas de corrélation entre l'IPF et l'activité plaquettaire et traduisant ainsi une absence de lien avec l'hyper réactivité plaquettaire en cas de syndrome coronarien traité par inhibiteur plaquettaire.

Néanmoins d'autres publications rapportent une corrélation inverse entre le taux de plaquettes réticulées et la réponse au traitement par prasugrel. Elles rapportent ainsi qu'un haut niveau d'IPF serait associé à une augmentation de la réactivité plaquettaire malgré le traitement antiplaquettaire. Des études complémentaires devraient confirmer cette donnée, qui pourrait être utilisée dans le cadre de la prise en charge des patients souffrant de pathologies myocardiques [156].

L'utilisation de cet indice IPF apparaît très prometteuse dans diverses thématiques cliniques, d'autant plus qu'il est disponible quelle que soit la numération plaquettaire et sans nécessiter d'analyses et de prélèvements biologiques complémentaires. De plus, il ne nécessite pas d'expertise ni d'évaluation du frottis sanguin, limitant ainsi le temps de mise à disposition du paramètre [151].

Fraction la plus fluorescente des plaquettes immatures (H-IPF)

Description technologique

Cet indice plaquettaire représente la fraction la plus fluorescente des plaquettes contenues dans l'IPF. Il est obtenu à partir du canal PLT-F et correspond, à l'image du P-LCR en impédance, à l'ensemble des événements situés après un certain seuil de fluorescence. La valeur de celui-ci, situé sur l'abscisse du graphique FSC en fonction de SFL, n'est pas communiquée par le fournisseur et n'est rendue que sous la forme d'un pourcentage.

Utilisation clinico-biologique

Aucune publication utilisant cet indice n'est actuellement disponible. Nous allons présenter dans la partie consacrée aux résultats de notre étude l'utilisation et l'intérêt potentiel de ce paramètre.

Indices plaquettaires de cytométrie (PLT-F-X, PLT-F-Y et PLT-F-Z)

Description technologique

Ces indices plaquettaires sont des éléments disponibles à partir du canal PLT-F et ne sont accessibles que dans le cadre de la recherche.

Ils correspondent aux données brutes du passage en cytométrie des plaquettes marquées par le fluorochrome spécifique PLT-F.

- PLT-F-X : correspond aux données relatives au grand angle de CMF. Il est ainsi associé à la structure des plaquettes.
- PLT-F-Y : correspond à l'émission de fluorescence du marqueur sur ces cellules. Il est associé à l'IPF.
- PLT-F-Z : correspond aux données relatives au petit angle de CMF. Il est donc associé à la taille des plaquettes.

Sur ce sujet, aucune bibliographie n'est disponible actuellement, davantage d'informations vont découler de leur utilisation au cours de notre étude.

Utilisation clinico-biologique

Comme signalé précédemment, en l'absence de publications à propos de ces indices, l'interprétation clinico-biologique n'est pas encore possible.

3.2.2 Frottis

Le frottis sanguin coloré au MGG est un test simple et accessible dans tout laboratoire de biologie médicale. Il permet l'apport d'informations essentielles dans le cadre des TC, que même les hématimètres les plus récents ne peuvent apprécier automatiquement. Il permet de décrire, dans tous les cas, la taille des éléments, leur structure mais également la présence, la répartition et la morphologie des granules alpha. En effet ces derniers sont les seuls à être colorés au MGG (granules denses et lysosomes étant non colorés) [9].

Certaines publications ont montré l'apport diagnostique de l'examen attentif d'un frottis sanguin dans les TC [157].

3.2.2.a Taille plaquettaire

Dans un premier temps, les automates étant limités dans l'évaluation de la taille plaquettaire dans certaines situations (interférences, plaquettes de grande taille), le frottis prend toute son importance afin d'évaluer leur dimensions et leur degré d'anisocytose.

Il est important, dans un contexte d'exploration d'une thrombopénie, de faire la différence entre une anisocytose physiologique d'une réelle dystrophie plaquettaire. En effet il est normal, chez un patient sain, d'observer une dispersion de la taille plaquettaire autour d'une valeur moyenne. Cependant, 1 % au plus des éléments ont une taille supérieure à 7 µm de diamètre (taille d'une hématie normocytaire).

Il est d'usage de déterminer la taille plaquettaire de manière semi-quantitative, par comparaison avec les hématies du patient. Néanmoins, certains auteurs et certains laboratoires ont accès à des appareils de mesure du diamètre cellulaire à partir d'une lecture informatique du frottis.

Il est communément accepté cette distinction de taille :

Les plaquettes sont dites macroplaquettes lorsque leur taille est inférieure à celle d'un globule rouge normocytaire mais plus grande qu'une plaquette normale (entre 2 et 3 µm). Les plaquettes géantes sont quant à elles d'un diamètre égal ou supérieur à celui du globule rouge de référence. Cette classification ne peut s'appliquer que lorsque les hématies sont de taille physiologique.

Les microplaquettes ont un diamètre inférieur à celui d'une plaquette normale et possède un aspect quasiment ponctiforme.

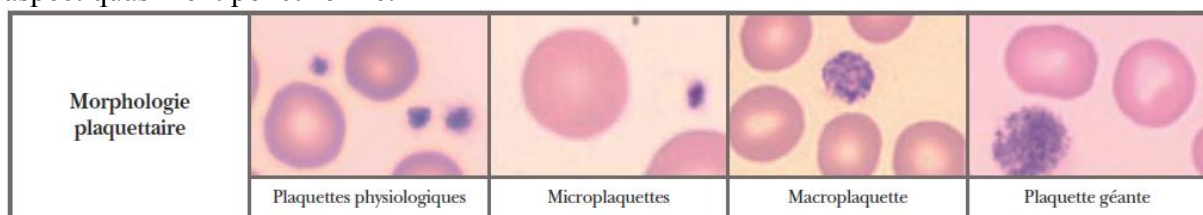


Figure 21 : Variations de taille plaquettaire en microscopie optique.

Source : d'après Latger-Cannard V. et Lecompte T. [9]

Il est ainsi possible de déterminer si le patient présente une dystrophie plaquettaire et le cas échéant à quelle catégorie il appartient. Dans ce travail nous avons décidé, comme précédemment décrit, de nous appuyer sur la récente classification morphologique de Noris *et al.* de 2014 [6] afin de distinguer l'ensemble des entités de TC au sein de quatre grands groupes :

Tableau VI: Classification des TC selon la taille plaquettaire.Source : Noris *et al.* [6]

Groupe	Pathologie
TC avec plaquettes de taille réduite	WAS XLT TAR CAMT CYCS
TC avec plaquettes de taille normale où modérément augmentée	FPD/AML TCPT XLTT ANKRD26 CTRUS vWF ETV6
TC avec plaquettes de taille augmentée	TUBB1 GPS FLNA GFI1B BSSm ITGA2B/ITGB3 ACTN1
TC avec plaquettes géantes	MYH9 BSS PRKACG

3.2.2.b Morphologie plaquettaire

La morphologie plaquettaire, également évaluée par l'étude du frottis sanguin, va permettre de souligner la dystrophie plaquettaire et ainsi aider au diagnostic différentiel.

Outre l'anisocytose décrite ci-dessus, l'analyse de la structure cellulaire est également indispensable. La coloration classique des frottis sanguin au MGG ne mettant en évidence qu'exclusivement les granules alpha et non les autres types granulaires, on peut ainsi observer la répartition de celles-ci au sein des plaquettes : [7]

- Des plaquettes « pâles » ou « grises » dépourvues de granules alpha suggèrent des pathologies de type syndrome des plaquettes grises ou thrombopénie liée à la mutation *GFI1B*. Cependant une hypogranulation peut s'observer dans d'autres pathologies type thrombopénie liée à l'X avec β -thalassémie ou encore la thrombopénie liée à la mutation *ANKRD26*.
- Des vacuoles intra plaquettaires peuvent s'observer dans des pathologies comme la thrombopénie liée à l'X avec β -thalassémie ou également le syndrome de Bernard-Soulier biallélique.
- La présence d'un unique granule alpha de grande taille peut également être observée, correspondant à des pathologies comme le syndrome de Paris-Trousseau ou la thrombopénie liée à la mutation *FLNA*.

3.2.2.c Morphologie des autres lignées cellulaires

La mise en évidence d'anomalies au niveau des autres lignées cellulaires sur le frottis sanguin, peut permettre d'orienter le diagnostic.

La présence d'une dysérythropoïèse, type anisocytose et même poïkilocytose, orientent généralement vers des TC impliquant le gène *GATA-1* [98]. Cependant on peut observer également une anisopoïkilocytose dans le cadre de la thrombopénie liée à la mutation *GFIIB*. Cette dystrophie érythrocytaire n'est réellement spécifique d'aucune TC, et à elle seule ne peut orienter le diagnostic.

Des dacryocytes sont quant à eux, sont observés au cours de l'évolution d'un syndrome des plaquettes grises. Ceci probablement dû à la myélofibrose s'installant au cours de la pathologie [7].

L'analyse de la population leucocytaire peut également apporter certains éléments d'intérêt. En effet dans le syndrome MYH9, le frottis sanguin montre la présence d'inclusions intra-leucocytaires basophiles, anciennement nommées pseudo corps de Döhle, spécifiques de cette pathologie. Ils ont été précédemment décrits, et sont majoritairement visibles au niveau du cytoplasme des polynucléaires neutrophiles.

3.2.3 Exploration fonctionnelle

L'exploration des fonctions plaquettaires, bien que représentant une partie importante de la démarche diagnostique, va brièvement être décrite dans ce paragraphe car n'étant pas l'objectif principal de cette thèse.

Les plaquettes sont des cellules ayant un rôle primordial dans le processus d'hémostase primaire. Leur anomalie quantitative et/ou qualitative peut entraîner des signes hémorragiques. C'est pourquoi l'ensemble des algorithmes décrits dans la littérature font référence, dans la première ligne de recherche, aux tests d'exploration fonctionnelle [5][98].

Ce type d'analyse reste délicat car fortement sujet aux variations pré-analytiques. Plus que pour la plupart des actes de biologie, l'exploration fonctionnelle plaquettaire est très sensible aux conditions pré-analytiques car ces dernières sont susceptibles d'activer, en partie, les plaquettes et ainsi d'amorcer le phénomène d'hémostase primaire. Ceci implique une extrême rigueur, du prélèvement à l'arrivée au laboratoire, dans le but d'obtenir des résultats fiables et interprétables [158].

Les conditions minimales requises sont : [159][160]

1. Sang prélevé sur tube citrate (109 ou 129 mmol/L).
2. Un transport au laboratoire préférable entre 30 minutes et 2 heures mais sans dépasser 4 heures.
3. Transport à température ambiante, tube fermé afin d'éviter des variations de pH liées à la fuite du CO₂ et en évitant au maximum l'agitation (pneumatique proscrit).
4. Ponction veineuse franche avec une aiguille de gros calibre (21 gauges) après élimination des premiers millilitres de sang. En effet ces derniers peuvent contenir davantage de facteur tissulaire et ainsi amorcer le processus de la coagulation.
5. Le patient doit être au repos depuis plus de 30 minutes et s'être abstenu de fumer, de manger depuis plus de 2 heures. En effet les chylomicrons peuvent interférer avec les tests photométriques.

Du fait de ces conditions délicates et du matériel analytique particulier nécessaire, ces études ne se réalisent, dans la plupart des cas, qu'en laboratoire spécialisé. Cependant aujourd'hui, il

existe de petits automates de biologie délocalisée permettant aux équipes de disposer de ce type d'information, mais leur usage reste délicat [159]. L'inconvénient majeur lié à ce pré-analytique est la quasi impossibilité d'externalisation de ce type d'analyse. En effet il est impossible d'envoyer dans de bonnes conditions un prélèvement à un centre de référence. De plus, ce type d'analyse requiert souvent un volume sanguin relativement important. Ceci peut être problématique chez des patients déjà thrombopéniques.

Ces deux grandes contraintes limitent l'utilisation de ces tests, d'autant plus que la standardisation pose elle aussi de gros problèmes [161].

Il est possible de catégoriser les analyses disponibles en deux groupes. Le premier correspondant à des tests globaux explore la capacité hémostatique du patient dans son ensemble alors que le second groupe s'attache spécifiquement aux fonctions intrinsèques des plaquettes.

3.2.3.a Tests globaux

Bien que non recommandés dans les différents algorithmes mis au point [5][98] du fait de leur manque de sensibilité et de spécificité, nous allons brièvement aborder le temps de saignement ainsi que le temps d'occlusion plaquettaire.

Temps de saignement

Le temps de saignement (TS) permet la mesure du temps nécessaire pour qu'une lésion superficielle de la peau arrête de saigner. Mis au point par Duke en 1910 et amélioré par Ivy, ce fut le premier test *in vivo* permettant l'exploration de l'hémostase primaire. Bien qu'*a priori* standardisé par l'utilisation d'un sphygmomanomètre et la définition d'une incision sur l'avant-bras, l'opérateur ainsi que l'âge et la température de la peau du patient sont autant d'éléments variables qui ne permettent pas d'assurer une réalisation optimale du test.

D'un point de vue technique, une incision est faite (au lobe de l'oreille pour le Duke et au niveau de l'avant-bras pour l'Ivy) au moment où un chronomètre est déclenché. Il est ensuite nécessaire d'aspirer le sang toutes les 30 secondes à l'aide d'un buvard afin de déterminer le moment où le saignement est stoppé. Il apparaît ainsi évident que cette détermination est de réalisation délicate et peu répétable ainsi que peu reproductible.

Acte devenu obsolète, il ne fait plus partie de la liste des actes de biologie médicale remboursés et ne fait donc plus partie de la NABM.

En sus de son défaut de performance, ce test est invasif ainsi que long à mettre en application. Il n'est aujourd'hui plus prescrit, ni réalisé dans la pratique courante [160][161].

Temps d'occlusion plaquettaire

Le temps d'occlusion plaquettaire est obtenu par le PFA-100®, automate permettant de reproduire *in vitro* l'ensemble des phénomènes de l'hémostase primaire. Ainsi il est capable d'évaluer la capacité d'activation des plaquettes en sang total et en conditions rhéologiques les plus proches possibles de la réalité. Cet automate permet en effet de reproduire les contraintes de cisaillement retrouvées dans la circulation sanguine.

Cet appareil est constitué d'un capillaire qui débouche sur une membrane recouverte d'agents pro-agrégants, ceux-ci permettant le déclenchement de l'adhésion et l'agrégation des plaquettes au niveau de l'orifice du capillaire. La fonctionnalité des plaquettes est déduite du temps mis pour obtenir l'occlusion complète de cet orifice.

Néanmoins ce test est sensible à différents éléments comme la thrombopénie, un hématicrite diminué ou encore des anomalies au niveau des glycoprotéines de surface et des granules plaquettaires ainsi que du facteur vWF [160][161].

Ce test est donc peu utilisé dans le cadre des TC, souffrant d'un manque de sensibilité et de spécificité. Il est principalement utilisé dans la détection de la maladie de Willebrand, du fait de sa sensibilité aux déficits en vWF.

Cependant, un de ses avantages principaux est sa faible consommation de sang, autorisant facilement l'étude d'échantillons pédiatriques.

3.2.3.b Analyse des fonctions plaquettaires

Les tests permettant l'analyse des fonctions plaquettaires permettent d'appréhender l'ensemble des composants des voies participant à l'activation plaquettaire.

Nous allons les distinguer en deux grands types. Dans un premier temps nous allons étudier les tests d'agrégation plaquettaire avant de nous intéresser à ceux utilisant un cytomètre en flux.

Comme nous l'avons détaillé dans la partie descriptive de l'ensemble des TC, certaines de ces pathologies peuvent impacter différents éléments et/ou différentes fonctions des plaquettes. Il est ainsi possible de retrouver l'effet de ces mutations via l'étude des fonctions plaquettaires.

Agrégation plaquettaire

Ce principe d'étude a été développé en 1962 par Born et O'Brien sur la base de la photométrie. Cette technique est rapidement devenue la référence en termes d'étude des fonctions plaquettaires.

Néanmoins d'autres techniques se sont ensuite développées afin de palier à certains inconvénients de la photométrie.

Le principe de chaque technique va être détaillé ci-dessous, cependant toutes se basent sur l'activation *in vitro* des plaquettes par l'ajout d'agonistes à différentes concentrations.

Agrégation par méthode photométrique

Première technique développée, elle utilise un photomètre permettant d'étudier la lumière transmise par une source lumineuse traversant des cuvettes réactionnelles. Ces réacteurs sont constitués de verre siliconé (n'induisant pas l'activation plaquettaire) maintenus sous agitation permanente à une température de 37°C.

Les variations du signal lumineux sont dues à l'agrégation des plaquettes. En effet on déclenche artificiellement celle-ci par l'utilisation d'activateurs à différentes concentrations.

Afin de ne pas interférer avec les résultats du test et afin que ceux-ci soient exploitables, les conditions pré-analytiques doivent être optimales. Elles ont été décrites dans un paragraphe ci-dessus.

D'un point de vue analytique, il est nécessaire de travailler avec un PRP (Plasma Riche en Plaquettes) obtenu par centrifugation d'un sang citraté. La transmission lumineuse correspondante est de 0 % du fait que les plaquettes libres sous agitation forment un milieu opaque. Un point 100 % de transmission lumineuse est déterminé par l'utilisation d'un PPP (Plasma Pauvre en Plaquettes) également obtenu par centrifugations successives d'un sang citraté afin d'éliminer au maximum les plaquettes.

Dans la suite de la procédure analytique, le technicien va ajouter un agoniste induisant l'activation plaquettaire et de ce fait l'agrégation des plaquettes. Ce phénomène va se propager à l'ensemble des éléments du milieu réactionnel, se traduisant par une augmentation progressive du passage lumineux et la formation d'une sigmoïde au niveau du tracé d'enregistrement, témoin d'une agrégation progressive de l'ensemble des plaquettes [159].

Les différentes étapes du processus sont détaillées dans le schéma ci-dessous.

Chaque cuvette réactionnelle permet ainsi l'étude d'un agoniste à une concentration donnée. Les appareils équipés de plusieurs canaux de mesure peuvent donc analyser différentes cuvettes simultanément et donc plusieurs agonistes à plusieurs concentrations.

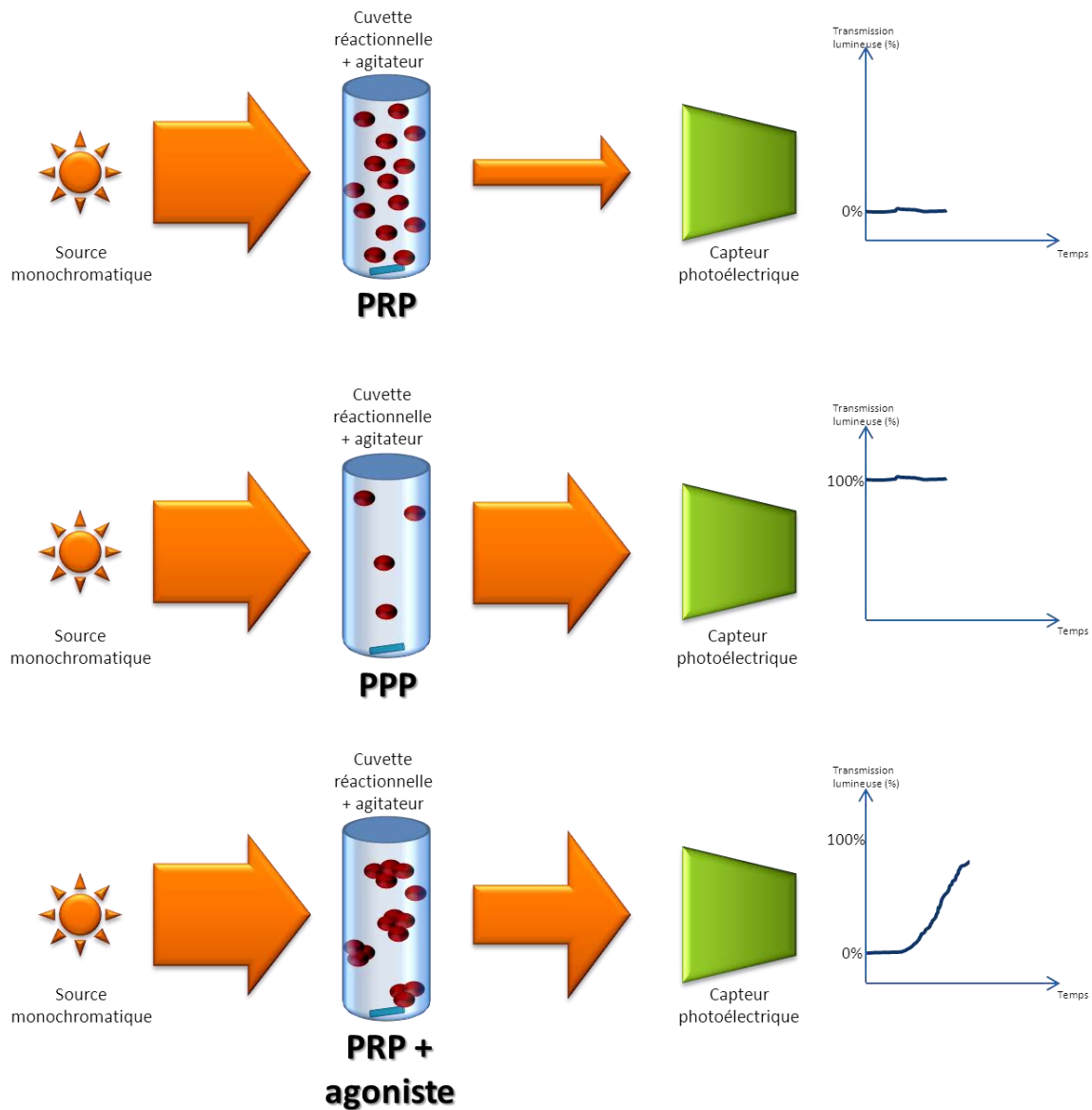


Figure 22 : Schéma du principe d'agrégation plaquettaire par méthode photométrique.

Il est également possible de conclure au caractère réversible ou irréversible de cette agrégation grâce à l'aspect de la courbe. En effet celle-ci est le reflet de la réponse cellulaire et dans les conditions normales, la libération du contenu granulaire traduit l'irréversibilité du phénomène. La courbe ne présente alors pas de partie décroissante, signalant la désagrégation des plaquettes. Ceci est schématisé sur le graphique ci-dessous (figure 23).

Les trois principaux paramètres étudiés sur ces courbes d'agrégation sont :

1. L'amplitude maximale de la transmission lumineuse. Un patient témoin présente généralement une variation de cette transmission supérieure à 60 % sans désagrégation,

2. L'allure générale de la courbe. Il est possible d'observer la présence de vagues avec certains agonistes ainsi qu'une décroissance témoin de la désagrégation en cas d'agrégation réversible,
3. Le temps de latence, principalement pour le collagène. Il correspond au temps nécessaire aux plaquettes pour adhérer aux fibres de collagène avant propagation de l'agrégation.

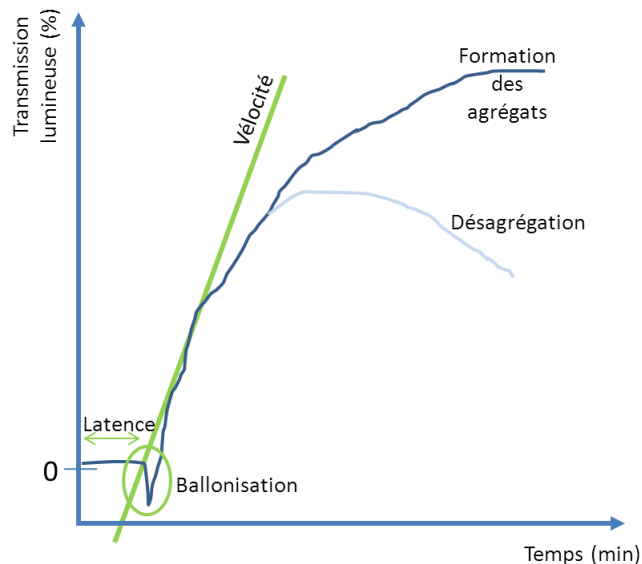


Figure 23 : Exemple de profils en agrégation plaquettaire en réponse à divers agonistes.

La courbe bleu foncé représentant une réponse irréversible, avec obtention d'un maximum d'agrégation. La courbe bleu ciel schématise une agrégation réversible avec une désagrégation des plaquettes qui s'opère au fil de temps. La ballonisation correspond à une diminution de transmission lumineuse en début de courbe, liée au changement de forme des plaquettes qui deviennent plus sphériques, limitant ainsi le passage du rayon lumineux.

Les principaux agonistes activateurs utilisés sont : [159][160]

- L'**acide arachidonique**. Celui-ci est métabolisé par le système des cyclo-oxygénases (COX) afin de former le thromboxane A₂ (TXA₂) et permet ainsi l'étude de la voie d'activation des plaquettes par le TXA₂.
- L'**adénosine diphosphate** (ADP). Cette dernière permet d'explorer l'agrégation plaquettaire via l'interaction avec les récepteurs membranaires de type P2Y (P2Y₁₂ et P2Y₁ majoritairement). L'aspect normal de la courbe présente une double vague ainsi qu'une dose critique en dessous de laquelle l'agrégation reste réversible. L'aspect irréversible traduit la mise en jeu du TXA₂ et la dégranulation des grains denses, contenant de l'ADP et produisant ainsi un effet autocrine responsable de la double vague.
- L'**adrénaline**, permet l'exploration de la voie d'activation plaquettaire par le biais des récepteurs adrénergiques.
- Le **collagène**. L'agrégation plaquettaire avec cet agoniste présente un temps de latence, généralement retrouvé entre 30 et 60 secondes. Deux mécanismes peuvent être explorés par cet activateur selon sa concentration. L'adhésion des plaquettes aux fibres de collagène va provoquer la sécrétion d'ADP par les grains denses ainsi que la synthèse de TXA₂ provoquant ainsi l'agrégation plaquettaire. Ceci s'observe à faible concentration de collagène. Lors de l'ajout d'une forte concentration, l'agrégation va être indépendante du TXA₂ par mobilisation du calcium intracellulaire.
- La **ristocétine**. Initialement utilisée en tant qu'antibiotique, la ristocétine a la capacité de provoquer la fixation du facteur vWF à la membrane plaquettaire via GPIIb. Il induit

ainsi l'agglutination plaquettaire. Il ne devrait pas être considéré comme un agoniste en tant que tel car n'induit pas d'agrégation des plaquettes.

Cette liste n'est pas exhaustive mais reprend cependant les cinq agonistes les plus couramment utilisés et qui sont de plus détaillés en tant qu'examen d'agrégation de première intention dans le dernier algorithme diagnostique des pathologies plaquettaires héréditaires publié en 2015[98].

Certaines publications font référence à ce type de tests dans le cadre des TC et les intègrent dans la démarche diagnostique, permettant d'obtenir davantage de données pour confirmer la pathologie. Ces informations sont résumées dans le tableau ci-dessous.

Concernant la pathologie de **Bernard-Soulier**, il a été décrit précédemment que les patients présentent un déficit au niveau du complexe récepteur GPIb/IX/V. Ceci se traduit par un défaut d'interaction des plaquettes avec le vWF. La réponse à la ristocétine est ainsi altérée, l'agglutination n'étant pas possible. Néanmoins la réponse aux autres agonistes reste normale [159].

Chez les patients souffrant de **pseudo-Willebrand plaquettaire**, les plaquettes présentent une glycoprotéine GPIb α ayant une forte affinité pour le vWF. Une agglutination en présence d'une très faible dose de ristocétine va être observée lors des tests [159].

Dans le cas du **syndrome des plaquettes grises**, les plaquettes présentent un manque de granules alpha. Ainsi un défaut d'agrégation a été observé avec différents agonistes mais principalement pour le collagène [12][159].

Tableau VII : Tableau récapitulatif des anomalies d'agrégation plaquettaire dans le cadre des TC.

Source : Gresele *et al.* [98]

Agoniste utilisé	Résultat	TC possible
Adrénaline	Agrégation altérée	ITGA2B/ITGB3 WAS FPD/AML
ADP	Agrégation altérée	GPS ITGA2B/ITGB3 WAS FPD/AML
Collagène	Agrégation altérée	GPS ITGA2B/ITGB3 WAS FPD/AML GATA1 FLNA
Acide arachidonique	Agrégation altérée	FPD/AML ITGA2B/ITGB3
Ristocétine	Agglutination altérée	Pseudo vWF BSS GATA1

Cependant cette technique d'agrégation plaquettaire par la méthode photométrique, bien que largement considérée comme méthode de référence, présente quelques inconvénients. En effet, son principal est le manque de standardisation découlant d'une reproductibilité médiocre. L'impact du technicien apparaît très important ainsi que les conditions

environnementales. De plus c'est une technique chronophage et grande consommatrice de sang. Il faut en effet environ 20 mL de sang frais afin d'effectuer les différentes manipulations. La prise en charge de patients thrombopéniques s'avère donc délicate. De plus, il n'est aujourd'hui plus recommandé d'effectuer une normalisation du PRP à 350 G/L de plaquettes, ceci afin de limiter les manipulations et ainsi limiter les risques d'activation plaquettaire pouvant interférer avec les tests [159].

En conséquence, d'autres méthodes ont été développées afin de palier à ces inconvénients.

Agrégation par méthode impédance

Développée dans les années 1980 cette méthode par impédance permet de travailler sur sang total citraté. Ainsi l'absence de préparation d'un PRP permet de s'affranchir d'étapes techniques pouvant provoquer une altération de l'échantillon par activation de la coagulation pré-test. De plus elle permettrait une meilleure standardisation des épreuves.

Le principe technique repose sur deux électrodes plongées dans un échantillon de sang total permettant une mesure de leur différence de potentiel. Ainsi au moment où l'activation plaquettaire est déclenchée, les plaquettes vont se fixer aux électrodes et induire une variation du potentiel électrique proportionnelle au pourcentage d'agrégation.

Différents appareils ont été développés permettant d'automatiser la phase analytique, contribuant à la standardisation. Certains peuvent également être utilisés en biologie délocalisée dans le cadre, par exemple, de l'étude de la résistance des patients aux traitements anti thrombotiques [159].

Cette technique impédance peut aussi être couplée à la bioluminescence, décrite ci-dessous.

Agrégation par méthode bioluminescente

C'est une technique qui permet d'étudier, comme en photométrie, la sécrétion granulaire ainsi que l'agrégation plaquettaire. Elle est basée sur le dosage de l'ATP sécrété par les granules denses lors de l'activation plaquettaire. Par l'utilisation des réactifs luciférase et luciférine, une production lumineuse est générée en présence d'ATP, traduisant la sécrétion granulaire. L'agrégation plaquettaire est quant à elle détectée de manière identique à la photométrie mais par l'utilisation d'une lumière infrarouge [159].

Un avantage est l'utilisation d'un échantillon de sang total citraté évitant, comme en impédance, des manipulations pré-analytiques.

Cytométrie en flux

Nous avons montré qu'un des inconvénients des tests d'agrégation plaquettaire est la difficulté de les réaliser chez des patients thrombopéniques. En effet ce sont des tests dits dépendants de la numération plaquettaire, principalement du fait de la nécessité d'un PRP de l'ordre de 300 G/L. Le principe de cytométrie en flux permettrait de s'affranchir de cette limitation tout en explorant diverses voies d'activation plaquettaire [162].

Analyse des glycoprotéines membranaires

Il existe différentes méthodes afin d'étudier les glycoprotéines présentes sur la membrane plaquettaire. En effet, il est possible d'utiliser des techniques électrophorétiques ou même immunochimiques, mais la cytométrie en flux permet une approche plus rapide et facile. Le principe de base étant l'utilisation d'anticorps monoclonaux spécifiques de la protéine recherchée et conjugués à différents fluorochromes [163].

Les principaux algorithmes proposent comme panel d'identification, dans le cadre des pathologies plaquettaires héréditaires, l'analyse des GPIIb/IIIa ainsi que GPIb/IX [98]. D'autres publications confirment également l'utilité de l'étude de ces protéines [163][162].

D'un point de vue technique, il est possible de les analyser dans différentes conditions d'activation des plaquettes. En effet, après activation, il y a augmentation de l'expression du complexe GPIIb/IIIa à la surface plaquettaire, du fait de la fusion des membranes granulaires avec la membrane cytoplasmique exposant ainsi davantage de glycoprotéines. Les granules alpha et denses possédant à leur surface ce complexe protéique [164]. De plus une fois activées, il est montré une diminution de l'expression à la surface de ces cellules du complexe GPIb/IX, redistribué au niveau intracellulaire [163].

En plus de l'intérêt de mettre en évidence des défauts ou des surexpressions glycoprotéiques à la surface des plaquettes, il est possible d'étudier le mécanisme d'activation des cellules par la comparaison des signaux pré- et post-activation.

Nous allons décrire dans les paragraphes suivants que la CMF peut également apporter des informations spécifiques aux différents types de granules plaquettaires.

Tableau VIII : Tableau récapitulatif des anomalies glycoprotéiques dans le cadre des TC.

Sources : [98][159][162]

Glycoprotéines	Résultat	TC
GPIIb/IIIa	Défaut d'expression	ITGA2B/ITGB3
	Augmentation d'expression	ACTN
GPIb/IX	Défaut d'expression	BSS MYH9 PRKACG

Analyse des granules alpha

Les granules alpha sont très hétérogènes et représentent la majorité de la population granulaire que ce soit en taille ou en nombre.

Dans le cadre de l'analyse des granules alpha, il est nécessaire de rappeler le contenu de celles-ci. En effet elles contiennent différentes molécules nécessaires à l'activation plaquettaire et à l'activité hémostatique dont les plus importantes : [164]

- Différents types de protéoglycane dont deux spécifiques des plaquettes : le facteur 4 plaquettaire (PF4) et la bêta-thromboglobuline (β TG).
- Des glycoprotéines d'adhésion dont du vWF, de la fibronectine ainsi que de la vitronectine.
- Des facteurs et cofacteurs de la coagulation : fibrinogène, facteur V / VII / XI / XIII, de la protéine S, du plasminogène ainsi que des kininogènes.
- Un grand nombre d'autres protéines ayant un rôle dans l'hémostase mais aussi dans l'inflammation et les interactions cellulaires...

Différentes méthodes sont utilisées afin d'étudier l'activité de ces granules alpha. La microscopie électronique est la méthode la plus aisée pour analyser la structure de ces éléments mais nécessite un matériel et des compétences particulières.

Des méthodes de mesure des composants PF4 et β TG sont utilisées mais la technique la plus courante s'attache à l'étude de la P-sélectine ou CD62P, composant important de la membrane de ces granules alpha. Comme pour l'analyse du CD63 des granules denses, le CD62P n'est pas exprimé sur la membrane des plaquettes en état de repos. Il s'y retrouve exprimé après activation plaquettaire. Un anticorps monoclonal utilisé en CMF permet de détecter cette expression et ainsi en comparaison avec un témoin, d'analyser le défaut ou non de la sécrétion granulaire alpha [165].

Certaines publications rapportent également l'intérêt potentiel de l'étude du GMP-33, composant de la membrane des granules alpha [164] comme marqueur spécifique de l'activité et de la présence de ces granules [163].

Analyse des granules denses

Dans le cadre de l'analyse des granules denses, il est nécessaire de rappeler le contenu de ces dites granules. Elles contiennent en effet différentes molécules intervenant au cours de l'activation plaquettaire : [164][166]

- Des ions comme Mg^{2+} et Ca^{2+} .
- La sérotonine, un important neurotransmetteur impliqué dans le processus vasoconstricteur lié à la coagulation ainsi que de l'histamine.
- Des nucléotides dont les plus importants sont l'ATP et l'ADP mais aussi du GTP et GDP.
- Des protéines situées sur la membrane de ces granules dont le CD63.

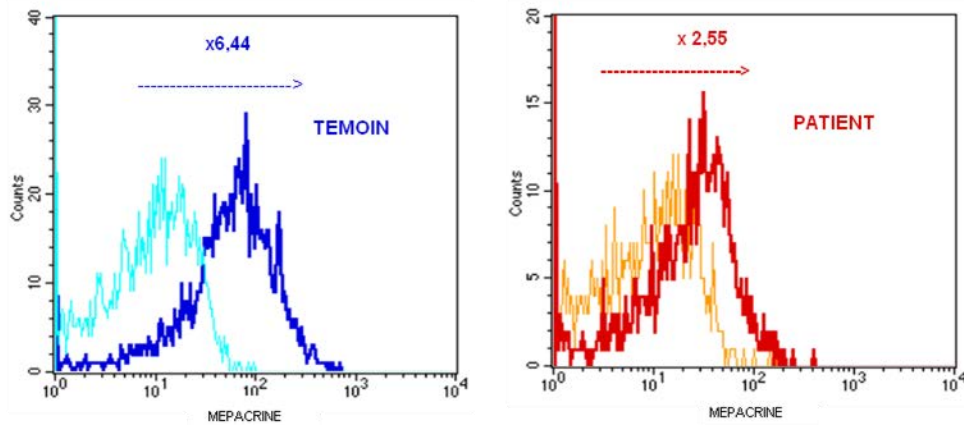
Différentes méthodes sont utilisées afin d'étudier ces granules denses. Chaque technologie possède ses propres avantages mais aussi ses inconvénients, c'est pourquoi il est recommandé de les combiner afin d'aboutir à un diagnostic définitif sur une possible pathologie impliquant ces granules [167].

Nous allons brièvement récapituler les différentes possibilités mais nous ne détaillerons que celles utilisant la cytométrie en flux, techniques les plus utilisées. Ces dernières sont en effet les plus simples de mise en place et ne nécessitent pas de matériel spécifique. Les laboratoires d'hématologie possédant aujourd'hui, pour la plupart, un équipement de cytométrie en flux.

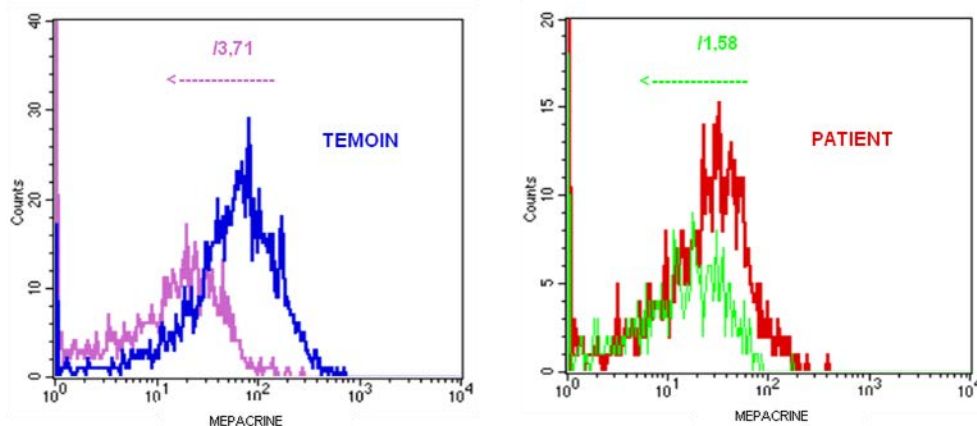
1. Le test à la **mépacrine**. La mépacrine est un dérivé acridine orange émettant une fluorescence verte lors de son excitation par un laser de 488 nm. C'est un composant capturé de façon sélective par les granules denses plaquettaires. C'est une technique initialement développée couplée à la microscopie à fluorescence afin de permettre la mesure du contenu de ces granules [168]. Cette technique assure l'étude de la phase de capture ainsi que de la phase de sécrétion granulaire.

La première étape consiste à incuber les plaquettes au repos avec la mépacrine. Cette dernière va être internalisée dans les granules denses uniquement et ainsi induire la fluorescence des plaquettes. L'analyse des différences de fluorescence va permettre d'explorer le phénomène de capture. La seconde étape consiste à activer les plaquettes par un agoniste, activant ainsi les plaquettes et la sécrétion granulaire. La mépacrine contenue dans les granules denses va être libérée dans le milieu extracellulaire et les plaquettes vont perdre leur fluorescence. On observe ainsi une diminution de l'émission de fluorescence au cours de cette seconde phase expérimentale [167].

Il est nécessaire d'utiliser un agoniste fort, la thrombine, afin d'activer la sécrétion granulaire. En effet la mépacrine a l'inconvénient de perturber la transduction du signal de dégranulation jusqu'aux granules denses.



Capture de mépacrine



Sécrétion de mépacrine

Figure 24 : Scattergrammes de CMF illustrant la technique d'étude des granules denses plaquettaires par le test à la mépacrine.

Les deux scattergrammes du haut représentent la phase de capture de la mépacrine par les granules denses. On observe, à gauche chez le témoin sain, une augmentation de fluorescence des plaquettes entre le début et la fin de l'incubation avec la mépacrine. Ceci traduisant son incorporation dans les granules denses (courbe bleu clair au début et bleu foncé à la fin). Sur la droite le patient ne présente qu'un léger décalage du pic de fluorescence (courbe orange au début et rouge à la fin) traduisant une faible capture de la mépacrine.

Les deux scattergrammes du bas représentent la phase de sécrétion de la mépacrine par les granules denses. Chez le témoin on observe bien une diminution de la fluorescence des plaquettes entre le début et la fin de l'expérience d'activation plaquettaire (courbe bleu au début et violette à la fin). Concernant le patient, on n'observe qu'une légère diminution (courbe rouge au début et verte à la fin) traduisant un défaut de sécrétion des granules denses.

- La mesure de l'expression de **CD63** par CMF. Le CD63 est une protéine située au niveau de la membrane des granules denses et des lysosomes plaquettaires. Ce test permet l'analyse de la phase de sécrétion granulaire. A l'état de repos les plaquettes sont incubées avec un anticorps anti-CD63 et la fluorescence résultante est mesurée. Lors de l'activation plaquettaire et de la sécrétion granulaire, déclenchées grâce à l'ajout d'un agoniste, les membranes des granules denses vont « s'accoler » à la membrane plaquettaire et ainsi augmenter la fluorescence par augmentation du nombre de CD63 exposés à l'immunomarquage anti-CD63[169].

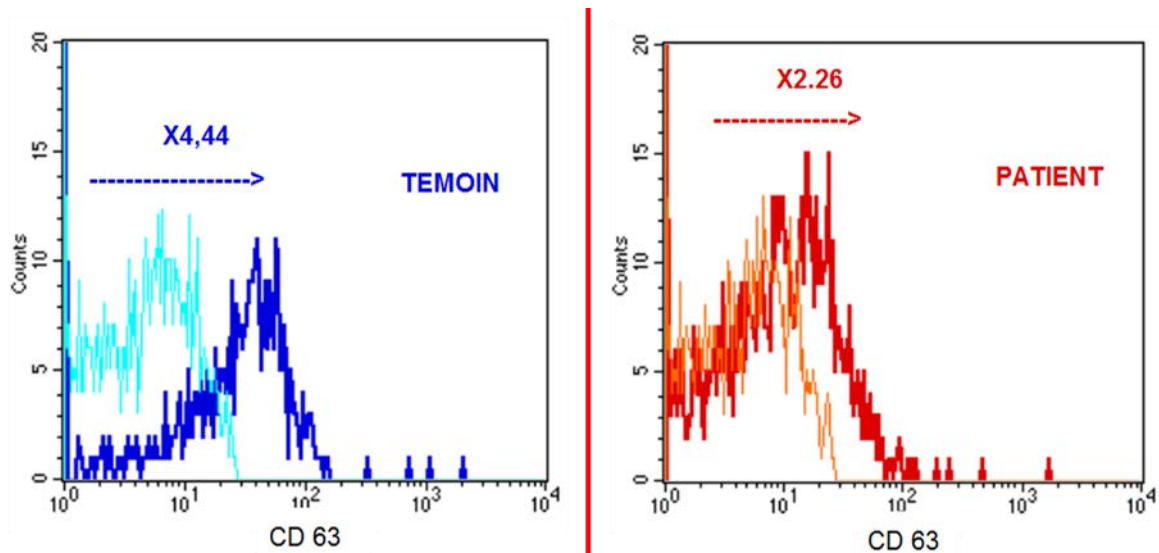


Figure 25 : Scattergrammes de CMF illustrant la technique d'étude des granules denses plaquettaires par immunomarquage anti-CD63.

Le scattergramme témoin, de gauche, illustre l'intensité de fluorescence de l'anticorps anti-CD63 à l'état de repos en bleu clair et après activation en bleu foncé. On observe un décalage vers la droite de la courbe, témoin d'une augmentation de fluorescence et donc d'une augmentation de CD63 à la surface des plaquettes. Le scattergramme de droite, d'un patient, montre en orange l'état basal et en rouge la fluorescence après activation. On observe ainsi un très faible décalage, signalant un défaut de sécrétion des granules denses.

3. **L'agrégation par bioluminescence**, énoncée dans le paragraphe précédent, a l'avantage de pouvoir évaluer l'agrégation plaquettaire ainsi que la sécrétion des granules denses. Néanmoins elle ne permet pas l'étude du mécanisme de capture de ces granules ni l'étude des autres nucléotides granulaires [167].
D'un point de vue technique, il est nécessaire, dans un premier temps, de provoquer l'agrégation plaquettaire par le biais de l'ajout d'un agoniste dans le milieu réactionnel. De ce fait il y a sécrétion du contenu granulaire et plus particulièrement de l'ATP contenu dans les granules denses. Cet ATP va réagir avec la luciférine et sous l'action de la luciférase une émission lumineuse est produite [170]. Afin de quantifier cette lumière et ainsi permettre la quantification de l'ATP sécrété, il est nécessaire d'ajouter en fin de réaction un contrôle interne constitué d'une concentration connue d'ATP exogène et d'en déterminer l'émission lumineuse [159][171].
4. L'étude de la **sérotonine** plaquettaire. Cette technique permet l'étude des phénomènes de capture ainsi que de sécrétion des granules denses. Cependant elle utilise le marquage de la sérotonine par du carbone 14 (^{14}C) radioactif et nécessite donc du matériel ainsi qu'un environnement adapté, spécifique et très coûteux [167].
Dans un premier temps il est nécessaire d'incuber les plaquettes en présence de sérotonine radiomarquée (5-HT*). Les granules denses incorporant celle-ci, il sera possible de déterminer la quantité de 5-HT* capturée par les plaquettes en faisant la différence de radioactivité avant et après incubation. Ceci permet l'étude de la phase de capture. Dans un second temps l'agrégation plaquettaire est déclenchée par un agoniste et la quantité de 5-HT* pourra être déterminée en fonction de la radioactivité. Ceci permet l'étude de la phase de sécrétion [170].
Néanmoins, certains travaux récents développent la possibilité d'étudier ce mécanisme de la sérotonine via CMF afin de s'affranchir du radiomarqueur. Ainsi plusieurs équipes travaillant avec des anticorps monoclonaux murins anti-sérotonine humaine

ont pu étudier les phénomènes de capture et de sécrétion par cytométrie en flux [166] [172].

5. L'utilisation d'un **microscope électronique à transmission** permet l'observation, la numération et la caractérisation directe de ces granules denses. Il est ainsi possible de démontrer la présence ou la diminution du nombre de ces granules ainsi que d'étudier leur contenu. Cependant ceci nécessite l'utilisation d'un matériel ainsi que des compétences spécifiques afin d'obtenir et interpréter les images obtenues [167].

En pratique courante, l'expression du CD63 n'étant pas spécifique des granules denses (car également présent sur les lysosomes), le test à la mépacrine étudiant les mécanismes de sécrétion et de capture est privilégié [163].

Tableau IX : Tableau récapitulatif des anomalies granulaires dans le cadre des TC.

Source : [98]

Type de granule	Résultat	TC
Alpha	Défaut de sécrétion	GPS WAS
Dense	Défaut de sécrétion	WAS FPD/AML FLNA

3.2.4 Génétique

L'analyse génétique est la technique qui permet de définir de manière fiable et précise la pathologie en cause chez un patient par la détermination de la mutation du gène en cause.

Dans les algorithmes, cette recherche n'est décrite qu'en troisième ligne mais permet de confirmer et caractériser une TC [98]. Néanmoins aujourd'hui, avec les progrès et la généralisation des approches génétiques par séquençage de nouvelle génération (NGS), ce type d'exploration tend à se développer fortement. Ceci d'autant plus que les gènes impliqués dans ces pathologies rares sont de plus en plus décrits et identifiés, bien qu'actuellement il existe 21 gènes répertoriés responsables de TC [173]. En effet durant ces quinze dernières années, la recherche médicale sur ces pathologies s'est fortement développée, expliquant la mise en évidence de cette hétérogénéité de formes pathologiques.

Cet attrait de la recherche pour les TC peut en partie s'expliquer par la possibilité d'adapter la prise en charge des patients grâce à la détermination génotypique de la pathologie. Bien que peu bruyantes, certaines formes peuvent s'avérer importantes à surveiller du fait de la possible apparition de complications. Les plus redoutées sont les transformations en hémopathies malignes, comme par exemple pour le syndrome FPD/AML ou encore *ANRKD26*, pour lesquelles il existe un risque de développement de syndromes myélodysplasiques et de leucémies aiguës. La détection de la mutation a donc un intérêt diagnostique fort afin de mettre en place une surveillance adaptée [173]. Dans certains cas, et plus particulièrement dans le cadre du syndrome FPD/AML, il peut être proposé au patient et à l'ensemble de sa famille, une enquête génétique permettant de sélectionner les individus susceptibles de pouvoir fournir un greffon de moelle osseuse en cas de survenue de leucémie. En effet il est nécessaire, le cas échéant, de recourir à un greffon non muté pour *AML1*, mutation non systématiquement recherchée dans le processus de compatibilité des tissus.

Il est également important de préciser le diagnostic par l'approche génétique dans le cadre de l'évaluation des risques de transmission de la mutation à la descendance [5].

En sus de cet aspect diagnostique, nous avons précisé dans le chapitre précédent, portant sur ces pathologies, qu'il existe pour certaines d'entre elles une corrélation phénotype / génotype concourant à l'intérêt des recherches mutationnelles. Ainsi selon la mutation retrouvée dans le gène d'intérêt, le patient peut bénéficier d'une surveillance renforcée. Par exemple dans le syndrome MYH9, les patients souffrant d'une mutation dans le domaine de tête sont davantage susceptibles de développer des atteintes glomérulaires et auditives que ceux ayant une mutation dans le domaine de queue de ce gène *MYH9* [64][173].

Actuellement en France, le C.R.P.P. (Centre de Référence des Pathologies Plaquettaires) possède un réseau territorial, de centres de référence et de compétence, permettant d'assurer l'ensemble des recherches mutationnelles dans ces divers centres français. Le développement de plateformes d'analyses moléculaires dédiées aux TC est un des objectifs national du C.R.P.P.

L'avantage principal de ce dernier type d'analyse est le pré-analytique. En effet, nous avons montré dans le paragraphe précédent que les techniques d'étude des fonctions plaquettaires par agrégation et cytométrie souffrent d'un pré-analytique très contraignant et sensible. Les plaquettes étant des éléments cellulaires fragiles, il faut éviter leur activation et/ou leur agrégation lors du transport, limitant très fortement l'externalisation de ce type d'analyse.

Dans le cadre de la génétique, les conditions de transport sont beaucoup plus simples. En effet seul un échantillon de sang anticoagulé par EDTA est nécessaire, stocké à température ambiante et envoyé au centre de référence dans des délais moins critiques qu'en agrégation. Il est également possible de conserver congelé de l'ADN du patient, dans l'attente des résultats des premiers tests d'exploration. Ceci permet d'éviter la réalisation d'analyses génétiques dans un contexte qui ne s'avère pas totalement cohérent avec une TC.

4 OBJECTIFS

L'objectif principal de ce travail est d'améliorer la démarche diagnostique des TC, et ce en utilisant des paramètres rapidement et largement disponibles. Les paramètres automatisés de l'hématimètre XN SYSMEX® constituent une approche novatrice dans ce domaine.

Différents algorithmes ont déjà été publiés afin d'orienter la démarche diagnostique, devant une thrombopénie d'origine inconnue, vers la détection d'une TC ou à l'inverse pour permettre de les exclure [5][98]. Cependant ces différentes approches se basent généralement sur la détermination de la taille plaquettaire, paramètre difficilement appréhendable dans le cas des TC. Aucun arbre décisionnel n'a actuellement été publié afin de rendre compte de cette taille de manière fiable et aisément reproductible. En effet il est souvent décrit en rapport avec la taille des hématies ou encore de manière chiffrée par une mesure directe des plaquettes au microscope. Ces diverses propositions souffrant d'un côté d'un manque de reproductibilité inter-opérateur et de l'autre d'un temps d'analyse non négligeable.

La caractérisation moléculaire et génétique de l'ensemble de ces formes a fait l'objet de nombreuses recherches ces dernières années [12][62], néanmoins très peu de données sont disponibles concernant les paramètres obtenus par les hématimètres de première ligne. La majorité des publications s'intéressent à la taille plaquettaire, évaluée de diverses façons, mais avec des conclusions diagnostiques limitées. Cependant un intérêt majeur de ces informations de l'hémogramme est le fait qu'elles sont obtenues par un acte peu invasif (en comparaison à l'étude médullaire par exemple) et de surcroît de manière automatisée, limitant le temps technique nécessaire. L'utilisation d'un matériel non réservé aux centres de référence et disponible dans de très nombreux laboratoires est également un atout non négligeable [139]. Divers indices plaquettaires sont en effet disponibles en routine grâce à l'utilisation de l'hématimètre XN SYSMEX® couplé à son module PLT-F. Il est possible d'évaluer les éléments plaquettaires via le canal impédance classique mais également par le canal de fluorescence spécifique.

L'étude que nous exposons dans ce travail est **multicentrique** et **rétrospective**. En effet nous analysons l'ensemble des paramètres précédents chez des patients diagnostiqués souffrant de thrombopénie constitutionnelle. Ces derniers sont suivis dans divers centres de référence (ou de compétence) des pathologies plaquettaires. Nous allons les comparer à une population témoin, constituée de patients sains de toute pathologie plaquettaire.

Les centres participant à l'étude sont :

- Le CHRU de Nancy, centre de compétence des pathologies plaquettaires.
- Le CHRU de Toulouse, centre de référence des pathologies plaquettaires
- Le CHRU de Nantes, centre de compétence des pathologies plaquettaires.
- Le CHRU de Lyon, centre de référence des pathologies plaquettaires.
- Le CHRU de Strasbourg, centre référence des pathologies plaquettaires.
- Le CHU Kremlin-Bicêtre (AP-HP), centre de référence des pathologies plaquettaires.

Les objectifs de notre étude sont :

1. Evaluer les paramètres de recherche encore non autorisés en routine, par le biais d'un processus de validation de méthode. Ceci nous permet d'étudier leur comportement tant sur le plan de la stabilité que sur le plan analytique.
2. Etablir, à l'aide de l'analyse des données relatives aux sujets témoins, des valeurs témoins pour ces indices plaquettaires. En effet très peu d'entre eux ont fait l'objet d'évaluations car étant réservés à un usage de recherche. Pour ceux d'entre eux pour lesquels des données bibliographiques sont disponibles, nous allons pouvoir nous y comparer et évaluer les variabilités inter-centres voire inter-méthodes.
3. Etudier la distribution de ces paramètres pour chaque thrombopénie constitutionnelle et les comparer à celle des sujets témoins. L'objectif est ainsi d'établir, pour chaque TC ou du moins pour chaque groupe de TC, une « identité paramétrique » par l'utilisation de ces indices plaquettaires.
4. Permettre de préciser le diagnostic différentiel avec le PTI. En effet c'est avec cette pathologie que les différences, cliniques et biologiques, peuvent être les plus difficiles à faire. C'est un point qui a été largement décrit dans la première partie de ce travail. Ainsi nous allons tenter d'établir « l'identité paramétrique » du PTI et de la comparer à celles déterminées pour les différentes thrombopénies constitutionnelles mais aussi à celle obtenue pour les sujets témoins.
5. Etablir une démarche diagnostique, basée sur l'interprétation de ces paramètres plaquettaires, afin d'orienter le patient vers une TC ou au contraire éliminer cette hypothèse. Ces paramètres étant disponibles en pratique courante et dans l'ensemble des laboratoires disposant de cet hématimètre de première ligne, l'application clinico-biologique serait très intéressante devant une thrombopénie non expliquée. Cette étape de dépistage permettrait ainsi d'apporter des éléments pour faire la différence avec un possible PTI. De plus l'utilisation de ces paramètres n'entraîne que très peu de coûts supplémentaires, mais permettrait de mieux orienter le patient vers des explorations secondaires spécialisées. Cette étape d'orientation permettrait ainsi une utilisation raisonnée et davantage ciblée de ces analyses coûteuses et hyperspécialisées. Le diagnostic moléculaire serait également facilité grâce à un meilleur ciblage et une meilleure caractérisation phénotypique des pathologies, permettant de réduire considérablement le panel de recherches de mutations à uniquement quelques gènes d'intérêt.

5 MATERIELS

5.1 Automate utilisé

Comme nous l'avons vu précédemment, cette étude est multicentrique et regroupe ainsi différents laboratoires hospitaliers. Ceux-ci étant tous équipés d'un hématimètre XN SYSMEX® couplé au module PLT-F.

Concernant le centre principal de recrutement, CHRU de Nancy, l'équipement comprend une chaîne de trois modules XN dont deux possèdent le canal optionnel PLT-F.

Le canal impédance, systématiquement présent sur les XN SYSMEX®, présente de nombreuses lacunes comme nous les avons exposées précédemment. La principale difficulté à l'utilisation de ce dernier est l'impossibilité d'obtenir des valeurs pour les différents paramètres plaquettaires en cas de distribution anormale de courbe de répartition. Ceci étant très fréquemment le cas pour les pathologies type thrombopénie constitutionnelle, nous allons nous attacher à exploiter les informations fournies par le canal fluorescent spécifique. Néanmoins l'impédance permet d'obtenir tout de même certaines données rendues quel que soit l'aspect de la courbe de distribution.

Ainsi nous allons nous concentrer sur l'utilisation de ce nouveau marqueur fluorescent qui a été décrit comme le mieux corrélé à la cytométrie en flux, concernant la numération plaquettaire. D'un point de vue technologique, l'ensemble des éléments est disponible dans la précédente partie s'y consacrant (§ 3.2.1).

Dans le cadre de la démarche qualité et d'accréditation NF EN ISO 15189, l'ensemble des automates ont été calibrés lors de leur mise en place et suivis par des programmes de CIQ et d'EEQ au cours de leur utilisation quotidienne.

Néanmoins dans le canal impédance seuls les paramètres PLT-I et VPM sont suivis et concernant le canal PLT-F, seule la numération est concernée. Actuellement un moyen de suivre l'évolution des autres paramètres de ce dernier canal, est l'extraction manuelle des fichiers bruts du passage de chaque CIQ et leur exploitation via des cartes de Levey-Jennings.

L'ensemble des centres participant à l'étude s'engagent à respecter les exigences normatives en terme de contrôle qualité.

Concernant le centre CHRU de Nancy, les CIQ utilisés sont des contrôles fabricants (CIQ XN CHECK) constitués d'éléments cellulaires humains au sein d'une matrice artificielle, assurant la conservation de l'échantillon à ses fins de CQ. Les trois niveaux (valeurs basses, normales et hautes) sont analysés de façon bi-journalière et permettent une comparaison directe des différents analyseurs XN de la chaîne. L'utilisation de ces contrôles permet également l'accès à l'externalisation des valeurs du laboratoire afin de permettre une comparaison par rapport au groupe de pairs, laboratoires étant équipés du même couple automate / réactif. Ces contrôles internes de qualité externalisés permettent ainsi d'évaluer la justesse de la méthode.

Concernant les évaluations externes de la qualité, actuellement le laboratoire ne possède pas programme de suivi du canal fluorescent. Ainsi la numération plaquettaire en PLT-F ne peut être évaluée.

Dans le cadre d'une démarche qualité au sein des laboratoires du CHRU de Nancy, l'hématimètre XN SYSMEX® a été accrédité sur l'ensemble des paramètres de première ligne, comprenant la numération plaquettaire en impédance (PLT-I), le volume plaquettaire moyen (VPM) ainsi que la numération plaquettaire en fluorescence (PLT-F).

5.2 Inclusions des sujets

5.2.1 Témoins

Nous avons indiqué à diverses reprises, que l'ensemble des publications exploitant les indices plaquettaires, montrent des variabilités non négligeables dans les résultats et les seuils présentés. Celles-ci sont expliquées en partie par la diversité des moyens et méthodes employés afin d'obtenir les données. Les automates sélectionnés n'étaient pas identiques, illustrant l'impossibilité de comparer les résultats obtenus avec des technologies différentes. Néanmoins, dans notre étude chaque laboratoire inclut utilise le même hématimètre, validé et sous contrôle d'un système qualité engagé dans la démarche d'accréditation NF EN ISO 15189. Ainsi il n'est pas apparu nécessaire de comparer des témoins au niveau de chaque centre recruteur.

Ces données témoins sont obtenues via des échantillons sanguins de volontaires sains, informés oralement de l'utilisation de leur prélèvement dans le cadre d'une étude de recherche. Les résultats biologiques ne leur ont pas été rapportés d'autant plus que ces derniers n'affectent pas leur prise en charge médicale. Par voie de conséquence aucun contrat de consentement n'a été nécessaire.

Les cas témoins sont ainsi uniquement sélectionnés et analysés au sein du centre du CHRU de Nancy. Ils se composent de 31 sujets dont 15 hommes et 16 femmes.

Leurs caractéristiques, âge/sexe/habitus tabagiques ainsi que leur répartition pour les différents paramètres seront décrits dans la partie explicitant les résultats de ce travail.

D'un point de vue pré-analytique les prélèvements ont été effectués conformément aux bonnes pratiques de prélèvement et ont utilisés des tubes composés d'anticoagulant type EDTA K2. L'analyse sur la chaîne analytique XN SYSMEX® a été effectuée dans l'heure suivant la ponction veineuse.

5.2.2 Patients

L'ensemble des patients de cette étude ont été inclus par divers centres de référence français, spécialisés dans la prise en charge de patients souffrant de pathologies plaquettaires.

Dans le cadre de ce projet, nous avons mis en place une feuille de renseignements obligatoire à toute inclusion, regroupant différentes informations clinico-biologiques.

Ce document est présenté en ANNEXE 1 et est envoyé sous format *.pdf avec les fichiers informatiques de données pour chaque patient inclus dans l'étude.

Thrombopénie constitutionnelle

L'ensemble des patients, inclus dans cette étude, présentent une thrombopénie constitutionnelle dont les arguments diagnostiques ont été démontrés. La liste des pathologies concernées a été établie dans la première partie de cette thèse. La plupart des cas inclus bénéficient d'une exploration génétique, en sus des arguments cliniques et biologiques.

Ces patients ont été inclus lors de leurs consultations au sein des différents CCRPP et CCPP

Concernant le CHRU de Nancy, les données des patients ont été collectées depuis la mise en place du nouvel automate XN SYSMEX® en novembre 2013. Sont ainsi inclus les patients bénéficiant d'un diagnostic depuis cette période, tout comme les patients réévalués et/ou suivis dans les autres centres dans le cadre de leur TC. Les autres centres ont été inclus de manière séquentielle, au gré des nouvelles installations de ce type d'hématimètre. La

démarche de recrutement des patients est identique à celle de Nancy, et l'ensemble des cas est ainsi vu de manière rétrospective et validés par la positivité de la mutation recherchée.

Tableau X : Tableau de répartition des inclusions de patients TC par centre.

	Nancy	Toulouse	Strasbourg	Nantes	Paris Bicêtre
MYH9	8	8	1	-	3
BSS	2	-	-	1	-
GPS	3	1	-	-	-
FLNA	1	-	-	-	-
FPD/AML	3	-	-	-	-
ANRKD26	-	-	1	-	-
WAS / XLT	2	-	-	-	-

Les principales caractéristiques de ces patients, du diagnostic à leurs valeurs paramétriques, sont décrites dans un tableau ci-après.

Purpura thrombopénique immunologique

Nous avons également impliqué dans cette étude, l'ensemble des patients souffrant d'un PTI. Nous avons en effet vu précédemment que c'est avec cette affection que le diagnostic différentiel est le plus délicat, c'est pourquoi nous avons souhaité évaluer la pertinence de la mise en place d'un algorithme décisionnel.

Treize patients ont été inclus, dont 5 inclus par Nancy, 5 inclus par Lyon et 3 inclus par Strasbourg.

L'intégralité de ces patients a été diagnostiquée souffrant de PTI sur la base des dernières recommandations, détaillées dans un chapitre précédent (§ 2).

De même, la description de ce groupe de patients sera détaillée dans le tableau XXXI.

6 METHODES

L'ensemble des principaux éléments de notre étude sont brièvement décrits en ANNEXE 2 sous la forme d'un protocole destiné à la paillasse technique d'hématologie-cytologie.

Il reprend les principaux éléments d'inclusion des patients, des conditions pré-analytiques souhaitées ainsi que les données informatiques nécessaires à faire parvenir au laboratoire d'hématologie biologique du CHRU de Nancy centralisant l'étude.

6.1 Paramètres utilisés

Dans ce travail, et afin d'élaborer notre démarche diagnostique, nous utilisons principalement les indices plaquettaires issus de la fluorescence, ceci afin de s'affranchir des limitations décrites pour l'impédance.

Les paramètres étudiés ont été décrits dans une partie précédente (§ 3.2.1) et sont résumés ci-dessous :

Le canal impédance fournit le paramètre d'intérêt suivant :

- P-MFV : volume plaquettaire le plus fréquent

Le canal de fluorescence permet d'obtenir les paramètres suivants :

- PLT-F : numération fluorescente
- IPF (% et #) : plaquettes immatures fluorescentes
- H-IPF : fraction la plus fluorescente des plaquettes immatures
- PLT-F-X : indice de structure
- PLT-F-Y : indice d'intensité de fluorescence
- PLT-F-Z : indice de taille

Dans notre démarche nous nous sommes basé sur la classification publiée par Noris *et al.* [6] mais nous l'avons néanmoins vérifiée par l'étude morphologique du frottis sanguin de quelques patients. En effet, pour certains patients nous avons classé les plaquettes en différents groupes en fonction de leurs tailles :

1. Les petites plaquettes, plus petites qu'une plaquette normale,
2. Les plaquettes de taille normale,
3. Les macroplaquettes, considérées comme ayant une taille inférieure ou égale à celle d'une hématie,
4. Les plaquettes géantes, ayant une taille supérieure à celle des globules rouges.

Nous avons donc choisi de réaliser ce décompte par groupe de « taille », plutôt que par la mesure exacte des dimensions plaquettaires à l'aide d'oculaires micrométriques, principalement par soucis de simplicité organisationnelle mais également afin de pouvoir transposer nos résultats dans le plus grand nombre de laboratoires possible du fait de l'utilisation d'un matériel non spécifique.

Cependant, du fait de l'impossibilité à réaliser ces mesures sur l'ensemble des patients, ces résultats ne sont pas rapportés dans ce travail.

6.2 Pré-analytique

6.2.1 Délai pré-analytique

Concernant le pré-analytique, l'étude des plaquettes est relativement exigeante. Ceci d'autant plus si une analyse de leurs fonctions est demandée.

Ainsi pour satisfaire les besoins de l'hémogramme il est recommandé de réaliser l'analyse dans les heures qui suivent la ponction veineuse. Différentes sociétés savantes ont établies que l'étalement du frottis sanguin doit être réalisé au mieux entre deux et six heures tout comme l'hémogramme qui ne doit pas dépasser un délai de réalisation de six heures. Ces délais ont été établis pour un transport à température ambiante [174][175].

Certains auteurs ont également publié des données pré-analytiques dans le cadre de l'étude du nouvel automate XN SYSMEX®. Celles-ci rapportent que la numération plaquettaire est stable durant 48 heures, à température ambiante comme à 4°C, pour des numérations normales. Dans le cas de thrombopénies, le délai est diminué et la stabilité est de l'ordre de sept heures [109]. Cette publication a l'avantage de s'adapter spécifiquement à cet automate et en particulier à l'utilisation du canal PLT-F. Une récente étude italienne concernant cet automate et ses différents canaux, définit une limite d'analyse de trois heures, au-delà desquelles certains paramètres (érythrocytaires principalement mais également le VPM) sont modifiés de manière significative [176].

Néanmoins ces données ne sont valables que pour le chiffre de la numération plaquettaire et non pas pour l'ensemble des paramètres que nous souhaitons étudier ici. Nous avons ainsi réalisé une étude de stabilité afin d'observer le comportement de l'ensemble de ces indices en fonction du temps.

Les résultats de cette expérience seront détaillés dans un chapitre suivant (§ 7.1.3), toutefois nous avons utilisé un délai pré-analytique inférieur à trois heures pour l'ensemble des cas inclus.

6.2.2 Choix de l'anticoagulant

De manière habituelle l'hémogramme est prélevé dans des tubes contenant un anticoagulant type EDTA. C'est l'agent permettant classiquement la meilleure conservation des cellules sanguines.

Les fournisseurs proposent deux sels différents : EDTA K2 et EDTA K3. Ces derniers diffèrent selon certains critères :

1. Les tubes contenant l'EDTA tri-potassique (EDTA K3) sont en verre et l'agent anticoagulant est sous forme liquide.
2. Les tubes contenant l'EDTA di-potassique (EDTA K2) sont en plastique et l'agent anticoagulant est vaporisé de manière sèche sur les parois.

Il est ainsi aisé de comprendre que l'utilisation de l'EDTA K3 entraîne un risque de dilution de l'échantillon de par la nature même de l'anticoagulant. L'ICSH et d'autres sociétés savantes d'hématologie recommandent l'utilisation de l'EDTA K2 pour la réalisation en routine des hémogrammes [177][178]. Diverses différences ont été mises en évidence entre les sels comme par exemple :

- Une diminution de la taille des hématies liée à l'augmentation de la concentration en EDTA ainsi qu'à la différence de pH entre les deux types de tubes. Ainsi il est rapporté une diminution du volume globulaire moyen des globules rouges avec l'EDTA K3.
- Une variation de taille des cellules au cours du temps plus importante avec le sel tri-potassique.

- Une dilution de l'ensemble des paramètres de l'hémogramme lié à la forme liquide de l'anticoagulant : hémoglobine, numération plaquettaire / érythrocytaire et leucocytaire, liée à la forme liquide de l'anticoagulant.

Néanmoins certains auteurs ont démontré que, malgré ces interférences, l'usage de l'EDTA K3 n'a pas d'impact clinique en comparaison au sel di-potassique. En effet en prenant en compte les incertitudes analytiques ainsi que les variations cliniquement acceptables, l'utilisation de l'un ou l'autre anticoagulant n'interfère pas dans les décisions cliniques et thérapeutiques. Cependant, afin de rendre un résultat le plus juste possible l'EDTA K2 est à privilégier. Ainsi lors de notre étude nous n'avons utilisé que ce dernier type d'anticoagulant.

6.3 Extraction des données

Le centre de compétence des pathologies plaquettaires du CHRU de Nancy centralise l'extraction des données XN SYSMEX®. L'ensemble des laboratoires inclus dans l'étude transmettent pour chaque patient deux fichiers informatiques :

1. Le fichier *.SMP correspondant à l'enregistrement de l'ensemble des valeurs brutes du passage du patient. Ce fichier est ensuite importé dans l'informatique embarqué de l'automate (IPU) ce qui permet l'extraction de ces données sous forme d'un fichier *.CSV exploitable avec un logiciel tableur. L'exportation n'est réalisée que par le centre centralisateur de l'étude pour des raisons pratiques. En effet celle-ci doit être réalisée avec un identifiant administrateur, obligeant l'arrêt du passage des patients, car ne ce compte utilisateur n'assure plus la traçabilité technique des opérateurs. Afin de faciliter cette démarche nous avons décidé de ne le réaliser que sur un seul site. L'exportation génère deux fichiers *.CSV contenant pour l'un les données de la numération plaquettaire impédance ainsi que de la formule et le second possédant les données de la fluorescence.
2. Un fichier *.116 qui sera utilisé par la société SYSMEX® afin de pouvoir simuler de nouveau le passage de l'échantillon. Ceci permettra d'incrémenter leur base de données afin d'analyser et de valider la démarche que nous allons essayer de mettre en place. Ce fichier est temporaire et automatiquement supprimé après 3 semaines.

L'ensemble de la procédure d'exportation des fichiers informatiques fournie à chaque centre participant est détaillé en ANNEXE 3.

6.4 Statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées informatiquement et concernent les moyennes, médianes, coefficients de variations ainsi que les 2,5 et 97,5 percentiles.

6.4.1 Evaluation des paramètres

Afin d'étudier et de vérifier le comportement de chaque paramètre plaquettaire, nous avons détaillé leur fidélité, en reprenant les valeurs de répétabilité ainsi que de reproductibilité, basées sur les passages de contrôles de qualité interne (CIQ). Nous avons également utilisé les données des CIQ externalisés afin d'approcher la justesse pour l'ensemble des paramètres disponibles dans le programme d'externalisation. Ceci nous a permis de calculer pour ces

derniers leurs incertitudes de mesures et ainsi évaluer de manière globale ces paramètres plaquettaires de recherche, encore très peu détaillés dans la littérature.

Pour le calcul des incertitudes, nous avons utilisé la formule se basant sur les données des CIQ ainsi que des CIQ externalisés. En effet, nous n'avons pu appliquer la formule recommandée par le COFRAC, utilisant les résultats d'EEQ, car l'ensemble des paramètres que nous étudions dans ce travail n'en bénéficient pas.

$$u(C) = \sqrt{u^2(CIQ) + u^2(CIQ \text{ externalisé})}$$

$u^2(CIQ)$ représente la variance de l'ensemble des résultats de contrôle de de qualité interne.
 $u^2(CIQ \text{ externalisé})$ représente la variance liée à la justesse.

Nous nous sommes basés sur les données disponibles de CIQ et CIQ externalisés du mois de janvier et février 2015 couvrant l'amplitude d'utilisation du lot de CQ : QC-43211101/2/3.

L'ensemble de ces calculs statistiques sont détaillés dans les SH GTA 04 v1.0[179] et SH GTA 14 v00[180] publiés par le COFRAC dans le cadre de l'accréditation des laboratoires de biologie médicale.

De plus, dans le cadre de la validation de ces paramètres plaquettaires, nous avons utilisé notre population de témoins sains dans le but d'élaborer des valeurs témoins pour chacun d'entre eux. Pour ce faire nous avons utilisé les dernières recommandations du *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) de 2008 afin de pouvoir utiliser de manière statistiquement significative notre échantillon témoin. En effet cette troisième révision des recommandations internationales introduit la possibilité de déterminer des intervalles de référence sur la base de petits échantillons par le biais d'une « méthode robuste » [181]. Celle-ci s'applique sur une série de distribution normale ou en y appliquant la transformée de Box-Cox si ce n'est initialement pas le cas.

L'intégralité des calculs est réalisée à l'aide d'un logiciel (*Reference Value Advisor*) pour Microsoft® Excel (Microsoft®, Redmond, WA, USA) développé par une équipe de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse[182].

6.4.2 Etude de stabilité

Dans le cadre de l'étude du comportement des paramètres plaquettaires, nous avons réalisé une analyse de stabilité dans le temps.

Cette étude est réalisée sur 6 témoins sains (4 femmes et 2 hommes âgés de 25 à 36 ans) dont le sang a été prélevé sur tubes EDTA K2 et analysé sur le XN SYSMEX® 45 minutes après la ponction. Ce passage permettant de déterminer le point de départ T1 de l'étude et assurer des comparaisons ultérieures à ce dernier. Le T0 est défini par le moment du prélèvement (T1 = T0 + 45min).

Les échantillons sont conservés bouchés à la température ambiante du laboratoire et des passages sur l'hématimètre sont réalisés à différents temps : 75min (T1 + 30min), 105min (T1 + 1h), 165min (T1 + 2h), 225min (T1 + 3h), 285min (T1 + 4h), 405min (T1 + 6h), 525min (T1 + 8h), 675min (T1 + 10,5h), 705min (T1 + 11h), 945min (T1 + 15h) et 1485min (T1 + 24h).

Au moment de chaque passage les tubes sont agités par retournements successifs par le technicien ainsi que par l'automate. De plus, l'ensemble de ces analyses a été effectué sur la même chaîne d'hématimètres avec les mêmes lots de réactifs.

Les résultats sont rapportés par la moyenne, l'écart type et l'intervalle de confiance à 95% de la moyenne des résultats des six patients. Les différences entre les différents paramètres mesurés sont évaluées grâce à un test de Student d'échantillons appariés et sont considérées comme significatives pour des valeurs de $p < 0.05$.

Les variations statistiquement significatives par rapport au point T1 sont évaluées en pourcentage par une représentation de Bland-Altman et comparées à des valeurs de biais désirables définit.

Ces spécifications de biais acceptables sont déterminées par la littérature pour certains paramètres et de manière arbitraire pour ceux n'étant pas décrits. Dans ce dernier cas le biais est déterminé par le double du coefficient de variation de répétabilité.

Cette analyse de stabilité est réalisée sur des échantillons sanguins obtenus de volontaires sains, informés oralement de l'utilisation de leur prélèvement dans le cadre d'une étude de recherche. Les résultats biologiques ne leur ont pas été rapportés d'autant plus que ces derniers n'affectent pas leur prise en charge médicale. Par voie de conséquence aucun contrat de consentement n'a été nécessaire.

Par ailleurs les échantillons biologiques ont été anonymisés dès leur prélèvement afin de garantir l'anonymat des participants.

L'étude a été conduite dans le respect de la déclaration d'Helsinki.

6.4.3 Groupes de TC

Dans le but de classer les différentes pathologies d'intérêt et ainsi permettre l'élaboration d'un arbre décisionnel, nous avons élaboré des diagrammes en « *box plot* » pour chacun des paramètres plaquettaires étudiés et pour chacune des pathologies. A l'aide de ces derniers nous comparerons nos résultats avec la classification de Noris *et al.* [6] qui fait actuellement référence et qui est établie à partir de données microscopiques.

Afin de préciser cette classification, différentes courbes ROC (*Receiver Operating Characteristic*) ont été produites afin d'élaborer des *cutoffs* discriminants pour chaque groupes d'entités de TC. Nous les avons réalisés pour l'ensemble des paramètres plaquettaires d'intérêt et pour chaque type de TC ainsi que pour les PTI.

Le logiciel GraphPad Prism version 6 (1992-1994 GraphPad Software, Inc) a été utilisé pour l'ensemble de ces différentes analyses statistiques.

7 RESULTATS

7.1 Evaluation des performances des paramètres plaquettaires

Avant de procéder à la comparaison des paramètres plaquettaires entre les patients inclus et la population témoin, il a été nécessaire de procéder à une évaluation de la performance de ces paramètres. En effet, pour la plupart d'entre eux, très peu de données bibliographiques sont disponibles ce qui explique la nécessité de documenter leur comportement.

Pour ce faire nous allons détailler différents aspects analytiques et pré-analytiques à la manière du dossier de vérification/validation de méthode, SH FORM 43, selon les recommandation du SH GTA 04 [179] édité par le COFRAC selon la norme NF EN ISO 15189.

7.1.1 Fidélité des paramètres plaquettaires

Répétabilité

Comme détaillé précédemment, la répétabilité a été réalisée pour chaque paramètre via l'utilisation d'échantillons de CIQ.

Seuls les résultats d'un seul module XN SYSMEX® sont présentés ici, les valeurs du second module étant identiques.

Les résultats des 30 passages sont donnés dans le tableau ci-dessous pour les trois niveaux disponibles :

Tableau XI : Valeurs de répétabilité des paramètres plaquettaire.

		Nombre	Niveau bas			Niveau normal			Niveau haut		
			Moyenne	Ecart-type	CV (%)	Moyenne	Ecart-type	CV (%)	Moyenne	Ecart-type	CV (%)
Impédance	PLT-I (10 ⁹ /L)	30	<u>51,94</u>	2,48	4,78	<u>241,15</u>	5,75	2,38	<u>547,97</u>	6,08	1,11
	MPV (fL)	30	8,63	0,26	2,97	10,03	0,15	1,50	9,80	0,08	0,77
	P-LCR (%)	30	11,91	2,13	17,90	22,21	0,96	4,33	20,65	0,51	2,48
	PCT (%)	30	0,05	0,01	11,27	0,24	0,01	3,83	0,54	0,01	1,49
	PDW (fL)	30	6,51	0,29	4,52	9,67	0,21	2,13	9,73	0,15	1,57
	P-MFV (fL)	30	7,38	0,08	1,14	9,10	0,09	1,01	9,00	0,07	0,81
Fluorescence	PLT-F (10 ⁹ /L)	30	44,67	0,96	2,14	227,15	3,83	1,68	494,79	3,87	0,78
	IPF (%)	30	19,24	0,47	2,43	20,22	0,41	2,03	19,91	0,48	2,43
	H-IPF (%)	30	9,00	0,33	3,70	9,87	0,38	3,84	10,45	0,30	2,89
	IPF# (G/L)	30	8,59	0,20	2,38	45,94	1,23	2,68	98,52	2,63	2,67
	PLT-F-X (ch)	30	75,67	3,93	5,20	8,66	0,34	3,97	8,18	0,39	4,74
	PLT-F-Y (ch)	30	112,13	0,91	0,81	94,03	0,35	0,37	94,12	0,23	0,25
	PLT-F-Z (ch)	30	56,29	1,16	2,06	34,14	0,17	0,50	33,65	0,18	0,52

Parmi l'ensemble de ces paramètres, seuls deux possèdent des données bibliographiques de répétabilité. Leurs spécifications de CV sont extraites de la base de données RICOS en tant qu'imprécision souhaitable :

1. La numération plaquettaire est donnée à 4,6 %
2. Le volume plaquettaire moyen est donné à 2,15 %

Cependant ces caractéristiques sont globales et non adaptées à un niveau particulier de valeurs. C'est pourquoi les CV obtenus, légèrement supérieurs aux recommandations pour ceux obtenus en impédance, sont acceptables.

Toutefois nous pouvons observer que le canal fluorescent, sur la numération plaquettaire, permet d'obtenir de meilleures performances en comparaison à la technologie d'impédance. Ceci étant attendu d'un point de vue technique et en accord avec les publications internationales [105][111][112][183].

Fidélité intermédiaire

Comme détaillé précédemment, la reproductibilité a été réalisée pour chaque paramètre via l'utilisation d'échantillons de CIQ.

Seuls les résultats d'un seul module XN SYSMEX® sont présentés ici, les valeurs du second module étant identiques.

Les résultats des 30 passages sont donnés dans le tableau ci-dessous pour les trois niveaux disponibles :

Tableau XII : Valeurs de fidélité intermédiaire des paramètres plaquettaires.

		Nombre	Niveau bas			Niveau normal			Niveau haut		
			Moyenne	Ecart-type	CV (%)	Moyenne	Ecart-type	CV (%)	Moyenne	Ecart-type	CV (%)
Impédance	PLT-I (10 ⁹ /L)	30	<u>54,46</u>	3,31	6,08	<u>241,52</u>	6,16	2,55	<u>553,62</u>	6,84	1,23
	MPV (fL)	30	8,77	0,38	4,34	9,99	0,14	1,37	9,87	0,11	1,14
	P-LCR (%)	30	13,07	2,97	22,69	21,98	0,99	4,49	21,00	0,73	3,49
	PCT (%)	30	0,05	0,01	11,61	0,24	0,01	3,80	0,55	0,01	2,03
	PDW (fL)	30	6,70	0,29	4,35	9,57	0,23	2,41	9,72	0,17	1,70
	P-MFV (fL)	30	43,85	1,17	2,68	230,18	4,62	2,01	498,30	6,59	1,32
Fluorescence	PLT-F (10 ⁹ /L)	30	19,07	0,55	2,88	19,94	0,62	3,13	19,99	0,76	3,82
	IPF (%)	30	8,95	0,35	3,91	9,70	0,37	3,80	10,19	0,54	5,25
	H-IPF (%)	30	8,37	0,36	4,34	45,88	1,59	3,47	99,60	4,31	4,33
	IPF# (G/L)	30	----	----	----	----	----	----	----	----	----
	PLT-F-X (ch)	30	----	----	----	----	----	----	----	----	----
	PLT-F-Y (ch)	30	----	----	----	----	----	----	----	----	----
	PLT-F-Z (ch)	30	----	----	----	----	----	----	----	----	----

Il est à observer que les spécifications de fidélité intermédiaire sont proches de celles de la répétabilité ainsi que les observations qui en découlent.

Cependant il est nécessaire de comparer ces résultats aux spécifications du fournisseur. Ce dernier détaille pour l'ensemble des 3 niveaux :

- Concernant la numération plaquettaire le CV de reproductibilité devrait être compris entre 1,5 % et 4,9 %,
- Concernant le MPV le CV devrait se situer entre 0,6 % et 3,6 %,
- Concernant l'IPF % l'intervalle est 3,3 % à 5,1 %.

Les CV calculés par le laboratoire sont très proches de ces spécifications, hormis pour la numération et le VPM du canal impédance. Concernant la numération plaquettaire, les spécifications fournisseur ne sont pas détaillées entre les différents canaux, ce qui explique que l'on retrouve un CV impédance légèrement supérieur. Néanmoins il est possible de négliger ces faibles différences devant l'absence d'impact sur les résultats patients. En effet les variations de numération et de VPM sont très faibles sur ce niveau bas.

Toutefois, il est intéressant de relever que sur le niveau haut, le PLT-F possède un CV plus important que la numération par impédance et que sur le niveau bas le PLT-F montre de bien meilleures performances.

Le laboratoire a de plus établi que la limite de quantification du canal PLT-F est de 3 G/L (données laboratoire et non présentées ici).

7.1.2 Incertitudes des paramètres plaquettaires

Dans le but d'étudier les performances et le comportement des différents paramètres plaquettaire que nous utilisons, nous avons calculé, pour lesquels cela était possible, les incertitudes de mesure. Cette donnée analytique nous permet de mieux appréhender l'interprétation des différents paramètres ainsi que de nous aider dans le choix arbitraire de biais au niveau de l'étude de stabilité, choix que nous détaillerons dans le chapitre correspondant § 7.1.3.

Comme décrit précédemment (chapitre § 6.4.1), l'ensemble des calculs est présenté dans le document SH GTA 14 v00 [180] et les résultats sont présentés dans le tableau XIII ci-dessous :

Lot :	janv-15					févr-05					Moyenne des biais	Ecart type des biais	Composante CIQext	Moyenne des moyennes	Moyenne des CV	Incertitude composée			
	QC-43211101/2/3					QC-43211101/2/3													
	n	Moyenne CIQ	CV CIQ (%)	Moyenne Groupe	Biais (%)	n	Moyenne CIQ	CV CIQ (%)	Moyenne Groupe	Biais (%)						m _b	sd _b	u(CIQext)	m _{CIQ}
PLT-I (G/L)	N1	31	54.8	5.32	56.4	-2.84	8	54.8	4.51	56.5	-3.01	-2.92	0.122	2.862	54.80	4.92	3.18	6.36	11.61
	N2	31	234.5	1.43	241	-2.70	8	234.6	1.62	241.1	-2.70	-2.70	0.001	2.424	234.55	1.53	3.90	7.80	3.33
	N3	31	531.7	0.91	551.1	-3.52	8	534.4	1.06	551.2	-3.05	-3.28	0.334	3.707	533.05	0.99	5.59	11.18	2.10
PDW (fl)	N1	31	6.56	3.35	6.48	1.23	8	6.51	3.67	6.49	0.31	0.77	0.66	0.63	6.54	3.51	0.82	1.65	25.24
	N2	31	8.68	1.53	8.55	1.52	8	8.69	1.28	8.56	1.52	1.52	0.00	0.77	8.69	1.41	0.89	1.77	20.40
	N3	31	8.93	1.09	8.78	1.71	8	8.92	0.96	8.79	1.48	1.59	0.16	0.87	8.93	1.03	0.94	1.88	21.04
MPV (fl)	N1	31	8.61	3	8.47	1.65	8	8.61	2.96	8.48	1.53	1.59	0.08	0.85	8.61	2.98	0.96	1.92	22.27
	N2	31	9.9	0.9	9.75	1.54	8	9.96	1.13	9.76	2.05	1.79	0.36	1.20	9.93	1.02	1.10	2.20	22.18
	N3	31	9.68	0.53	9.56	1.26	8	9.65	0.46	9.56	0.94	1.10	0.22	0.45	9.67	0.50	0.67	1.35	13.94
P-LCR (%)	N1	31	9.7	18	9.67	0.31	8	10.01	18.96	9.73	2.88	1.59	1.82	4.14	9.86	18.48	2.73	5.46	55.43
	N2	31	19.27	3.57	18	7.06	8	19.69	3.67	18.05	9.09	8.07	1.44	23.77	19.48	3.62	4.93	9.85	50.58
	N3	31	18.13	2.23	17.03	6.46	8	17.94	2.23	17.06	5.16	5.81	0.92	12.09	18.04	2.23	3.50	7.00	38.82
IPF% (%)	N1	31	19.32	1.19	19.27	0.26	8	19.36	1.83	19.27	0.47	0.36	0.15	0.07	19.34	1.51	0.39	0.78	4.02
	N2	31	19.91	1.96	20	-0.45	8	20	1.75	20	0.00	-0.23	0.32	0.12	19.96	1.86	0.51	1.01	5.06
	N3	31	19.89	2.49	20	-0.55	8	19.98	1.87	20	-0.10	-0.32	0.32	0.14	19.94	2.18	0.57	1.14	5.72
PLT-F (G/L)	N1	31	53.7	1.58	53.3	0.75	8	54.3	1	53.3	1.88	1.31	0.80	1.21	54.00	1.29	1.30	2.60	4.82
	N2	31	255.2	1.66	256.4	-0.47	8	264	1.04	257.2	2.64	1.09	2.20	5.24	259.60	1.35	4.19	8.37	3.22
	N3	31	553	0.82	551	0.36	8	562.3	0.94	551.9	1.88	1.12	1.08	1.58	557.65	0.88	5.07	10.13	1.82
PLT-F-Z (ch)	N1	31	49.77	1.62	49.39	0.77	8	50.1	1	49.49	1.23	1.00	0.33	0.44	49.94	1.31	0.93	1.86	3.73
	N2	31	34.3	0.61	33.74	1.66	8	34.3	0.85	33.74	1.66	1.66	0.00	0.92	34.30	0.73	0.99	1.98	5.78
	N3	31	34.62	0.6	34.01	1.79	8	34.56	0.89	33.99	1.68	1.74	0.08	1.01	34.59	0.75	1.04	2.08	6.00

Tableau XIII : Calculs d'incertitudes des paramètres plaquettaires.

Nous pouvons observer que selon le niveau du contrôle l'incertitude varie. En effet cette dernière augmente de manière inversement proportionnelle au niveau du contrôle utilisé.

Toutefois nous pouvons comparer les performances du canal impédance et fluorescence via l'observation des résultats des deux numérations. Nous obtenons pour le niveau bas (~50 G/L) 11,61 % en impédance alors que le PLT-F donne une incertitude de 4,82 %. Ceci permet de confirmer la supériorité de ce canal dans la zone des faibles numérations.

Concernant les deux autres niveaux, les différences se lissent et deviennent négligeables confortant l'indication d'utilisation du PLT-F dans les thrombopénies :

- Niveau 2 (~230 G/L) : PLT-I : 3,33 % et PLT-F : 3,22 %
- Niveau 3 (~550 G/L) : PLT-I : 2,10 % et PLT-F : 1,82 %

Toutefois, l'ensemble des paramètres plaquettaires utilisés dans notre travail n'a pu faire l'objet d'une évaluation de son incertitude du fait de l'indisponibilité de leurs valeurs de CIQ externalisé ou encore d'EEQ. Ceci explique l'absence de données pour l'H-IPF ainsi que les PLT-F-X, PLT-F-Y, P-MFV et IPF#.

Il serait attendu d'obtenir des résultats similaires pour les différents paramètres évaluant le degré de fluorescence (H-IPF, IPF# et IPF%) ainsi qu'entre les différents indices de cytométrie en flux (PLT-F-X, PLT-F-Y et PLT-F-Z) sans pour autant avoir pu les calculer.

7.1.3 Stabilité des paramètres plaquettaires

Toujours dans le but d'évaluer les performances et la robustesse des paramètres plaquettaires, nous avons réalisé une étude de stabilité dans le temps de ces derniers. Ceci étant réalisé à température ambiante.

Les résultats sont décrits dans les tableaux ci-dessous :

Tableau XIV : Résultats étude de stabilité des paramètres plaquettaire.

Paramètres	45' (T1)	75' (T2)	105' (T3)	165' (T4)	225' (T5)	285' (T6)
	mean ± SD	mean ± SD	mean ± SD	mean ± SD	mean ± SD	mean ± SD
	95% CI for mean	95% CI for mean	95% CI for mean	95% CI for mean	95% CI for mean	95% CI for mean
PLT-I (10 ⁹ /L)	244,8 ± 25,9 217,6 to 272	246,3 ± 29,46 215,4 to 277,2	244,3 ± 23,3 219,9 to 268,8	246,3 ± 24,66 220,5 to 272,2	255,8 ± 25,29 229,3 to 282,4	248 ± 27,44 219,2 to 276,8
MPV (fL)	10,52 ± 0,6306 9,855 to 11,18	10,65 ± 0,5753 10,05 to 11,25	10,68 ± 0,5879 10,07 to 11,3	10,68 ± 0,5947 10,06 to 11,31	10,68 ± 0,5672 10,09 to 11,28	10,82 ± 0,5776 10,21 to 11,42
P-LCR (%)	29,05 ± 5,162 23,63 to 34,47	30,2 ± 4,997 24,96 to 35,44	30,58 ± 4,659 25,69 to 35,47	30,3 ± 4,885 25,17 to 35,43	30,68 ± 4,717 25,73 to 35,63	31,75 ± 4,594 26,93 to 36,57
PDW (fL)	12,18 ± 1,361 10,75 to 13,61	12,1 ± 1,193 10,85 to 13,35	12,23 ± 1,155 11,02 to 13,45	12,35 ± 1,307 10,98 to 13,72	12,72 ± 1,179 11,48 to 13,95	12,92 ± 1,289 11,56 to 14,27
P-MFV (fL)	8,55 ± 0,5577 7,965 to 9,135	8,783 ± 0,5601 8,196 to 9,371	8,783 ± 0,4579 8,303 to 9,264	8,833 ± 0,4844 8,325 to 9,342	8,9 ± 0,506 8,369 to 9,431	8,917 ± 0,4792 8,414 to 9,42
PLT-F (10 ⁹ /L)	237,2 ± 22,21 213,9 to 260,5	238,8 ± 21,78 216 to 261,7	235,3 ± 21,29 213 to 257,7	231,3 ± 22,78 207,4 to 255,2	220,8 ± 28,38 191,1 to 250,6	229,8 ± 20,82 208 to 251,7
IPF (%)	2,633 ± 0,9791 1,606 to 3,661	2,567 ± 0,9893 1,528 to 3,605	2,683 ± 1,023 1,61 to 3,756	2,95 ± 1,088 1,809 to 4,091	2,65 ± 0,9268 1,677 to 3,623	2,967 ± 1,111 1,801 to 4,133
H-IPF (%)	0,8167 ± 0,3764 0,4217 to 1,212	0,7833 ± 0,3312 0,4358 to 1,131	0,85 ± 0,3834 0,4476 to 1,252	0,9167 ± 0,3601 0,5388 to 1,295	0,8 ± 0,3742 0,4073 to 1,193	0,9 ± 0,4427 0,4354 to 1,365

IPF# (G/L)	6,133 ± 1,917 4,122 to 8,145	5,8 ± 1,921 3,784 to 7,816	6,05 ± 1,864 4,094 to 8,006	6,933 ± 2,168 4,659 to 9,208	5,7 ± 1,462 4,166 to 7,234	6,867 ± 2,229 4,528 to 9,205
PLT-F-X (ch)	77,75 ± 3,167 74,43 to 81,07	75,83 ± 3,431 72,23 to 79,43	76,67 ± 3,002 73,52 to 79,82	77,87 ± 2,803 74,92 to 80,81	75,87 ± 3,19 72,52 to 79,21	77,83 ± 3,099 74,58 to 81,09
PLT-F-Y (ch)	64,93 ± 4,326 60,39 to 69,47	63,57 ± 4,069 59,3 to 67,84	62,68 ± 3,917 58,57 to 66,79	63 ± 4,533 58,24 to 67,76	61,7 ± 4,303 57,18 to 66,22	61,8 ± 4,459 57,12 to 66,48
PLT-F-Z (ch)	44,62 ± 1,125 43,44 to 45,8	44,17 ± 0,9873 43,13 to 45,2	44,13 ± 1,169 42,91 to 45,36	44,28 ± 1,288 42,93 to 45,63	44,55 ± 1,425 43,05 to 46,05	44,52 ± 1,493 42,95 to 46,08
Paramètres	405' (T7) mean ± SD 95% CI for mean	525' (T8) mean ± SD 95% CI for mean	675' (T9) mean ± SD 95% CI for mean	705' (T10) mean ± SD 95% CI for mean	945' (T11) mean ± SD 95% CI for mean	1485' (T12) mean ± SD 95% CI for mean
PLT-I (10 ⁹ /L)	252,7 ± 25,57 225,8 to 279,5	247 ± 26,53 219,2 to 274,8	257,8 ± 22,52 234,2 to 281,5	253,8 ± 27,08 225,4 to 282,3	253,3 ± 29,38 222,5 to 284,2	249 ± 26,81 220,9 to 277,1
MPV (fL)	10,65 ± 0,5822 10,04 to 11,26	10,75 ± 0,6285 10,09 to 11,41	10,73 ± 0,5645 10,14 to 11,33	10,68 ± 0,5707 10,08 to 11,28	10,75 ± 0,5468 10,18 to 11,32	10,73 ± 0,6623 10,04 to 11,43
P-LCR (%)	30,28 ± 4,575 25,48 to 35,08	31 ± 5,052 25,7 to 36,3	30,8 ± 4,537 26,04 to 35,56	30,67 ± 4,636 25,8 to 35,53	30,92 ± 4,641 26,05 to 35,79	30,88 ± 5,351 25,27 to 36,5
PDW (fL)	12,63 ± 1,003 11,58 to 13,69	12,33 ± 0,9668 11,32 to 13,35	12,72 ± 1,107 11,55 to 13,88	12,53 ± 1,134 11,34 to 13,72	12,27 ± 1,176 11,03 to 13,5	12,65 ± 1,294 11,29 to 14,01
P-MFV (fL)	8,783 ± 0,5037 8,255 to 9,312	8,983 ± 0,4792 8,48 to 9,486	8,883 ± 0,5672 8,288 to 9,479	8,96 ± 0,4159 8,444 to 9,476	8,92 ± 0,497 8,303 to 9,537	8,917 ± 0,5776 8,31 to 9,523
PLT-F (10 ⁹ /L)	235,7 ± 23,72 210,8 to 260,6	228,3 ± 23,08 204,1 to 252,6	241,5 ± 23,76 216,6 to 266,4	230,7 ± 21,12 208,5 to 252,8	244,4 ± 23,44 215,3 to 273,5	229,2 ± 20,68 207,5 to 250,9
IPF (%)	2,817 ± 1,091 1,672 to 3,961	2,683 ± 0,9766 1,658 to 3,708	2,833 ± 1,061 1,719 to 3,947	2,733 ± 0,9626 1,723 to 3,744	2,86 ± 1,155 1,426 to 4,294	2,8 ± 1,004 1,746 to 3,854
H-IPF (%)	0,9167 ± 0,407 0,4895 to 1,344	0,8333 ± 0,3615 0,454 to 1,213	0,9333 ± 0,4457 0,4656 to 1,401	0,85 ± 0,4037 0,4263 to 1,274	0,88 ± 0,4382 0,3359 to 1,424	0,85 ± 0,3674 0,4644 to 1,236
IPF# (G/L)	6,5 ± 2,137 4,257 to 8,743	6 ± 1,817 4,094 to 7,906	6,733 ± 2,153 4,474 to 8,993	6,167 ± 1,807 4,27 to 8,063	6,86 ± 2,333 3,963 to 9,757	6,25 ± 1,768 4,394 to 8,106
PLT-F-X (ch)	78 ± 2,754 75,11 to 80,89	76,35 ± 3,057 73,14 to 79,56	78,42 ± 2,757 75,52 to 81,31	76,88 ± 2,484 73,8 to 79,96	80,86 ± 7,014 72,15 to 89,57	77,28 ± 2,648 74,5 to 80,06
PLT-F-Y (ch)	60,63 ± 4,189 56,24 to 65,03	59,47 ± 4,022 55,25 to 63,69	59,5 ± 4,549 54,73 to 64,27	60,34 ± 4,308 54,99 to 65,69	59,02 ± 4,355 53,61 to 64,43	54,17 ± 4,129 49,83 to 58,5
PLT-F-Z (ch)	44,58 ± 1,391 43,12 to 46,04	44,4 ± 1,449 42,88 to 45,92	44,32 ± 1,45 42,8 to 45,84	44,6 ± 1,525 42,71 to 46,49	44,3 ± 1,742 42,14 to 46,46	42,78 ± 1,658 41,04 to 44,52

Les résultats sont exprimés selon les temps d'analyse en minutes, avec la moyenne « *mean* » associé à son écart type « *SD* ». Nous indiquons également l'intervalle de confiance à 95% de la moyenne « *95% CI for mean* ». La moyenne correspond à celle des six patients pour les différents paramètres étudiés.

Afin d'interpréter les résultats de cette étude de stabilité, pour les résultats qui apparaissent statistiquement différents du T1, nous avons comparés les biais obtenus à des biais de référence.

Tous les paramètres ne disposant pas de données bibliographiques, nous avons défini arbitrairement des biais de référence. Ceci sur la base du calcul : (selon la norme NF ISO 5725-6 du 01-12-1994)

$$EC = 2,8 \times \sigma_{reproductibilité}$$

et

$$B (\%) = \frac{EC \times 100}{moyenne_{reproductibilité}}$$

Néanmoins nous ne disposons pas de données de reproductibilité pour la totalité de nos paramètres. Le cas échéant la fidélité intermédiaire a été approchée à l'aide du CV de répétabilité selon la formule ci-dessous, permettant par la suite la détermination du biais limite [184] :

$$CV_{reproductibilité} = 1,33 \times CV_{répétabilité}$$

L'ensemble de ces valeurs est résumé dans le tableau ci-dessous :

Tableau XV : Détermination des biais limite pour l'étude de stabilité.

Paramètre	Nombre	Moyenne	Ecart-type ($\sigma_{reproductibilité}$)	2,8 x Ecart-type (EC)	Biais (%)
PLT-I ($10^9/L$)	50	241,52	6,16	17,24	7,14
MPV (fL)	50	9,99	0,14	0,38	3,84
P-LCR (%)	50	21,98	0,99	2,76	12,56
PDW (fL)	50	9,57	0,23	0,65	6,74
P-MFV (fL)	30	9,10	0,122	0,34	3,76
PLT-F ($10^9/L$)	50	230,18	4,62	12,93	5,62
IPF (%)	50	19,94	0,62	1,75	8,75
H-IPF (%)	50	9,70	0,37	1,03	10,65
IPF# (G/L)	50	45,88	1,59	4,46	9,71
PLT-F-X (ch)	30	8,66	0,46	1,28	14,77
PLT-F-Y (ch)	30	94,03	0,75	2,10	2,23
PLT-F-Z (ch)	30	34,14	0,225	0,63	1,85

Dans le tableau ci-dessous, pour chaque temps est précisée, la valeur du « *p-value* » déterminé par le test de Student d'échantillons appariés évaluant la significativité de la différence avec T1 ($p < 0,05$), le biais obtenu par la transformée de Bland-Altman le cas échéant ainsi que les limites de concordance à 95% « *95% CLA* ».

Nous observons que la numération plaquettaire, en technologie impédance et fluorescence, donne des résultats statistiquement plus différents que les autres paramètres étudiés. Le seuil à partir duquel les biais deviennent supérieurs à nos références est d'environ 165 minutes soit 3h [176]. Cependant des valeurs non statistiquement différentes sont retrouvées dans la suite de l'étude de stabilité à différents temps : 285 min, 525 min, 945 min et 1485 min par exemple pour le PLT-I.

Le PLT-F-Y confirme la même donnée de stabilité, sortant de l'intervalle de référence fixé après T4 soit environ 3h. Toutefois ce-dernier reste significativement différent tout au long de la suite de l'étude. On constate également que la valeur de « *p-value* » augmente au cours du

temps, ce qui traduit une évolution linéaire de la dérive du paramètre. Caractéristique visible sur le graphique correspondant ci-dessous (figure 27). Les différents autres paramètres montrent des différences statistiquement significatives, relativement rapidement pour certains, mais évaluées avec des biais négligeables.

Ces résultats de stabilité confirment l'utilisation de notre délai limite de 3h durant notre étude.

Cependant nous détaillerons dans le chapitre de la discussion (§ 8.1) l'instabilité de la numération plaquettaire au-delà de 3 heures.

Paramètre	Temps (min)	75 (T2)	105 (T3)	165 (T4)	225 (T5)	285 (T6)	405 (T7)	525 (T8)	675 (T9)	705 (T10)	945 (T11)	1485 (T12)
		p vs T1 % biais (95% CLA)	p vs T1 % biais (95% CLA)	p vs T1 % biais (95% CLA)	p vs T1 % biais (95% CLA)	p vs T1 % biais (95% CLA)	p vs T1 % biais (95% CLA)	p vs T1 % biais (95% CLA)	p vs T1 % biais (95% CLA)	p vs T1 % biais (95% CLA)	p vs T1 % biais (95% CLA)	p vs T1 % biais (95% CLA)
PLT-I (10 ⁹ /L)	± 7,14 %	p=0,6853	p=0,7558	p=0,6689	p=0,0017 -11,00 (-19,59 ; - 2,412)	p=0,1813	p=0,0267 -7,833 (-19,94 ; 4,275)	p=0,5627	p=0,0120 -13,00 (-29,21 ; 3,210)	p=0,0012 -9,000 (-15,56 ; - 2,441)	p=0,0805	p=0,0365 -4,167 (-11,22 ; 2,891)
MPV (fL)	± 3,84 %	p=0,0429 -0,1333 (-0,3707 ; 0,1040)	p=0,0108 -0,1667 (-0,3691 ; 0,03576)	p=0,1051	p=0,1051	p=0,0234 -0,3000 (-0,7469 ; 0,1469)	p=0,1576	p=0,0127 -0,2333 (-0,5284 ; 0,06175)	p=0,0155 -0,2167 (-0,5052 ; 0,07184)	p=0,1412	p=0,0086 -0,2333 (-0,5011 ; 0,03445)	p=0,0706
P-LCR (%)	± 12,56 %	p=0,0082 -1,150 (-2,455 ; 0,1545)	p=0,0043 -1,533 (-3,024 ; - 0,04236)	p=0,0645	p=0,1159	p=0,0031 -2,700 (-5,135 ; - 0,2645)	p=0,0487 -1,233 (-3,518 ; 1,051)	p=0,0105 -1,950 (-4,298 ; 0,3979)	p=0,0187 -1,750 (-4,204 ; 0,7035)	p=0,0330 -1,617 (-4,274 ; 1,040)	p=0,0051 -1,867 (-3,749 ; 0,01602)	p=0,0648
PDW (fL)	± 6,74 %	p=0,7063	p=0,6812	p=0,5166	p=0,0958	p=0,0207 -0,7333 (-1,790 ; 0,3234)	p=0,1135	p=0,5823	p=0,0477 -0,5333 (-1,515 ; 0,4480)	p=0,2940	p=0,6109	p=0,0842
P-MFV (fL)	± 3,76 %	p=0,0224 -0,2333 (-0,5766 ; 0,1099)	p=0,0335 -0,2333 (-0,6187 ; 0,1521)	p=0,0228 -0,2833 (-0,7022 ; 0,1355)	p=0,0059 -0,3500 (-0,7167 ; 0,01668)	p=0,0104 -0,3667 (-0,8078 ; 0,07451)	p=0,0648	p=0,0003 -0,4333 (-0,6707 ; - 0,1960)	p=0,0005 -0,3333 (-0,5358 ; - 0,1309)	p=0,0299 -0,3200 (-0,7449 ; 0,1049)	p=0,0046 -0,2800 (-0,4947 ; - 0,06529)	p=0,0019 -0,3667 (-0,6618 ; - 0,07158)
PLT-F (10 ⁹ /L)	± 5,62 %	p=0,2332	p=0,2610	p=0,0016 5,533 (1,293 ; 10,37)	p=0,0252 16,33 (-8,511 ; 41,18)	p< 0,0001 7,333 (4,382 ; 10,28)	p=0,3935	p=0,0002 8,833 (4,465 ; 13,20)	p=0,0182 -4,333 (-10,36 ; 1,697)	p=0,0079 6,500 (-0,8074 ; 13,81)	p=0,0657	p=0,0210 8,000 (-3,562 ; 19,56)
IPF (%)	± 5,62 %	p=0,3632	p=0,6355	p=0,0151 -0,3167 (-0,7355 ; 0,1022)	p=0,8618	p=0,0224 -0,3333 (-0,8240 ; 0,1573)	p=0,1855	p=0,6355	p=0,1019	p=0,4971	p=0,0608	p=0,0305 -0,1667 (-0,4345 ; 0,1011)
H-IPF (%)	± 10,65 %	p=0,5761	p=0,6606	p=0,1438	p=0,7412	p=0,2892	p=0,2532	p=0,7926	p=0,1801	p=0,6383	p=0,4263	p=0,4650
IPF# (G/L)	± 9,71 %	p=0,0766	p=0,7271	p=0,0171 -0,8000 (-1,895 ; 0,2948)	p=0,3260	p=0,0391 -0,7333 (-2,002 ; 0,5349)	p=0,3080	p=0,6336	p=0,0825	p=0,9295	p=0,0652	p=0,4276
PLT-F-X (ch)	± 14,77 %	p=0,0025 1,917 (0,2749 ; 3,558)	p=0,0027 1,083 (0,1359 ; 2,031)	p=0,6952	p=0,0027 1,883 (0,2415 ; 3,525)	p=0,7691	p=0,3746	p=0,0188 1,400 (-0,5639 ; 3,364)	p=0,0600	p=0,0325 1,420 (-0,5173 ; 3,357)	p=0,2669	p=0,3228
PLT-F-Y (ch)	± 2,23 %	p=0,0038 1,367 (0,07445 ; 2,659)	p=0,0010 2,235 (0,6783 ; 0,6783)	p=0,0018 1,933 (0,3917 ; 3,475)	p=0,0001 3,233 (1,844 ; 4,623)	p=0,0002 3,133 (1,528 ; 4,738)	p< 0,0001 4,300 (3,085 ; 5,515)	p< 0,0001 5,467 (4,180 ; 6,753)	p< 0,0001 5,433 (3,814 ; 7,053)	p< 0,0001 5,560 (4,063 ; 7,057)	p< 0,0001 6,880 (5,896 ; 7,864)	p< 0,0001 10,77 (9,480 ; 12,05)
PLT-F-Z (ch)	± 1,85 %	p=0,0965	p=0,2361	p=0,4838	p=0,8803	p=0,8475	p=0,9394	p=0,6166	p=0,5391	p=0,5993	p=0,4260	p=0,0201 1,833 (-0,7865 ; 4,453)

Tableau XVI : Résultats des biais de l'étude de stabilité des paramètres plaquettaire.

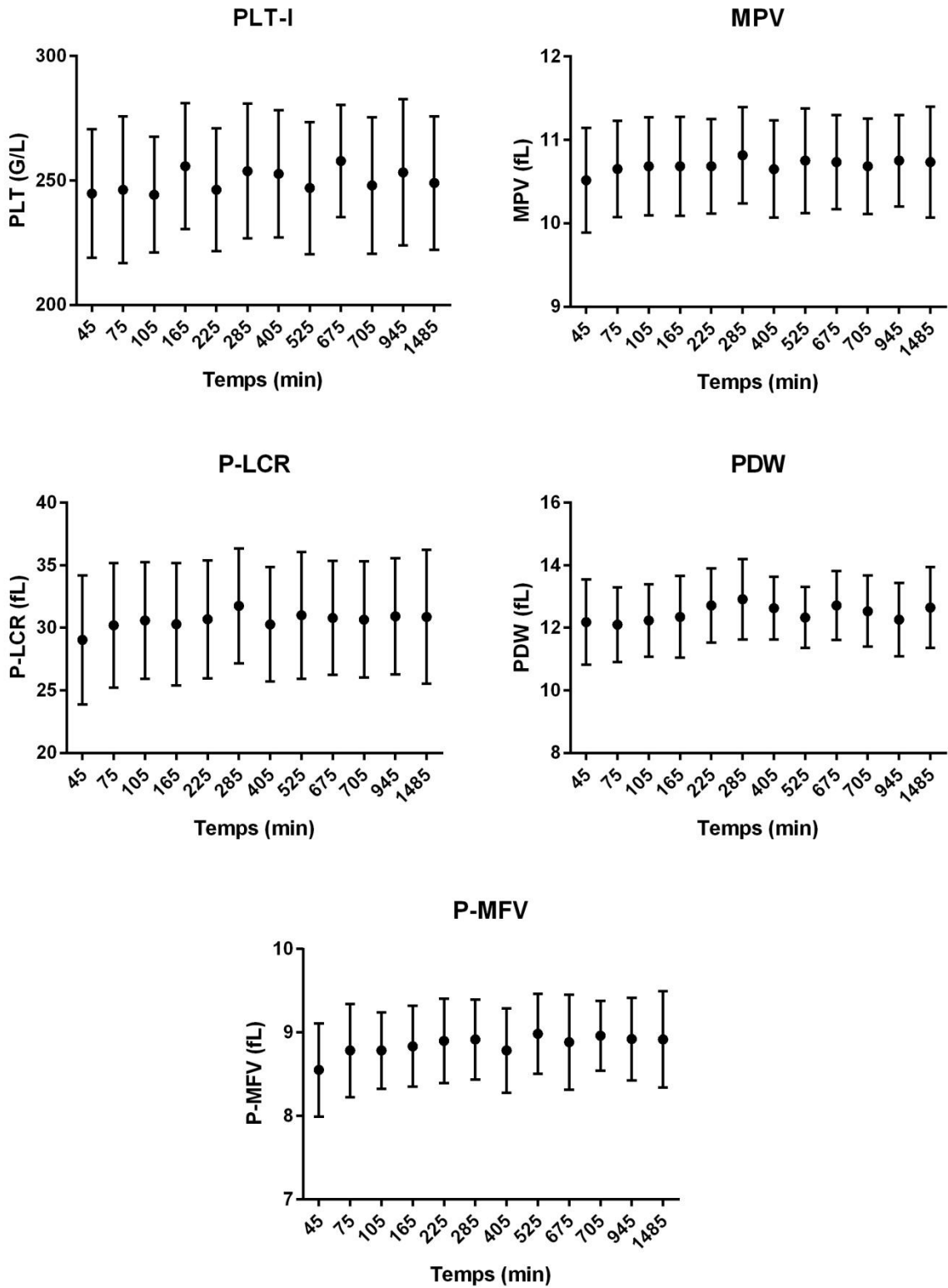


Figure 26 : Représentations graphiques de la stabilité des paramètres du canal impédance.

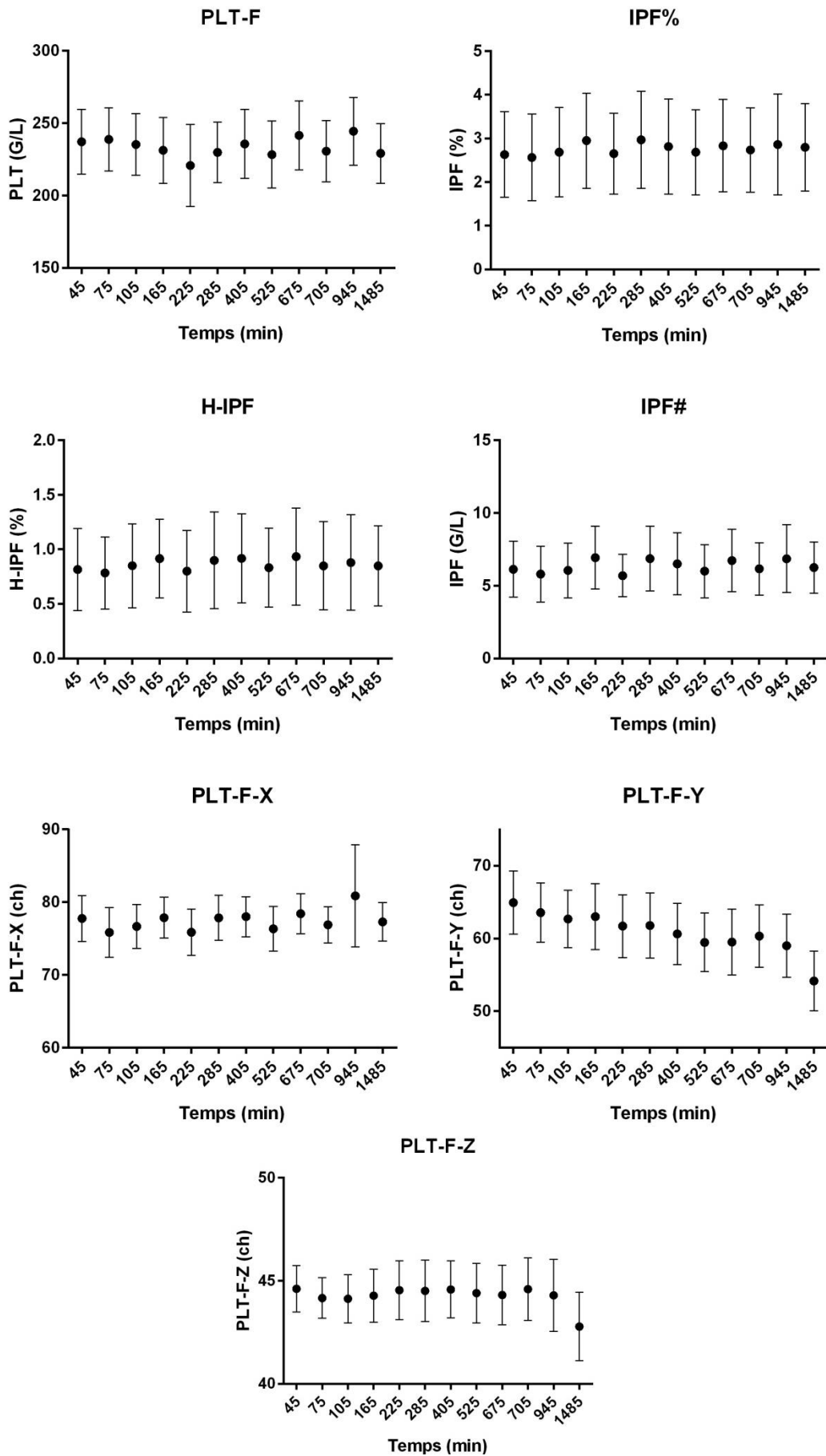


Figure 27 : Représentations graphiques de la stabilité des paramètres du canal fluorescent.

7.2 Valeurs témoins

A partir des données témoins, nous avons pu établir des valeurs témoins pour l'ensemble des paramètres que nous utilisons, même si nous ne disposons que d'une petite population saine. L'ensemble des résultats est disponible dans les tableaux ci-dessous :

Tableau XVII : Valeurs brutes de l'ensemble des témoins sains.

Age	Sexe	Impédance						Fluorescence							
		PLT-I (G/L)	MPV (fL)	P-LCR (%)	PCT (%)	PDW (fl)	P-MFV (fL)	PLT-F (G/L)	IPF (%)	IPF# (G/L)	H-IPF (%)	PLT-F-X (ch)	PLT-F-Y (ch)	PLT-F-Z (ch)	
Témoins1	39	M	209	9,9	24,1	0,21	11,3	7,8	235	3,8	8,9	1,1	78,8	60,6	42
Témoins2	30	M	297	10,6	29	0,31	11,7	8,3	319	2,8	8,9	0,9	75,9	64,3	45,5
Témoins3	28	F	280	9,3	18,7	0,26	9,7	7,8	301	1,1	3,3	0,3	72,3	63,3	44,1
Témoins4	35	F	199	9,5	20,6	0,19	10,2	7,9	222	1,3	2,9	0,4	76,4	64,1	44,6
Témoins5	45	F	226	9,6	24,9	0,22	13,7	8	241	1,6	3,9	0,4	73,6	58,7	45,4
Témoins6	50	F	296	9,6	22,7	0,29	10,7	7,8	341	1,7	5,8	0,5	75,1	63,7	42
Témoins7	28	F	225	11,6	38	0,26	14,9	9,4	206	3,7	7,6	1,1	82,4	67,6	48,2
Témoins8	27	F	257	10,2	27	0,26	12,4	8,3	260	1,9	4,9	0,4	75,4	67,5	47,4
Témoins9	24	F	269	9	16,5	0,24	10,1	7,7	299	0,9	2,7	0,3	73,6	57,3	44,1
Témoins10	32	F	257	9,1	16,7	0,23	9,3	7,6	304	0,9	2,7	0,2	71,7	61,5	44,2
Témoins11	25	M	272	9,5	21,9	0,26	10,7	7,7	297	1,7	5	0,5	75,4	60,6	44,2
Témoins12	53	M	180	11,4	36,3	0,21	14,1	9,5	205	6,7	13,7	2,4	80,9	62,7	45,9
Témoins13	53	M	241	10	25,1	0,24	11,2	8,6	269	2,2	5,9	0,6	79	61,3	44,3
Témoins14	57	F	219	11,5	37,1	0,25	14,3	9,3	221	5,6	12,4	1,8	86,1	65,5	45
Témoins15	62	M	222	9,7	21,9	0,21	11,1	8,1	256	3,2	8,2	1	75,1	51,7	40,5
Témoins16	60	M	246	9,9	24,4	0,24	11,6	8,1	277	2,4	6,6	0,6	78	57,6	42
Témoins17	44	M	215	10,3	28,5	0,22	12,2	8,7	231	2,4	5,5	0,6	81,1	66	46
Témoins18	57	F	232	11,5	37,1	0,27	15	9	225	4,7	10,6	1,7	79,3	64,2	43,4
Témoins19	25	M	219	9,9	24,8	0,22	11,2	7,8	240	1,9	4,6	0,5	74,8	61	42,8
Témoins20	28	M	236	11	34,2	0,26	13,4	9	246	4,4	10,8	1,3	83,7	73,9	47,2
Témoins21	27	F	303	10,4	26,8	0,31	10,8	8,2	339	3,1	10,5	1,1	76,7	67,7	45,6
Témoins22	24	M	241	9,7	22,6	0,23	10,9	8	234	1,6	3,7	0,4	69,7	55,3	42,6
Témoins23	24	M	272	9,3	19,1	0,25	9,8	7,7	295	1,5	4,4	0,5	72,7	59,1	44
Témoins24	25	M	191	11,3	34,9	0,21	14	8,8	190	4,8	9,1	1,3	82,9	70,2	48,3
Témoins25	37	F	307	10,3	27	0,32	12,1	8,5	325	2,8	9,1	0,8	81,9	66,7	44,1
Témoins26	52	M	268	10,3	26,6	0,28	12	8,4	275	2,9	8	0,8	78,8	67,3	45,9
Témoins27	28	F	267	8,9	15,7	0,24	8,9	7,4	306	1,2	3,7	0,3	71,6	55,1	41,6
Témoins28	32	F	211	10,1	24,4	0,21	10,4	8,2	227	2,3	5,2	0,7	81,5	67,2	46,1
Témoins29	68	F	232	10,9	32,7	0,25	13,2	9,2	243	3,5	8,5	1	84,1	69,7	46,3
Témoins30	26	M	229	11,3	35,8	0,26	13,9	9	208	4	8,3	1	82,2	66,5	42,5
Témoins31	28	F	240	10,6	30,1	0,25	12,9	8,8	246	2,5	6,2	0,7	80,4	69	45,5

En grisé apparaissent les patients fumeurs.

A l'aide de l'outil informatique « *Reference Value Advisor* » et de notre population témoin, nous avons calculé des valeurs témoins pour les différents paramètres :

Tableau XVIII : Valeurs témoins des paramètres obtenus à l'aide du canal fluorescent.

	Fluorescence						
	PLT-F (G/L)	IPF (%)	IPF# (G/L)	H-IPF (%)	PLT-F-X (ch)	PLT-F-Y (ch)	PLT-F-Z (ch)
Valeurs réf	[182-362,7]	[0,75-6,56]	[1,38-13,7]	[0,21-2,25]	[69-86,86]	[52,04-73,06]	[40,38-48,64]

Tableau XIX : Valeurs témoins des paramètres obtenus à l'aide du canal impédance.

	Impédance					
	PLT-I (G/L)	MPV (fL)	P-LCR (%)	PCT (%)	PDW (fL)	P-MFV (fL)
Valeurs réf	[180,8-319,5]	[8,73-12,09]	[13,99-41,59]	[0,19-0,326]	[8,71-15,87]	[7,3-9,75]

Afin de valider notre population témoin et de pouvoir l'assimiler à la population générale, nous avons utilisé la numération plaquettaire comme indicateur. En effet, concernant ce paramètre nous obtenons des valeurs comparables à celles communément décrites et utilisées pour l'adulte de 150 - 400 G/L [185][121].

Ceci permet de confirmer l'hypothèse que notre échantillon de témoins sains est représentatif de la population générale dans le cadre de notre travail.

L'établissement de ces valeurs témoins va nous permettre, en sus de participer à l'évaluation globale de ces paramètres, de concourir à la détermination de seuils discriminants pour les diverses pathologies.

7.3 Groupes de TC

Afin d'illustrer la répartition des paramètres selon les différentes pathologies, nous avons réalisé les graphiques ci-dessous, regroupant la médiane, le minimum ainsi que le maximum mais également le premier et le troisième quartile de chaque population.

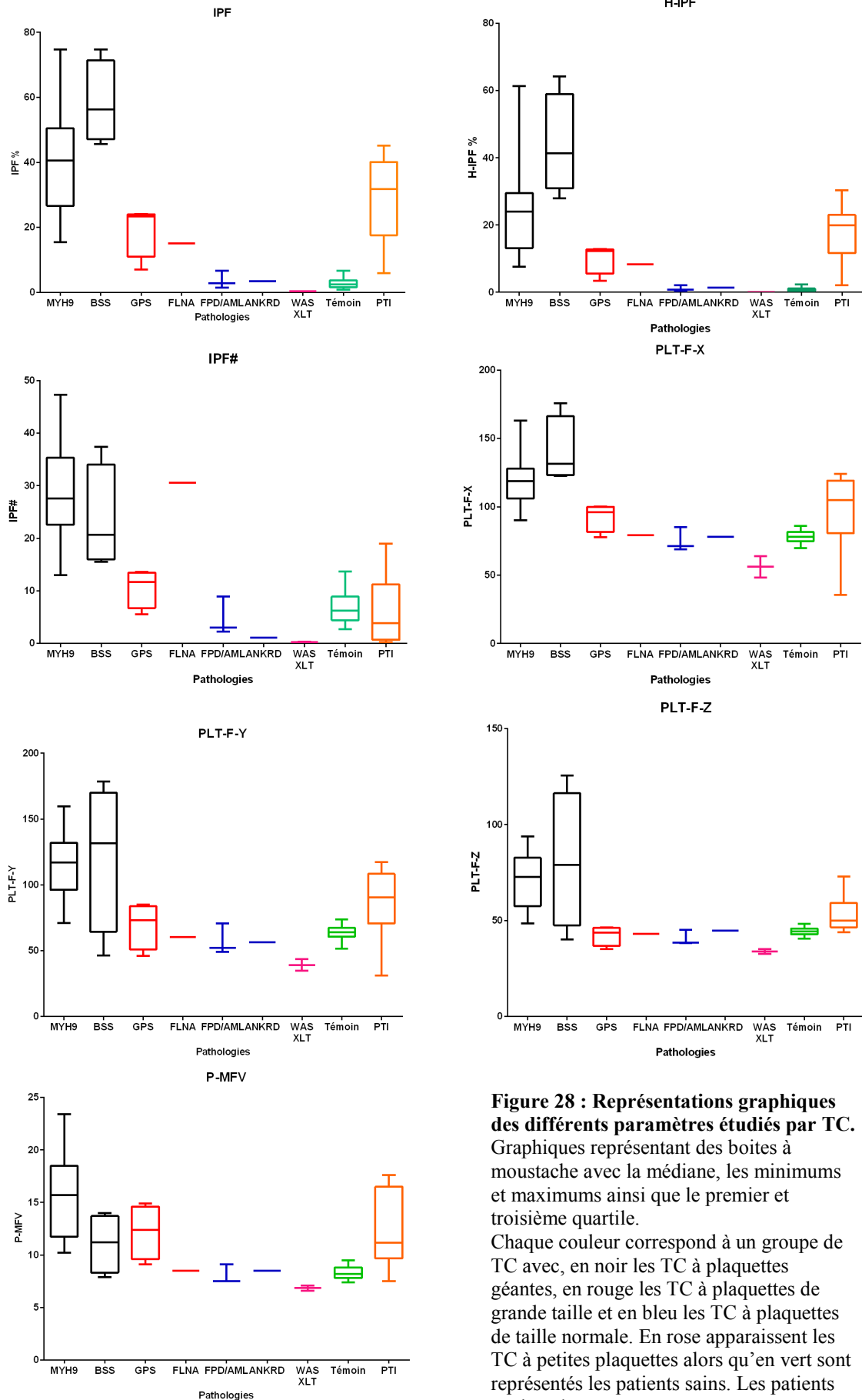


Figure 28 : Représentations graphiques des différents paramètres étudiés par TC.

Graphiques représentant des boîtes à moustache avec la médiane, les minimums et maximums ainsi que le premier et troisième quartile.

Chaque couleur correspond à un groupe de TC avec, en noir les TC à plaquettes géantes, en rouge les TC à plaquettes de grande taille et en bleu les TC à plaquettes de taille normale. En rose apparaissent les TC à petites plaquettes alors qu'en vert sont représentés les patients sains. Les patients atteints de PTI sont représentés en orange.

7.3.1 *Thrombopénies constitutionnelles à plaquettes géantes*

Vingt-quatre patients présentant une TC à plaquettes géantes ont été inclus.

Parmi eux vingt présentent un **syndrome MYH9**, dont huit provenant du centre de Toulouse, huit inclus à Nancy, un à Strasbourg et trois à Paris (en gris apparaissent dans le tableau ci-dessous les patients inclus par Toulouse, le patient 17 inclus par Strasbourg et les trois derniers par Paris). Une thrombopénie est observée dans 19 cas sur 20, impédance et fluorescence confondus, avec pour l'ensemble des patients un IPF % très augmenté traduisant l'importante présence de plaquettes immatures. La fraction H-IPF pour l'ensemble des cas est également très augmentée.

La thrombopénie est plus ou moins importante, avec des valeurs s'échelonnant de 18 G/L à 131 G/L.

Les indices de taille plaquettaire, P-MFV et PLT-F-Z, sont pour 19 des cas présents tout autant très supérieurs aux valeurs témoins établies. Néanmoins un patient présente des valeurs dans l'intervalle de référence.

Les autres paramètres de fluorescence sont aussi retrouvés augmentés dans l'ensemble de la population étudiée (excepté un patient au niveau PLT-F-Y).

Ces vingt patients sont tous génétiquement caractérisés au niveau de leurs mutations. Cependant toutes n'ont pas rapportées dans ce travail (signalés par une * dans le tableau XX). Un second tableau (tableau XXI) regroupe les différentes mutations retrouvées.

Parmi les patients atteints d'une TC à plaquettes géantes, nous avons également inclus quatre cas de **syndrome de Bernard-Soulier** homozygote, dont deux provenant de Nancy, un du centre de Nantes et un de Paris (en gris dans le tableau).

Tous les quatre présentent une thrombopénie marquée à moins de 50 G/L associée à un IPF % très largement augmenté et également supérieur à ceux des patients MYH9. La fraction la plus fluorescente, H-IPF, est elle-aussi fortement supérieure aux valeurs témoins.

Concernant les paramètres d'évaluation de la taille plaquettaire, nous pouvons observer qu'hormis les patients 1 et 4 qui présentent des valeurs dans l'intervalle de référence, les deux autres montrent un P-MFV comparable aux cas de MYH9 de même qu'un PLT-F-Z amplement supérieur aux témoins ainsi qu'aux MYH9.

Le tableau XXII ci-dessous regroupe l'ensemble des mutations retrouvées pour les patients inclus.

Il est à noter que pour seulement six patients sur vingt-quatre des valeurs ont été rendues pour le canal impédance, ce qui illustre parfaitement l'intérêt du PLT-F lors de la présence de grandes plaquettes. En effet la différence entre la numération par fluorescence et celle par impédance est systématiquement positive, signifiant la sous-estimation du compte en impédance liée aux plaquettes géantes.

Tableau XX : Résultats des valeurs des différents paramètres plaquettaires des patients inclus dans le groupe "plaquettes géantes".

		Impédance						Fluorescence						
		PLT-I (G/L)	VPM (fL)	P-LCR (%)	PCT (%)	PDW (fL)	P-MFV (fL)	PLT-F (G/L)	IPF (%)	IPF# (G/L)	H-IPF (%)	PLT-F-X	PLT-F-Y	PLT-F-Z
Valeurs réf		180,8 -319,5	8,73 - 12,09	13,99 - 41,59	0,19 - 0,326	8,71 - 15,87	7,3 - 9,75	182 - 362,7	0,75 - 6,56	1,38 - 13,7	0,21 - 2,25	69 - 86,86	52,04 - 73,06	40,38 - 48,64
Patient1*	MYH9	125	13,9	53,8	0,17	21,9	11,3	131	17,2	22,5	8,4	90,1	80,5	54,1
Patient2*	MYH9	93	13,6	52,3	0,13	23,4	10,8	111	23,9	26,5	12,1	99,1	85,2	52,8
Patient3*	MYH9	89	14,1	55,9	0,13	22,8	11,5	98	26,4	25,9	14,8	100,3	78,6	<u>48,6</u>
Patient4	MYH9	62	----	----	----	----	15,8	72	31,6	22,8	16,5	109,3	115,8	68
Patient5	MYH9	39	----	----	----	----	17,3	56	46,3	25,9	27,4	125,1	127,5	82,3
Patient6	MYH9	64	----	----	----	----	14,1	69	27,2	18,8	12,6	108,3	107,9	69,4
Patient7*	MYH9	21	----	----	----	----	16,4	30	43,2	13	24,5	123,3	108,7	70,7
Patient8*	MYH9	53	----	----	----	----	23,4	80	51	40,8	29,7	128,3	132,7	82,7
Patient9	MYH9	36	----	----	----	----	21,4	58	49	28,4	29,1	127,3	129,5	82,8
Patient10	MYH9	18	----	----	----	----	14,9	27	53,4	14,4	40,6	131,6	134,1	85,6
Patient11	MYH9	45	----	----	----	----	18,5	59	45,4	26,8	26,2	125	128,1	76,9
Patient12	MYH9	44	----	----	----	----	17,6	54	40,3	21,8	23,6	120,1	126,5	80,3
Patient13	MYH9	97	----	----	----	----	15,4	105	34,5	36,2	18,5	110,9	117,5	74,7
Patient14*	MYH9	<u>193</u>	12,9	47,1	0,25	16,6	10,2	<u>205</u>	15,4	31,6	7,6	91	<u>71,1</u>	51
Patient15*	MYH9	120	14,6	59,1	0,18	22,2	12,5	128	25,3	32,4	10,7	105,4	92,7	52,8
Patient16	MYH9	66	----	----	----	----	18,4	75	39,8	29,9	21,3	117,8	116,3	68,5
Patient17	MYH9	62	----	----	----	----	15,6	80	40,9	32,7	25,9	112,2	106,8	67,7
Patient18	MYH9	47	----	----	----	----	18,6	71	66,6	47,3	49,6	147,3	140,1	82,9
Patient19	MYH9	12	----	----	----	----	11,1	56	74,8	41,9	61,4	163,1	159,6	93,8
Patient20*	MYH9	36	----	----	----	----	20,7	62	66,5	41,2	47,5	143,4	142,8	86,7
Patient1	mBSS	20	----	----	----	----	<u>7,9</u>	34	51,3	17,4	39,6	124,9	<u>46,4</u>	<u>40,2</u>
Patient2	mBSS	7	----	----	----	----	12,8	50	74,7	37,4	64,2	175,8	178,6	125,6
Patient3	mBSS	8	----	----	----	----	14	39	61,3	23,9	43,1	138,1	144,2	88,6
Patient4	mBSS	9	----	----	----	----	<u>9,6</u>	34	45,7	15,5	28	122,6	118,8	69,5

Tableau XXI : Liste des mutations retrouvées dans le gène MYH9 des patients inclus.

Patient	Mutation	Exon	Domaine
Patient 4	p.R1165C	26	Queue
Patient 5	p.R1165C	26	Queue
Patient 6	p.T1745M	36	Tête
Patient 9	p.R1165C	26	Queue
Patient 10	p.E1841K	38	Queue
Patient 11	p.R1165C	26	Queue
Patient 12	p.R1165C	26	Queue
Patient 13	p.R1165C	26	Queue
Patient 16	p.Q1068_L1074del	24	Queue
Patient 17	p.A1939T	40	Queue
Patient 18	p.R1933Efs	40	Queue
Patient 19	p.R1933Efs	40	Queue

Tableau XXII : Liste des mutations retrouvées chez les patients inclus atteints d'un syndrome de Bernard-Soulier.

Patient	Mutation
Patient 2	GP9 Asn45
Patient 3	Délétion Leu 179 sur GP1BA

7.3.2 Thrombopénies constitutionnelles à grandes plaquettes

Cinq patients présentant une TC à grandes plaquettes ont été inclus.

Parmi eux, quatre souffrent d'un **syndrome des plaquettes grises** (GPS) et proviennent tous de Nancy excepté le patient 2, inclus à Toulouse (en gris dans le tableau). Une thrombopénie est observée dans l'ensemble des cas et évaluée de 43 G/L à 78 G/L associée à un indice IPF % élevé pour chacun d'entre eux. La fraction H-IPF est également trouvée anormalement élevée.

Concernant les indicateurs de la taille plaquettaire nous retrouvons une discordance. En effet pour 3 des 4 cas il est observé un P-MFV augmenté alors que pour l'ensemble des patients le PLT-F-Z est diminué ou dans les valeurs témoins. De même l'indice d'intensité de fluorescence PLT-F-Y n'est qu'augmenté dans un cas sur deux et n'est ainsi pas spécifique.

Le tableau XXIV ci-dessous regroupe l'ensemble des mutations trouvées pour les patients inclus.

Il est à noter que pour 50 % des patients les paramètres du canal impédance sont disponibles sans toutefois apporter des données exploitables.

Parmi les patients atteints de thrombopénie à grandes plaquettes, nous avons également inclus un cas de **filaminopathie liée à FLNA**. Ce dernier a été inclus à Nancy mais ne présente toutefois pas de thrombopénie. Cependant la patiente souffre d'hétérotopies péri-ventriculaires nodulaires congénitales ainsi que d'une cardiopathie liée à la persistance du canal artériel avec communication inter auriculaire. La confirmation du statut mutationnel de *FLNA* en lien avec ces anomalies cliniques a été réalisée et présentée dans un tableau ci-dessous (tableau XXV).

Concernant les indices plaquettaires, l'IPF % apparaît augmenté tout comme sa fraction la plus fluorescente H-IPF. A l'inverse des cas de GPS, les deux paramètres de tailles sont compris dans les valeurs témoins.

De plus l'ensemble des paramètres du canal impédance sont accessibles mais restent également dans les intervalles témoins.

Tableau XXIII : Résultats des valeurs des différents paramètres plaquettaires des patients inclus dans le groupe "grandes plaquettes".

		Impédance						Fluorescence						
		PLT-I (G/L)	VPM (fL)	P-LCR (%)	PCT (%)	PDW (fL)	P-MFV (fL)	PLT-F (G/L)	IPF (%)	IPF# (G/L)	H-IPF (%)	PLT-F-X	PLT-F-Y	PLT-F-Z
Valeurs réf		180,8 -319,5	8,73 -12,09	13,99 -41,59	0,19 -0,326	8,71 -15,87	7,3 -9,75	182 -362,7	0,75 -6,56	1,38 -13,7	0,21 -2,25	69 -86,86	52,04 -73,06	40,38 -48,64
Patient1	GPS	52	13,7	54,8	<u>0,07</u>	23,1	11,1	59	23	13,6	12,9	92,8	<u>66,2</u>	<u>35,1</u>
Patient2	GPS	78	<u>11,4</u>	<u>36,6</u>	<u>0,09</u>	<u>13,1</u>	<u>9,1</u>	78	7	5,5	3,4	<u>77,9</u>	<u>45,9</u>	<u>42,1</u>
Patient3	GPS	50	----	----	----	----	13,7	43	24,1	10,4	12,4	100,3	84,9	<u>45,4</u>
Patient4	GPS	48	----	----	----	----	14,9	54	23,8	12,9	12,2	99,2	80,3	<u>46,5</u>
Patient1	FLNA	170	<u>11,6</u>	<u>35,5</u>	<u>0,2</u>	<u>12,4</u>	<u>8,5</u>	<u>204</u>	15	30,6	8,3	<u>79,3</u>	<u>60,4</u>	<u>43</u>

Tableau XXIV : Liste des mutations retrouvées chez les patients inclus atteints d'un syndrome des plaquettes grises.

Patient	Mutation
Patient 1	En cours
Patient 2	p.1682F de <i>NBEAL2</i>
Patient 3	AAR2172H de <i>NBEAL2</i>
Patient 4	AAR2172H de <i>NBEAL2</i>

Tableau XXV : Liste des mutations retrouvées chez les patients inclus atteints d'une thrombopénie liée à *FLNA*.

Patient	Mutation
Patient 1	c.2449C>T

7.3.3 Thrombopénies constitutionnelles à plaquettes normales

Quatre patients présentant une TC à plaquettes de taille normale ont été inclus.

Parmi eux trois sont atteints d'une **thrombopénie familiale avec prédisposition aux leucémies FPD/AML**. Tous trois sont issus d'une même famille dans laquelle différents individus sont atteints de pathologies hématologiques (hémapathies malignes, TC). L'arbre généalogique ci-dessous illustre cette répartition familiale [186].

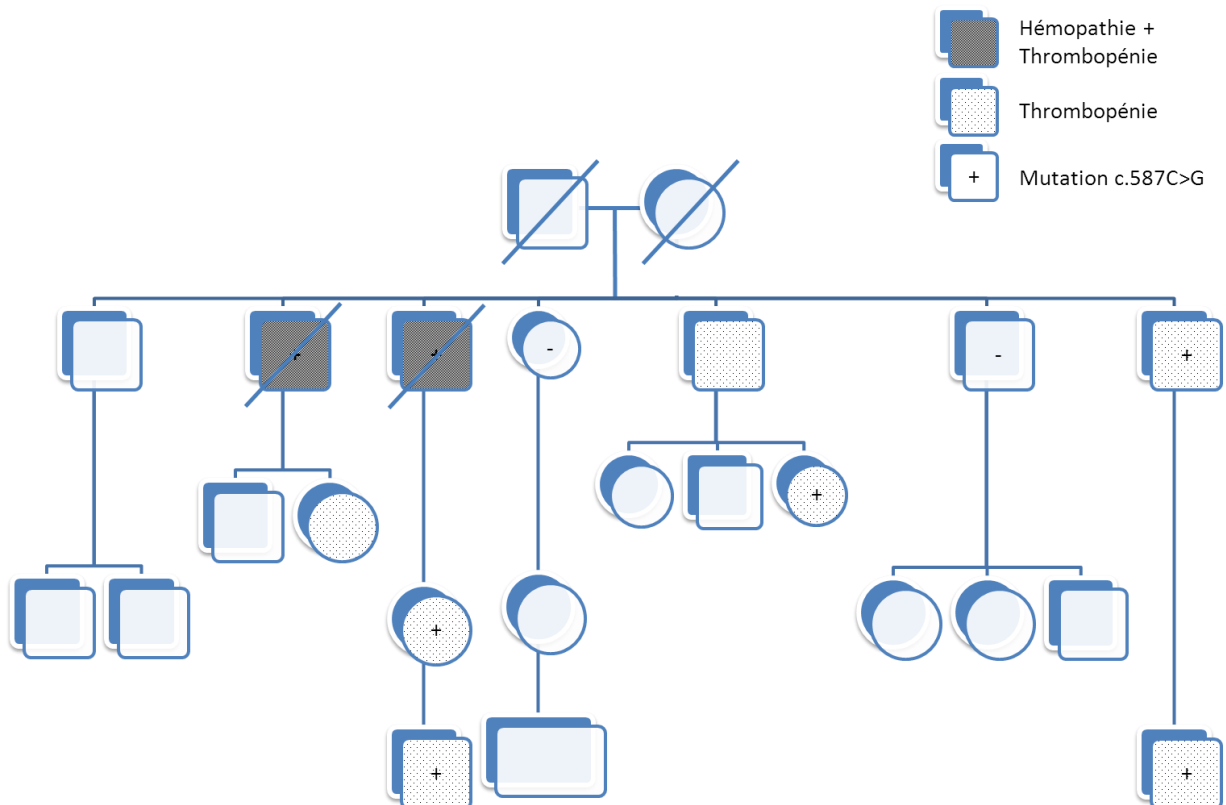


Figure 29 : Arbre généalogique de ce pedigree FPD/AML.

L'ensemble de ces patients présentent une thrombopénie modérée oscillant entre 85 G/L et 144 G/L. Cependant celle-ci n'est associée à aucune autre variation des paramètres

plaquettaires étudiés. L'ensemble des indices sont en effet compris dans les intervalles de référence.

Les mutations retrouvées chez ces patients sont rapportées dans le tableau XXVII.

Parmi les patients atteints de thrombopénie à plaquettes de taille normale, nous avons inclus également un patient du centre de Strasbourg atteint de **thrombopénie liée à ANKRD26**. Ce dernier présente une thrombopénie importante évaluée à 30 G/L associée à la normalité de l'ensemble des autres paramètres plaquettaires. En effet que ce soit dans le canal impédance et fluorescent, les indices se trouvent dans les valeurs témoins.

La mutation retrouvée chez ce patient est décrite dans le tableau XXVIII ci-dessous.

Tableau XXVI : Résultats des valeurs des différents paramètres plaquettaires des patients inclus dans le groupe "plaquettes normales".

		Impédance						Fluorescence						
		PLT-I (G/L)	VPM (fL)	P-LCR (%)	PCT (%)	PDW (fL)	P-MFV (fL)	PLT-F (G/L)	IPF (%)	IPF# (G/L)	H-IPF (%)	PLT-F-X	PLT-F-Y	PLT-F-Z
Valeurs réf		180,8 - 319,5	8,73 - 12,09	13,99 - 41,59	0,19 - 0,326	8,71 - 15,87	7,3 - 9,75	182 - 362,7	0,75 - 6,56	1,38 - 13,7	0,21 - 2,25	69 - 86,86	52,04 - 73,06	40,38 - 48,64
Patient1	FPD/AML	85	<u>9,8</u>	<u>24,3</u>	<u>0,08</u>	<u>11</u>	<u>7,5</u>	106	<u>2,8</u>	<u>3</u>	<u>0,8</u>	<u>71,2</u>	<u>52,1</u>	38,5
Patient2	FPD/AML	126	<u>11,6</u>	<u>37,6</u>	<u>0,15</u>	<u>14,6</u>	<u>9,1</u>	135	6,6	<u>8,9</u>	<u>2,1</u>	<u>85,2</u>	<u>70,9</u>	<u>45,1</u>
Patient3	FPD/AML	111	<u>9,1</u>	<u>17,4</u>	<u>0,1</u>	<u>9,2</u>	<u>7,5</u>	144	<u>1,5</u>	<u>2,2</u>	<u>0,4</u>	<u>69</u>	49,1	38,3
Patient1	ANKRD	31	<u>10,7</u>	<u>30,5</u>	<u>0,03</u>	<u>12,7</u>	<u>8,5</u>	33	<u>3,4</u>	1,1	<u>1,4</u>	<u>78</u>	<u>56,4</u>	<u>44,8</u>

Tableau XXVII : Liste des mutations retrouvées chez les patients inclus atteints d'une thrombopénie FPD/AML.

Patient	Mutation
Patient 1	c.587C>G
Patient 2	c.587C>G
Patient 3	c.587C>G

Tableau XXVIII : Liste des mutations retrouvées chez les patients inclus atteints d'une TC liée à ANKRD26.

Patient	Mutation
Patient 1	c.128G>A

7.3.4 Thrombopénies constitutionnelles à petites plaquettes

Deux patients présentant une TC à petites plaquettes ont été inclus provenant du centre de Nancy.

Parmi eux un patient est atteint d'un **syndrome de Wiskott Aldrich** et le second de la forme purement hématologique de ce syndrome, un **XLT**.

Tous deux présentent une thrombopénie modérée, de l'ordre de 50 à 100 G/L. Celle-ci est associée à un indice IPF % diminué ainsi qu'à un H-IPF effondré. L'ensemble des autres paramètres d'impédance ainsi que de fluorescence sont inférieurs aux valeurs témoins.

Concernant les indices de taille plaquettaire, P-MFV, PLT-F-Z et VPM sont nettement diminués correspondant bien à une microcytose plaquettaire.

L'ensemble des mutations retrouvées chez ces patients est décrit dans le tableau XXX ci-dessous.

Tableau XXIX : Résultats des valeurs des différents paramètres plaquettaires des patients inclus dans le groupe "petites plaquettes".

		Impédance						Fluorescence						
		PLT-I (G/L)	VPM (fL)	P-LCR (%)	PCT (%)	PDW (fL)	P-MFV (fL)	PLT-F (G/L)	IPF (%)	IPF# (G/L)	H-IPF (%)	PLT-F-X	PLT-F-Y	PLT-F-Z
Valeurs réf		180,8 -319,5	8,73 - 12,09	13,99 - 41,59	0,19 - 0,326	8,71 - 15,87	7,3 - 9,75	182 - 362,7	0,75 - 6,56	1,38 - 13,7	0,21 - 2,25	69 - 86,86	52,04 - 73,06	40,38 - 48,64
Patient1	WAS	51	7,5	7,3	0,04	7,4	6,6	72	0,3	0,2	0,1	48,4	34,8	32,7
Patient2	XLT	94	8	9,1	0,08	7,5	7,1	105	0,3	0,3	0,1	63,8	43,6	35,1

Tableau XXX : Liste des mutations retrouvées chez les patients inclus atteints d'une TC à petites plaquettes.

Patient	Mutation	Exon
Patient 1	TGA -> CGA	12
Patient 2	Arg -> Trp en 439	10

7.3.5 Purpura thrombopénique immunologique

Treize patients diagnostiqués PTI ont été inclus dans l'étude. Ces derniers proviennent de différents centres, Nancy, Strasbourg et Lyon.

Tableau XXXI : Résultats des valeurs des différents paramètres plaquettaires des patients inclus dans le groupe PTI.

		Impédance						Fluorescence						
		PLT-I (G/L)	VPM (fL)	P-LCR (%)	PCT (%)	PDW (fL)	P-MFV (fL)	PLT-F (G/L)	IPF (%)	IPF# (G/L)	H-IPF (%)	PLT-F-X	PLT-F-Y	PLT-F-Z
Valeurs réf		180,8 -319,5	8,73 - 12,09	13,99 - 41,59	0,19 - 0,326	8,71 - 15,87	7,3 - 9,75	182 - 362,7	0,75 - 6,56	1,38 - 13,7	0,21 - 2,25	69 - 86,86	52,04 - 73,06	40,38 - 48,64
Patient1	PTI	1	----	----	----	----	9.4	1	18.2	0.2	15.9	35.5	31	43.9
Patient2	PTI	27	----	----	----	----	17.6	26	40.7	10.6	23.8	117.8	117.4	55.4
Patient3	PTI	9	----	----	----	----	11.4	30	38.1	11.4	21.3	112.7	111.2	59.5
Patient4	PTI	33	----	----	----	----	16.1	32	40.2	12.9	22.1	121.5	111.1	58.2
Patient5	PTI	4	----	----	----	----	15.3	0	0	0	0	34.3	9	34.2
Patient6	PTI	4	----	----	----	----	16.8	1	39.8	0.4	23.3	108	96	73
Patient7	PTI	6	----	----	----	----	7.5	3	17.4	0.5	10.2	77.1	100.3	50.1
Patient8	PTI	18	13.7	49.8	0.02	20.2	8.2	13	10.3	1.3	5.1	87.9	63	45.8
Patient9	PTI	23	14.7	60.4	0.03	24.3	10.9	24	28.7	6.9	15.9	101.9	78.3	48.9
Patient10	PTI	6	----	----	----	----	10.7	7	33.9	2.4	21.8	124.2	87.6	44.1
Patient11	PTI	23	----	----	----	----	10.5	18	5.9	1.1	2.1	78.3	68.1	48.3
Patient12	PTI	32	----	----	----	----	16.6	42	45.2	19	30.3	119.6	93.4	49.9
Patient13	PTI	19	----	----	----	----	16.2	18	29.6	5.3	18.6	97.2	83.1	60.9

L'ensemble de ces patients présentent des thrombopénies très marquées associées à un IPF % supérieur aux valeurs témoins. On peut également constater que l'ensemble des paramètres étudiés, excepté l'IPF #, sont augmentés par rapport aux témoins.

On remarque également que le canal impédance ne permet pas, dans la majorité des cas, de rendre des paramètres plaquettaires exploitables.

7.4 Seuils discriminants

L'un des objectifs de ce travail est d'élaborer des seuils numériques, à l'aide de paramètres automatisés, dans le but de séparer les différents groupes de TC. Ceci, en parti afin de faciliter l'orientation des recherches génétiques vers un nombre plus ciblé de gènes.

Pour ce faire nous avons utilisé l'ensemble des cas de TC inclus dans l'étude.

7.4.1 Détermination

Pour chaque catégorie de TC, définie selon la classification de Noris *et al.* [6], nous avons tenté d'établir des seuils afin de séparer les différents groupes d'entités sur la base des paramètres automatisés de l'hématimètre.

Pour ce faire nous avons élaboré des courbes ROC pour chaque paramètre d'intérêt et dont les résultats sont présentés dans les tableaux XXXII à XXXV, classés par groupe de taille.

Pour chaque groupe, nous avons élaboré une combinaison bi-paramétrique permettant d'améliorer sensiblement les caractéristiques de sensibilité et de spécificité des tests. Ainsi il est possible d'améliorer la probabilité du diagnostic différentiel du groupe de TC. Cette combinaison, comme décrit par Noris *et al.* [6], intègre un paramètre de taille associé à un second évaluant une autre caractéristique plaquettaire.

Nous avons également établis, pour chaque groupe, un paramètre dit discriminant (indiqué par * dans les tableaux ci-dessous) permettant, en cas de discordance dans les combinaisons déterminées, de s'orienter plus favorablement vers ce groupe de TC. Cette détermination a été faite sur la base de leurs caractéristiques de performance.

Dans les différents tableaux, nous présentons les deux combinaisons possibles utilisant les deux indicateurs de taille plaquettaire (P-MFV et PLT-F-Z). De plus, pour chacun d'eux, deux possibilités sont décrites :

1. Dans le premier cas, une combinaison où les deux paramètres sont nécessairement présents.
2. Dans le second cas, une association où au moins un des deux paramètres est présent.

Ceci permet, avec l'un des deux paramètres de combler le manque de performance de l'association de ceux-ci. Ainsi il est possible d'obtenir une performance quasi maximale.

TC à plaquettes géantes

Concernant les TC à plaquettes géantes, l'ensemble des paramètres donne d'excellents résultats dans le but de différencier ces entités de toutes les autres. En effet la quasi-totalité des paramètres étudiés possèdent des AUC très proche de 1, comme par exemple l'IPF ayant une AUC de 0,96 ainsi qu'une sensibilité de l'ordre de 80% et une spécificité de 100 %.

En ce qui concerne l'évaluation de la taille cellulaire, le PLT-F-Z et le P-MFV présentent des caractéristiques similaires et proches des valeurs optimales.

C'est pourquoi nous présentons deux possibilités de combinaisons de ces seuils avec l'IPF, permettant de gagner en sensibilité et en spécificité et ainsi obtenir quasiment 100 % pour ces deux caractéristiques.

Tableau XXXII : Tableau regroupant les différents seuils déterminés pour chaque paramètre dans le cadre des TC à plaquettes géantes.

Pour distinction TC avec plaquettes géantes (**MYH9-BSS**) des autres formes

	Seuil	AUC	IC à 95%	Sensibilité %	Spécificité %
IPF (%)	> 23,85	0,97	(0,92 ; 1,00)	90,00	90,91
H-IPF (%)	> 12,50	0,94	(0,86 ; 1,00)	80,00	90,91
IPF# (G/L)	> 14,00	0,93	(0,81 ; 1,00)	95,00	90,91
PLT-F-X (ch)	> 99,75	0,96	(0,90 ; 1,00)	85,00	90,91
PLT-F-Y (ch)	> 80,40	0,94	(0,86 ; 1,00)	85,00	90,91
PLT-F-Z (ch)	> 47,55	0,97	(0,92 ; 1,00)	95,00	100
P-MFV (fL)	> 11,20	0,89	(0,78 ; 1,00)	85,00	81,82
IPF* ET P-MFV	>23,85 ET >11,20			80,00	81,8
IPF* et/ou P-MFV	>23,85 et/ou >11,20			95,83	90,91
IPF ET PLT-F-Z*	>23,85 ET >47,55			85,00	90,9
IPF et/ou PLT-F-Z*	>23,85 et/ou >47,55			100	100

Seuil, aire sous la courbe (AUC), intervalle de confiance (IC) à 95 % de l'AUC ainsi que la sensibilité et la spécificité pour chaque paramètre. * est le symbole du paramètre discriminant en cas de discordance avec le second paramètre de la combinaison.

Dans le cas des TC à plaquettes géantes nous avons déterminé que les paramètres discriminant des combinaisons, permettant le classement dans ce groupe, sont l'IPF % dans le premier cas et le PLT-F-Z dans le second.

Notons que les performances de nos paramètres sont similaires à celles décrites par Noris *et al.* [6] dans sa publication regroupant 376 patients et permettant, sur la base de critères de taille, la classification des TC en quatre groupes, dont celles de taille géantes.

Table 3. Platelet diameters for distinguishing IT with giant platelets

	Cutoff	AUC	Sensitivity %	95% CI	Specificity %	95% CI
MPD μm	>3.74	0.9154	86	79 to 91	87	82 to 90
PDDW μm	>4.27	0.8812	80	72 to 86	83	78 to 88
PDLCR %	>39.80	0.9208	85	78 to 91	87	83 to 90
MPD μm and PDLCR %	>3.74 and >39.8	0.9991	98	93 to 99	99	97 to 100

Area under the curve (AUC), sensitivity and specificity of best cutoff levels for MPD, PDDW, and PDLCR identified by receiver operating characteristic analysis in discriminating hMYH9-RD, tMYH9-RD, and bBSS from all other examined forms of thrombocytopenia.

Figure 30 : Tableau des performances des différents paramètres utilisés par Noris *et al.* pour le classement des TC à plaquettes géantes.

Source : Noris *et al.* [6]

TC à grandes plaquettes

Concernant les TC à grandes plaquettes, l'IPF ainsi que le H-IPF sont les deux indices les plus performants afin d'assurer une bonne distinction de ce groupe par rapport aux autres. En effet ces derniers possèdent des AUC de 1 associées à des sensibilités et spécificités de l'ordre de 100 %.

Toutefois les indicateurs de taille plaquettaire donnent également de bons résultats. Le P-MFV tout comme le PLT-F-Z peuvent être utilisés, leurs caractéristiques respectives entre le niveau haut et bas sont bonnes.

De plus, nous pouvons constater qu'il n'y a pas de zone grise entre les seuils déterminés pour ce groupe dans le niveau haut et les seuils calculés pour le groupe des TC à plaquettes géantes. La même remarque s'applique au niveau bas en lien avec le groupe des TC à plaquettes de taille normale.

Tableau XXXIII : Tableau regroupant les différents seuils déterminés pour chaque paramètre dans le cadre des TC à grandes plaquettes.

Pour distinction TC avec grandes plaquettes (**GPS-FLNA**) des TC à plaquettes géantes

	Seuil	AUC	IC à 95%	Sensibilité %	Spécificité %
IPF (%)	< 23,85	0,90	(0,79 ; 1,00)	80	85,71
H-IPF (%)	< 12,50	0,83	(0,67 ; 0,99)	80	76,19
IPF# (G/L)	< 14,00	0,81	(0,54 ; 1,00)	80	90,48
PLT-F-X (ch)	< 99,75	0,88	(0,74 ; 1,00)	80	76,19
PLT-F-Y (ch)	< 80,40	0,90	(0,78 ; 1,00)	80	85,71
PLT-F-Z (ch)	< 47,55	0,96	(0,89 ; 1,00)	100	95,24
P-MFV (fL)	< 11,20	0,74	(0,52 ; 0,96)	60	80,95
IPF* ET P-MFV	<23,85 ET <11,20			60,00	80,00
IPF* et/ou P-MFV	<23,85 et/ou <11,20			80	95,83
IPF* ET PLT-F-Z	<23,85 ET <47,55			80,00	85,00
IPF* et/ou PLT-F-Z	<23,85 et/ou <47,55			100	100

Pour distinction TC avec grandes plaquettes (**GPS-FLNA**) des autres groupes (TC à plaquettes de taille normale et petite taille)

	Seuil	AUC	IC à 95%	Sensibilité %	Spécificité %
IPF (%)	> 6,80	1	(1,00 ; 1,00)	100	100
H-IPF (%)	> 2,75	1	(1,00 ; 1,00)	100	100
IPF# (G/L)	> 4,25	0,97	(0,87 ; 1,00)	100	83,33
PLT-F-X (ch)	> 78,65	0,90	(0,71 ; 1,00)	80	83,33
PLT-F-Y (ch)	> 58,40	0,80	(0,52 ; 1,00)	80	83,33
PLT-F-Z (ch)	> 40,30	0,72	(0,39 ; 1,00)	80	66,67
P-MFV (fL)	> 8,80	0,93	(0,79 ; 1,00)	80	83,33
IPF* ET P-MFV	>6,80 ET >8,80			80,0	83,3
IPF* et/ou P-MFV	>6,80 et/ou >8,80			100	100
IPF* ET PLT-F-Z	>6,80 ET >40,30			80,0	66,7
IPF* et/ou PLT-F-Z	>6,80 et/ou >40,30			100	100

Seuil, aire sous la courbe (AUC), intervalle de confiance (IC) à 95 % de l'AUC ainsi que la sensibilité et la spécificité pour chaque paramètre. * est le symbole du paramètre discriminant en cas de discordance avec le second paramètre de la combinaison.

Dans le cas des TC à grandes plaquettes, nous avons déterminé que le paramètre discriminant de la combinaison, permettant le classement dans ce groupe, est l'IPF %.

En sus de la caractérisation des performances de sensibilité et de spécificité nous avons déterminé les valeurs prédictives positives (VPP) et négatives (VPN) des deux combinaisons. Les résultats sont présentés dans le tableau XXXVI.

TC à plaquettes de taille normale

Concernant les TC à plaquettes de taille normale, L'IPF ainsi que le H-IPF sont deux paramètres présentent d'excellentes caractéristiques. Leurs AUC de même que leurs sensibilités et spécificités respectives sont maximales.

Cependant, du fait de la petite taille de nos échantillons et pour la cohérence avec les autres groupes de TC, nous les avons combinés à un paramètre de taille plaquettaire. Dans ce domaine, P-MFV et PLT-F-Z ont des caractéristiques similaires, manquant de sensibilité mais possédant une excellente spécificité, de l'ordre de 96 % à 100 %.

Tableau XXXIV : Tableau regroupant les différents seuils déterminés pour chaque paramètre dans le cadre des TC à plaquettes de taille normale.

Pour distinction TC avec plaquettes normales (**FPD/AML-ANRKD**) des TC à grandes et géantes plaquettes

	Seuil	AUC	IC à 95%	Sensibilité %	Spécificité %
IPF (%)	< 6,80	1	(1,00 ; 1,00)	100	100
H-IPF (%)	< 2,75	1	(1,00 ; 1,00)	100	100
IPF# (G/L)	< 6,60	0,98	(0,93 ; 1,00)	75	96,15
PLT-F-X (ch)	< 78,65	0,97	(0,91 ; 1,00)	75	96,15
PLT-F-Y (ch)	< 58,40	0,90	(0,79 ; 1,00)	75	92,31
PLT-F-Z (ch)	< 39,35	0,90	(0,79 ; 1,00)	50	96,15
P-MFV (fL)	< 8,20	0,95	(0,87 ; 1,00)	50	96,15
IPF* ET P-MFV	<6,80 ET <8,20			50,0	96,3
IPF* et/ou P-MFV	<6,80 et/ou <8,20			100	100
IPF* ET PLT-F-Z	<6,80 ET <39,35			50,0	96,3
IPF* et/ou PLT-F-Z	<6,80 et/ou <39,35			100	100

Pour distinction TC avec plaquettes normales (**FPD/AML-ANRKD**) des TC à petites plaquettes

	Seuil	AUC	IC à 95%	Sensibilité %	Spécificité %
IPF (%)	> 0,90	1	(1,00 ; 1,00)	100	100
H-IPF (%)	> 0,25	1	(1,00 ; 1,00)	100	100
IPF# (G/L)	> 0,70	1	(1,00 ; 1,00)	100	100
PLT-F-X (ch)	> 70,10	1	(1,00 ; 1,00)	75	100
PLT-F-Y (ch)	> 46,35	1	(1,00 ; 1,00)	100	100
PLT-F-Z (ch)	> 36,70	1	(1,00 ; 1,00)	100	100
P-MFV (fL)	> 7,30	1	(1,00 ; 1,00)	100	100
IPF* ET P-MFV	>0,90 ET >7,30			100	100
IPF* et/ou P-MFV	>0,90 et/ou >7,30			100	100
IPF* ET PLT-F-Z	>0,90 ET >36,70			100	100
IPF* et/ou PLT-F-Z	>0,90 et/ou >36,70			100	100

Seuil, aire sous la courbe (AUC), intervalle de confiance (IC) à 95 % de l'AUC ainsi que la sensibilité et la spécificité pour chaque paramètre. * est le symbole du paramètre discriminant en cas de discordance avec le second paramètre de la combinaison.

Dans le cas des TC à plaquettes de tailles normales, nous avons déterminé que le paramètre discriminant de la combinaison, permettant le classement dans ce groupe, est l'IPF %.

De plus, nous pouvons constater qu'il n'y a pas de zone grise entre les seuils déterminés pour ce groupe dans le niveau haut et les seuils calculés pour le groupe des TC à plaquettes de grande taille. De même pour le niveau bas en lien avec le groupe des TC à plaquettes de petite taille.

Ceci excepté pour l'IPF# où nous observons un chevauchement entre les deux derniers groupes. Ce paramètre n'étant pas utilisé dans nos algorithmes, celui-ci n'impact pas les résultats.

En sus de la caractérisation des performances de sensibilité et de spécificité nous avons déterminé les valeurs prédictives positives (VPP) et négatives (VPN) des deux combinaisons. Les résultats sont présentés dans le tableau XXXVI.

TC à petites plaquettes

Concernant les TC à petites plaquettes, l'ensemble des paramètres donne de très bons résultats dans le but de concourir au diagnostic différentiel de ces différentes entités. La totalité des AUC est quasiment maximale de même que les différentes sensibilités et spécificités.

L'IPF ainsi que le H-IPF sont d'excellents indicateurs tout comme le P-MFV et PLT-F-Z au niveau de la taille plaquettaire.

Toutefois c'est la combinaison de l'IPF et du P-MFV qui donne les meilleurs résultats avec 100 % de sensibilité et de spécificité.

Tableau XXXV : Tableau regroupant les différents seuils déterminés pour chaque paramètre dans le cadre des TC à petites plaquettes.

Pour distinction TC avec petites plaquettes (**WAS/XLT**) des autres formes

	Seuil	AUC	IC à 95%	Sensibilité %	Spécificité %
IPF (%)	< 0,90	1,00	(1,00 ; 1,00)	100	100
H-IPF (%)	< 0,25	1,00	(1,00 ; 1,00)	100	100
IPF# (G/L)	< 1,65	1,00	(1,00 ; 1,00)	100	96,67
PLT-F-X (ch)	< 70,10	1,00	(1,00 ; 1,00)	100	96,67
PLT-F-Y (ch)	< 46,15	1,00	(1,00 ; 1,00)	100	96,67
PLT-F-Z (ch)	< 36,70	0,99	(0,96 ; 1,00)	100	96,67
P-MFV (fL)	< 7,30	1,00	(1,00 ; 1,00)	100	100
IPF ET P-MFV*	<0,90 ET <7,30			100	100
IPF et/ou P-MFV*	<0,90 et/ou <7,30			100	100
IPF ET PLT-F-Z*	<0,90 ET <36,70			100	96,55
IPF et/ou PLT-F-Z*	<0,90 et/ou <36,70			100	100

Seuil, aire sous la courbe (AUC), intervalle de confiance (IC) à 95 % de l'AUC ainsi que la sensibilité et la spécificité pour chaque paramètre. * est le symbole du paramètre discriminant en cas de discordance avec le second paramètre de la combinaison.

Dans le cas des TC à petites plaquettes, nous avons déterminé que les paramètres discriminant de la combinaison, permettant le classement dans ce groupe, sont le P-MFV dans le premier cas et le PLT-F-Z dans le second.

Notons que la performance de nos paramètres est légèrement supérieure à celles décrites par Noris *et al.* [6] dans sa publication regroupant 376 patients et permettant, sur la base de critères de taille, la classification des TC en quatre groupes dont celles de petite taille.

Table 4. Cutoff values of platelet diameters for distinguishing IT with normal or slightly decreased platelet size

	Cutoff	AUC	Sensitivity %	95% CI	Specificity %	95% CI
MPD μm	<2.62	0.9217	83	58 to 96	90	87 to 93
PDDW μm	<2.85	0.8333	78	52 to 93	83	79 to 86
PDLCR %	<9.62	0.9202	94	71 to 100	80	76 to 84
PDSCR %	>2.11	0.8763	83	58 to 96	86	82 to 89
MPD μm and PDLCR %	<2.62 and <7.21	0.9852	96	87 to 99	93	90 to 95

AUC, sensitivity and specificity of best cutoff levels for MPD, PDDW, PDLCR, and PDSCR identified by receiver operating characteristic analysis in discriminating WAS/XLT, CYCS-RT, CAMT, and TAR from all other forms of thrombocytopenia.

Figure 31 : Tableau des performances des différents paramètres utilisés par Noris *et al.* pour le classement des TC à petites plaquettes.

Source : Noris *et al.* [6]

Performances globales

En sus de la caractérisation des performances des différentes combinaisons paramétriques, nous avons également déterminé les valeurs prédictives positives (VPP) et valeurs prédictives négatives (VPN). Les résultats sont décrits ci-dessous :

Tableau XXXVI : Tableau récapitulatif des performances des différentes combinaisons paramétriques pour chaque catégorie de TC.

		Seuils	Sensibilité %	Spécificité %	VPP %	VPN %
Géantes	IPF ET P-MFV	>23,85 ET >11,20	80,0	81,8	88,9	69,2
	IPF ET PLT-F-Z	>23,85 ET >47,55	85,0	90,9	94,7	76,9
Grandes	IPF ET P-MFV	<23,85 ET <11,20	60,0	80,0	42,9	88,9
	IPF ET PLT-F-Z	<23,85 ET <47,55	80,0	85,0	57,1	94,4
	IPF ET P-MFV	>6,80 ET >8,80	80,0	83,3	80,0	83,3
	IPF ET PLT-F-Z	>6,80 ET >40,30	80,0	66,7	66,7	80,0
Normales	IPF ET P-MFV	<6,80 ET <8,20	50,0	96,3	66,7	92,3
	IPF ET PLT-F-Z	<6,80 ET <39,35	50,0	96,3	66,7	92,3
	IPF ET P-MFV	>0,90 ET >7,30	100,0	100,0	100,0	100,0
	IPF ET PLT-F-Z	>0,90 ET >36,70	100,0	100,0	100,0	100,0
Petites	IPF ET P-MFV	<0,90 ET <7,30	100,0	100,0	100,0	100,0
	IPF ET PLT-F-Z	<0,90 ET <36,70	100,0	96,55	66,7	100,0

Nous pouvons ainsi observer que les VPN sont dans l'ensemble très bonnes, permettant de conclure que la probabilité que le patient soit exclu du groupe en question est forte en cas de négativité du couple paramétrique correspondant. Néanmoins les VPP sont également acceptables, toutes supérieures à 66% excepté pour les TC à grandes plaquettes, permettant d'affirmer que la probabilité que le patient appartienne au groupe de TC en question est forte en cas de positivité de la combinaison bi-paramétrique.

7.4.2 Application

Dans le but d'étudier les performances des différents seuils déterminés précédemment, nous les avons appliqués à une population hospitalisée. Nous avons utilisé l'ensemble des patients du CHRU de Nancy pour lesquels un hémogramme a été prescrit et au niveau duquel une thrombopénie a été retrouvée. Sur la période s'étalant de 02 décembre 2015 au 04 janvier 2016, 722 patients ont été analysés via le canal PLT-F dans le cadre de leur thrombopénie.

Les résultats sont indiqués dans le tableau XXXVII ci-dessous :

Tableau XXXVII : Tableau des résultats de l'application des algorithmes de classement des TC dans la population thrombopénique du CHRU de Nancy pour la période de décembre 2015 à janvier 2016.

	IPF + P-MFV	IPF + PLT-F-Z
Plaquettes géantes	14 (1,9%)	13 (1,8%)
Plaquettes de grande taille	158 (21,9%)	165 (22,9%)
Plaquettes de taille normale	75 (10,4%)	68 (9,4%)
Plaquettes de petite taille	4 (0,6%)	1 (0,1%)

Le pourcentage indiqué est la part du nombre de patients positifs à l'algorithme parmi les 722 patients thrombopéniques recrutés.

Nous pouvons constater de ces résultats, que l'application des différents algorithmes de classement des TC, chez les patients hospitalisés souffrant de thrombopénie, permet d'exclure un très grand nombre de patients.

Parmi les patients positifs pour les algorithmes, l'étude des dossiers médicaux permet d'exclure une TC dans une majorité des cas.

En effet, l'observation d'une numération plaquettaire normale antérieure à la thrombopénie en cause permet d'écartier une origine constitutionnelle. Ceci est le cas chez environ 80% des patients positifs. Concernant les patients restant, présentés dans le tableau ci-dessus, l'étude du dossier clinique montre :

1. Dans le groupe des plaquettes géantes, on ne retrouve plus que 3 patients. Ces derniers souffrent respectivement d'un paludisme grave à *Plasmodium falciparum* et d'une cirrhose virale liée au virus de l'hépatite C. Le troisième cas a été pris en charge en service de cardiologie dans le cadre d'un infarctus du myocarde. Ainsi dans ces diverses situations, il est possible de trouver une origine à la thrombopénie.
2. Dans le groupe des plaquettes de grande taille, seuls 20 cas ne sont pas exclus pour cause d'antécédent normal de numération plaquettaire, d'hémopathies aiguës ou de chimiothérapie. Parmi eux, 4 patients souffrent d'un PTI chronique, 12 sont traités par chimiothérapie dans le cadre de cancers solides et enfin les 4 derniers présentent une cirrhose d'origine virale [187].
3. Dans le groupe des plaquettes de taille normale, uniquement 5 patients ne possèdent pas d'antécédents normaux. Ces derniers présentent dans un cas un PTI chronique et dans tous les autres un traitement par chimiothérapie.
4. Dans le groupe des plaquettes de petite taille, les quatre patients souffrent d'une hémopathie aiguë de type leucémie aiguë myéloïde.

Il est à noter qu'aucune TC n'a été révélée en lien avec l'absence de consultation au sein du CCPP du CHRU de Nancy.

A la vue de ces résultats, bien que les algorithmes déterminés dans le chapitre précédent soient destinés à une population suspecte de TC, nous pouvons conclure sur le fait qu'ils possèdent tout de même de bonnes performances au sein d'une population générale thrombopénique. Ils ne génèrent qu'un faible pourcentage de faux positifs, qu'il est de plus aisément possible de réduire par l'exploitation du contexte clinique.

7.4.3 Cas du PTI

Concernant le PTI, nous avons comme objectif de pouvoir préciser le diagnostic différentiel avec les TC. Cependant la population PTI présente une répartition des différents indices plaquettaires très hétérogène, ce qui limite grandement la séparation avec les patients TC (WAS/XLT exclus).

Toutefois les résultats par rapport aux témoins sains montrent des AUC élevées et des caractéristiques de sensibilité et de spécificité intéressantes.

Ceci permet d'affirmer que la différence entre la population de PTI et la population saine est aisément réalisable. Nous pouvons également confirmer que l'augmentation de l'IPF % au cours de pathologies type PTI, en lien avec les publications le décrivant comme significativement augmenté au cours de thrombopénies d'origine périphérique.

Par ailleurs, nous avons décrit dans la partie 3.2.1.c concernant l'IPF, plusieurs articles explicitant l'intérêt du paramètre dans le PTI par rapport à diverses pathologies.

Sokolic *et al.* présentent en 2015 [151] un article détaillant l'intérêt de cet indice plaquettaire dans le cadre du diagnostic différentiel du PTI afin de permettre d'envisager un WAS. Au cours de notre étude nous avons pu élaborer des courbes ROC pour nos différents paramètres et ainsi constater une nette différence entre les deux populations, PTI et WAS. En effet, les AUC sont pour la plupart très proches de 1, de même que les sensibilités et spécificités.

Ces résultats corroborent ainsi ceux de la publication, assurant une très bonne séparation entre les patients PTI et les patients WAS. L'IPF % se trouvant fortement augmenté par rapport aux WAS, de même que l'ensemble des autres paramètres.

Cependant nous pouvons constater que la publication de Sokolic rapporte pour l'ensemble des cas de PTI des valeurs de VPM alors que dans notre étude, seulement deux patients possèdent des valeurs d'impédance. Cette différence peut s'expliquer soit par la grande hétérogénéité de présentation de la morphologie des PTI soit par la différence de sélection des patients considérés comme PTI.

Il rapporte également que l'ensemble des WAS/XLT ne montre pas systématiquement des plaquettes de tailles réduites, même si ses résultats ne l'illustrent pas. Nous sommes en accord avec ce dernier point, nos indices de taille plaquettaire étant diminués dans les cas de WAS et XLT par rapport aux PTI.

Un récent second article [152] illustre l'utilisation de l'IPF % afin de distinguer les PTI de cas de syndrome MYH9. Il est rapporté une augmentation cinq fois supérieure de cet indice dans le cas de la TC par rapport au PTI.

Les résultats de notre étude ne permettent pas d'aboutir à la même conclusion. En effet, les différentes courbes ROC, y compris celle de l'IPF %, présentent quasiment toutes des AUC proches de 0,5, seuil de supériorité non significative pour l'un des deux paramètres.

Tableau XXXVIII : Tableau récapitulatif des données ROC dans les cas de PTI.

	PTI vs Témoins		PTI vs WAS		PTI vs MYH9	
	Seuil	AUC	Seuil	AUC	Seuil	AUC
IPF (%)	> 8,5 (91,67 100,0)	0,99	< 3,10 (100,0 100,0)	1,00	> 40,80 (41,18 91,67)	0,65
H-IPF (%)	> 3,75 (91,67 100,0)	0,99	< 1,10 (100,0 100,0)	1,00	> 24,15 (41,18 91,67)	0,59
IPF # (G/L)	< 2,550 (50,00 100,0)	0,61	< 0,35 (100,0 91,67)	0,94	> 12,95 (100,0 91,67)	0,98
PLT-F-X (ch)	> 87,00 (66,67 100,0)	0,75	< 70,45 (100,0 83,33)	0,83	> 122,4 (35,29 91,67)	0,72
PLT-F-Y (ch)	> 76,10 (75,00 100,0)	0,86	< 53,30 (100,0 91,67)	0,92	> 113,5 (52,94 91,67)	0,76
PLT-F-Z (ch)	> 48,25 (75,00 96,77)	0,86	< 44,00 (100,0 91,67)	1,00	> 64,30 (70,59 91,67)	0,84
P-MFV (fL)	> 9,45 (75,00 96,77)	0,87	< 7,30 (100,0 100,0)	1,00	> 17,05 (35,29 91,67)	0,70

Résultats des courbes ROC réalisées pour le PTI par rapport, respectivement, aux témoins, aux patients WAS et aux patients MYH9. Sont indiquées les AUC correspondantes aux différentes courbes en fonction du paramètre.

Sont également indiquées pour chaque seuil, la sensibilité (%) et la spécificité (%) correspondante.

8 DISCUSSION

8.1 Critères de validation de méthode

Le premier objectif de notre travail était de définir et caractériser les performances de l'ensemble des paramètres que nous avons utilisés.

Dans cette étude nous utilisons principalement des paramètres non validés en routine, au niveau européen tout du moins. C'est pourquoi il a été nécessaire d'étudier leur comportement. Pour ce faire nous avons utilisé différents outils décrits dans le document SH GTA 04 publié par le COFRAC et relatif à la norme NF EN ISO 15189.

Fidélité

Nous avons vu précédemment que les résultats de la fidélité intermédiaire sont comparables à ceux de la répétabilité, avec des CV légèrement supérieurs dans le premier cas. Ceci étant attendu du fait que les causes de variations sont beaucoup plus importantes sur des passages de reproductibilité que de répétabilité. En effet on y fait varier un maximum de paramètres, que ce soit le technicien qui manipule, le jour de l'analyse, les lots réactifs, etc...

Néanmoins il est intéressant de noter que, dans les deux cas, la numération plaquettaire en fluorescence montre un CV plus important que l'impédance sur le niveau haut. On pourrait s'attendre à ce que le marquage fluorescent, très spécifique des plaquettes, permette d'obtenir une précision plus importante quel que soit le niveau. Toutefois, il est possible d'émettre une hypothèse afin d'expliquer ce phénomène par le principe de fluorescence lui-même. En effet celle-ci aura tendance à se disperser faisant varier l'intensité dans les cas où le nombre d'éléments marqués est très important. La précision de la mesure va s'en ressentir par rapport à la technologie d'impédance qui n'est influencée que par la taille des éléments et non par le nombre, à l'inverse de la fluorescence.

On confirme ici la supériorité des performances du canal fluorescent dans les cas de thrombopénies, zone de mesure pour laquelle il a initialement été conçu [105][106][109][112].

Il est également intéressant de remarquer que les trois niveaux de contrôles, PLT-F-X, PLT-F-Y et PLT-F-Z, possèdent la même moyenne de valeurs. Les CV se retrouvent aussi sensiblement identiques. Ceci provient du fait que les tests de fidélités ont été réalisés à l'aide des CIQ XN CHECK SYSMEX®, ceux-ci étant constitués d'une matrice différente du plasma. De plus, par souci de durée de conservation des contrôles, les cellules sont modifiées et l'ensemble formé ne reflète pas réellement l'état physiologique d'un patient. En effet ces CIQ sont fabriqués dans l'objectif d'assurer une stabilité de 7 jours après ouverture, ce qui est impossible dans les conditions physiologiques. La nature même de l'échantillon de CIQ explique ainsi cet élément.

Dans notre cas, l'inconvénient de l'utilisation de ce type d'échantillon n'influe cependant pas sur l'exploitation des résultats de fidélité. L'objectif de ces tests étant de caractériser la répétabilité et/ou la reproductibilité de l'analyseur, l'usage d'une matrice non physiologique ne peut pas impacter ces résultats de CV. L'ensemble des tests étant réalisé avec ce même type d'échantillon. Toutefois le problème lié à ce type d'utilisation est l'impossibilité de couvrir la totalité du domaine de mesure et ainsi limiter la visibilité dans les intervalles extrêmes, où peuvent se situer les plus grandes variabilités analytiques.

Incertitudes

Dans le cadre de l'étude des caractéristiques de ces nouveaux paramètres, il est nécessaire d'en évaluer les incertitudes. Ceci est nécessaire dans le but de faciliter l'interprétation des variations observées.

Néanmoins ce calcul n'a pas été possible pour l'ensemble des indices que nous utilisons du fait d'un manque de données. En effet aucun EEQ n'est disponible afin d'évaluer l'exactitude de mesure de l'ensemble des paramètres fluorescents. Toutefois, par l'intermédiaire du programme d'externalisation des CIQ du fournisseur SYSMEX®, il est possible de récupérer des données pour certains paramètres. La fréquence de passage de ces contrôles au sein du laboratoire du CHRU de Nancy permet, sur un même lot de CIQ, d'obtenir un nombre conséquent de valeurs assurant une représentation statistiquement significative.

Nous pouvons constater, comme attendu, des incertitudes plus importantes sur le niveau bas que sur les niveaux supérieurs concernant la plupart des indices plaquettaires.

Concernant les différences entre les deux technologies de comptage, on remarque que sur le niveau bas correspondant aux thrombopénies, la fluorescence se montre bien plus performante avec une incertitude de 4,82 % contre 11,61 % en impédance. Alors que dans les deux autres niveaux, les incertitudes se superposent.

Ceci permet de conforter l'intérêt du canal PLT-F dans les cas de faibles numérations plaquettaires.

En ce qui concerne le canal fluorescent, il est également intéressant de constater que les incertitudes des deux paramètres IPF et PLT-F-Z sont identiques dans les trois niveaux de contrôle. Ceci est à mettre en relation avec les moyennes respectives qui sont toutes les trois semblables, environ 19,9 % pour l'IPF % et environ 40 ch pour le PLT-F-Z.

Ceci peut s'expliquer par la nature même de l'échantillon de contrôle de qualité interne. En effet, le tube de XN CHECK SYSMEX® utilisé, bien que comportant des plaquettes d'origine humaine, ne possède pas un milieu de conservation dont la composition est semblable à la matrice physiologique et les modifications apportées aux cellules ne permettent pas de refléter totalement le comportement réel des éléments sanguins. Il est ainsi impossible de couvrir l'ensemble du domaine de mesure et d'autant plus les valeurs extrêmes où les variations analytiques sont le plus importantes.

Enfin, la méthode même de calcul de l'incertitude est sujette à discussion. En effet, de par l'utilisation des CIQ externalisés dans le calcul, nous lissons le biais via l'intégration de la moyenne des contrôles dans la formule.

Une autre limite de cette méthode, en comparaison avec celle exploitant les résultats d'EEQ, est l'utilisation dans la formule du même échantillon de contrôle dans les deux termes de la racine carré. Ceci étant moins statistiquement représentatif que l'utilisation des EEQ. Néanmoins, les valeurs de CIQ étant les seules disponibles, ces dernières permettent une évaluation correcte de l'incertitude.

Stabilité

Nous avons également réalisé une étude de stabilité dans le but d'analyser le délai maximal tolérable avant passage sur l'hématimètre des échantillons. Cette donnée portant sur des paramètres non évalués dans la littérature, il est nécessaire de définir une limite de temps acceptable à communiquer à l'ensemble des centres participant à l'étude. Nous avons ainsi déterminé que ce délai ne devrait excéder 3 heures.

Pour ce faire nous avons analysé plusieurs témoins sains à différents temps. De par cette méthode nous induisons initialement un biais non négligeable lié au fait que nos échantillons

ont une numération plaquettaire comprise dans les valeurs de référence. Notre étude ne concernant que des patients thrombopéniques, ces tests de stabilité ne sont ainsi pas représentatifs des variations que nous pourrions constater dans la zone basse de numération. Nous avons en effet montré des CV de répétabilité et de reproductibilité plus important pour le niveau bas que pour le niveau normal. Ainsi notre population saine n'est pas totalement représentative des patients inclus dans l'étude.

Cependant, l'utilisation de thrombopénies dans le cadre de l'analyse de stabilité s'est avérée très difficile. En effet il nous était impossible d'assurer l'heure réelle de prélèvement des échantillons dans les services cliniques afin d'établir une cinétique précise. De manière globale, des problèmes d'ordre logistique ne nous ont pas permis de réaliser ceci alors que concernant les patients inclus, l'ensemble des prélèvements sont réalisés au sein du laboratoire, ce qui permet d'assurer le délai pré-analytique établis.

On peut ainsi dire que la stabilité de 3h que nous avons établie est amputée de ce biais de numération.

Toutefois, au niveau de ces analyses nous avons utilisé des échantillons humains, stockés à température ambiante dans le but d'être totalement corrélé avec les conditions expérimentales de l'étude de nos patients. Aucun problème de matrice ni de composition des échantillons n'est à signaler dans ces analyses.

Il est également à remarquer que le résultat de 3h de stabilité est très strict par rapport aux conditions pré-analytiques habituellement admises et décrites dans la littérature pour la numération cellulaire [174][175]. En effet, ces dernières rapportent une stabilité de l'ordre de 24 heures, mais elles se limitent, au sein des paramètres plaquettaires, à l'étude de la numération pour laquelle nous retrouvons également cette donnée.

Dans ce contexte, deux points sont importants à signaler pour la comparaison de nos résultats aux différentes publications :

Dans un premier temps, la méthode de calcul, utilisant un test de Student avec échantillons appariés, est très restrictive et participe à limiter le délai de stabilité. D'autres moyens de calculs sont plus permissifs. Cependant l'association du test de Student avec la transformée de Bland Altman permet l'utilisation de critères d'acceptation strictes, basés sur les performances réelles des différents paramètres (répétabilité/reproductibilité). Ceci malgré l'approche faite de la fidélité intermédiaire par un calcul basé sur les résultats de répétabilité ($EC_{\text{reproductibilité}} = 2,8 \times EC_{\text{répétabilité}}$).

Dans un second temps, ce délai se justifie dans le canal fluorescent. En effet nous pouvons observer une nette décroissance du PLT-F-Y, illustrée par une constante augmentation du biais positif à partir de 3h. Ce paramètre étant associé à la mesure de l'intensité de fluorescence, il est possible de le mettre en relation avec les perturbations du PLT-F observées. Néanmoins, dans ce contexte nous aurions pu nous attendre à des modifications également sur les autres indices de fluorescence tels que l'IPF % et le H-IPF.

Dans le but de préciser cette information de délai de stabilité, nous avons réalisé une analyse selon une autre méthode des paramètres PLT-I, PLT-F et PLT-F-Y, ces derniers étant rapidement impactés avec l'analyse selon le test de Student.

Nous avons utilisé la méthode décrite dans le SH GTA 04 [179], édité par le COFRAC dans le cadre de la norme NF EN ISO 15189. Les graphiques de résultats sont donnés dans l'annexe 4 de ce travail.

Ce guide technique décrit que la limite de stabilité correspond à la dernière valeur comprise dans l'intervalle définit (traits rouges sur les graphiques).

On constate alors que pour les numérations, en impédance et en fluorescence, les délais de stabilité peuvent être prolongés par rapport aux 3 heures initialement déterminées. En effet ces dernières peuvent être encore acceptées au-delà de 12 heures voir 24 heures.

Dans le cas de ces numérations il est plausible que le test de Student soit trop sensible et restreigne de manière trop importante le délai pré-analytique souhaitable.

Néanmoins, il est intéressant de noter que le PLT-F-Y sort de l'intervalle dès 75 minutes pour les six témoins dans cette technique. Il convient alors de prendre en compte le délai pré-analytique dans l'interprétation et l'utilisation des paramètres de fluorescence. Entre 75 minutes et 3 heures, seuil de significativité statistique, il est possible de négliger les différences observées, toutefois au-delà, l'analyse devient critique et sujette à caution.

Il est possible d'établir l'hypothèse que ce délai pré-analytique n'impacte que la stabilité du PLT-F-Y et non des autres paramètres de fluorescence dans notre étude, du fait que nous avons travaillé sur une population saine. En effet les valeurs d'IPF% et H-IPF sont faibles dans cette population et les variations causées par l'instabilité du PLT-F-Y ne sont pas significativement observables. Alors que chez un patient possédant un fort indice d'IPF et/ou H-IPF, une variation du niveau de fluorescence peut possiblement impacter les résultats. Sur le graphique du PLT-F présentant FSC en fonction de SFL, une plaquette se situant dans la zone de l'IPF ou du H-IPF peut s'en retrouver exclue en fonction du temps, par la baisse du niveau de fluorescence.

Ceci laisse entrevoir un éventuel artéfact au niveau de nos populations de patients. Pour les échantillons analysés postérieurement au délai de 75 – 175 minutes, les variations observées par rapport au groupe de TC auxquelles elles appartiennent peuvent avoir pour origine soit l'hétérogénéité de distribution du paramètre au niveau du groupe soit le délai pré-analytique. Il est alors indispensable d'éliminer l'ensemble des échantillons qui ne respectent pas ces contraintes pré-analytiques.

L'analyse visuelle des graphiques du canal PLT-F ne permet pas de constater une éventuelle déformation du nuage de points, avec une déviation vers la gauche liée à la perte de fluorescence.

Une autre hypothèse peut alors être avancée, celle de la modification des capacités de marquage des plaquettes. En effet, le marquage fluorescent ne s'effectuant qu'au niveau de la prise d'essai de manière extemporanée, l'intensité ne peut ainsi se disperser au cours du temps. La seule origine possible de cette variation vient de la technique de marquage. Nous avons détaillé précédemment que le fluorochrome pénètre la plaquette afin de se fixer sur des éléments riches en acides nucléiques. Ainsi il est possible d'envisager une altération des capacités de la cellule à incorporer le fluorochrome et/ou à le conserver au cours du temps.

La numération plaquettaire ne s'en voit pas impactée du fait que les éléments sont tout de même marqués, seule l'intensité se voit diminuée. Ceci n'explique cependant pas l'absence de variation de l'IPF% et H-IPF en relation avec la baisse d'intensité de fluorescence. Nous rappelons que ces deux indices sont basés sur des seuils de fluorescence au-delà desquels les plaquettes sont comptées dans l'une de ces deux catégories.

Afin d'éclaircir cette observation il serait intéressant de réaliser cette étude de stabilité sur des patients présentant un fort pourcentage d'IPF associé à une thrombopénie. Les variations des populations plaquettaires ne peuvent qu'être davantage mises en évidence.

8.2 Etablissement des valeurs témoins

Le second objectif de notre travail a été d'établir des valeurs témoins, dans le but de vérifier que la population saine se distribue dans un groupe comparable et ne présente pas une hétérogénéité trop importante.

De plus, dans le but d'établir un schéma diagnostique, la détermination de valeurs témoin est nécessaire afin de positionner les patients TC par rapport aux témoins sains.

Toutefois, l'élaboration d'intervalles témoins est un exercice délicat. De nombreux éléments sont à prendre en compte et peuvent introduire des biais.

En effet, le plus difficile est le recrutement des sujets dits sains. Pour ce faire une partie de nos données provient de patients donneurs de sang à l'Etablissement Français du Sang (E.F.S.). Ce sont des patients ayant bénéficiés d'un entretien avec un médecin, ce qui a permis d'éliminer les patients associés à une pathologie. La seconde partie provient de volontaires établis comme sains, non pas après un examen médical mais sur la base de l'absence de prise de thérapeutique et en particulier l'absence de traitements agissant ou interférant avec les fonctions plaquettaires.

Concernant le choix des patients sains à inclure, l'âge, le sexe ainsi que le statut tabagique sont également à prendre en compte. Il est en effet décrit [147] que ces différences influent sur la numération plaquettaire. Néanmoins, du fait d'un faible nombre de témoins sains inclus, nous avons fait le choix de ne pas reclasser les témoins en fonction de ces différents critères. Nous avons de plus validé nos valeurs témoins par la comparaison des intervalles calculés avec ceux de la littérature. La numération plaquettaire a ainsi été utilisée comme point de comparaison, permettant par extension de confirmer l'hypothèse de validité de notre population saine, bien que très réduite. Cependant nous montrons que les autres paramètres sont également cohérents avec les données bibliographiques comme l'illustre le tableau XXXIX ci-dessous, regroupant différents intervalles de références publiés par différents auteurs :

Tableau XXXIX : Tableau récapitulatif des valeurs de références des paramètres plaquettaires, selon les auteurs.

		Impédance				Fluorescence			
	n	PLT-I (G/L)	MPV (fL)	P-LCR (%)	PDW (fL)	PLT-F (G/L)	IPF (%)	IPF# (G/L)	H-IPF (%)
XN	Valeurs témoins pour notre étude 31	[180,8-319,5]	[8,73-12,09]	[13,99-41,59]	[8,71-15,87]	[182-362,7]	[0,75-6,56]	[1,38-13,7]	[0,21-2,25]
XN	Ko et al. [124]	[138-398]					[0,5-9,7]		
XE	Strauß et al. [119]	[150-400]	[9,3-12,1] [9,1-11,9]	[18,5-42,3] [17,5-42,3]	[10,1-16,1] [9,9-15,4]		[1,1-6,1]		
XE	Pujol et al. [118]	[197-272]	[9,9-11,2]	[25,4-35,3]	[11,7-13,9]		[2-4]	[4,7-8,9]	[0,5-1,2]
XE	Pekelharing et al. [121]	[166-308] [173-390]	[9,3-12,1] [9,1-11,9]	[18,5-42,3] [17,5-42,3]	[10,1-16,1] [9,9-15,5]		[0,8-6,3] [0,8-6,2]	[2,3-12,7]	[0,2-1,9]

Liste des différentes publications qui rapportent des valeurs de référence sur automates SYSMEX® de séries XN et XE. Sont quelques fois décrites des valeurs associées aux hommes (lignes du dessus) et aux femmes (lignes du dessous).

Nous pouvons constater que nos résultats sont en accord avec les données de la littérature même si encore peu d'études rapportent des valeurs obtenues par le XN SYSMEX®. Ko *et al.* [120], en comparant les séries XE et XN, décrit en effet des différences dans les intervalles de références trouvés pour chacun des types d'automates.

De plus il est à noter que les méthodes de calculs de ces intervalles peuvent être différentes selon les publications tout comme les classes d'âges utilisées. Certains auteurs ne rapportent pas ce type d'information de même que le profil tabagique. Ainsi les comparaisons doivent rester prudentes même si ces données permettent de confirmer la validité de notre population saine, considérant des individus de la population générale sans distinctions particulières.

Concernant la détermination des intervalles de référence, plusieurs modes de calculs sont rapportés dans la littérature. Celui majoritairement utilisé, pour sa simplicité de mise en œuvre (également décrit par le SH GTA 04 v01 [179] du COFRAC dans le cadre de la norme NF EN ISO 15189), est l'utilisation de la moyenne et de l'écart type de la distribution. Cependant cette méthode nécessite que la distribution soit gaussienne, d'écarter les valeurs aberrantes ainsi que les valeurs initialement éloignées de la moyenne de plus de deux écart-types. L'intervalle en résultant est la moyenne retranchée et additionnée de deux fois le nouvel écart type obtenu.

Les dernières recommandations du CLSI (IFCC–CLSI C28-A3) préfèrent quant à elles ne pas éliminer les valeurs aberrantes. Ces dernières n'ayant que peu d'impact sur les méthodes de calculs non paramétriques. Ainsi nous avons appliqué ces recommandations internationales dans l'élaboration de nos intervalles de références, par l'application du logiciel *Reference Value Advisor*.

Les conditions pré-analytiques sont également un élément majeur pour la validité et la bonne exploitation des résultats des témoins. Dans ce cadre, notre étude de stabilité a permis d'établir un délai limite pré-analytique à respecter, et ce dans un environnement de température ambiante. Ainsi, l'ensemble des témoins sélectionnés respectent ces critères.

Dans la suite de la prise en charge, les aspects analytiques sont également importants à prendre en compte. Ceux-ci étant aisément maîtrisés par le respect des procédures du laboratoire concernant les contrôles qualités et le traitement des échantillons.

Nous nous sommes également contentés de recruter des témoins sains uniquement sur le site du CHRU de Nancy. Ceci par soucis de simplicité et de coût. En effet le passage de volontaires sains, en dehors de tout motif hospitalier, induit une augmentation significative de la consommation de réactifs et de ce fait le coût de cette détermination de valeurs témoins. Ceci permet aussi de limiter la difficulté de recrutement. De plus, le risque de biais induit par l'effet multicentrique de l'étude est limité par l'utilisation du même type d'hématimètre, le respect des normes de qualité exigées aujourd'hui dans les laboratoires et par la comparabilité des différents centres possesseurs de XN SYSMEX® via le programme d'externalisation des CIQ.

Ainsi nous nous sommes limités à l'utilisation de donneurs sains sur un seul site.

8.3 Classification paramétrique des TC

Le troisième objectif de notre travail était d'établir une classification et une caractérisation de chaque groupe de TC, à l'aide de paramètres automatisés, afin de reproduire la classification morphologique établie par Noris *et al.* [6] sur la base de la taille plaquettaire.

L'hétérogénéité des méthodes actuellement disponibles et utilisées dans la démarche diagnostique est en soi une limite dans l'identification des TC, et ce d'autant plus qu'elles manquent très souvent de standardisation. Ainsi l'approche diagnostique via des paramètres automatisés peut permettre de contribuer à une amélioration de sa standardisation.

Pour ce faire nous avons fait le choix d'utiliser un paramètre de taille plaquettaire ainsi qu'un paramètre autre, disponibles sur le XN SYSMEX®. L'analyse statistique des différentes performances nous a permis de sélectionner les paramètres les plus pertinents.

Concernant le paramètre de taille, deux indicateurs sont disponibles, PLT-F-Z ainsi que P-MFV, tous deux possédant des caractéristiques de performances similaires.

Un élément important de ce travail est l'approche standardisée et automatisée qui a été utilisée. En effet, les paramètres déterminés sont disponibles grâce à un hématimètre de routine en cytologie hématologique, disponible dans de nombreux laboratoires, et permettent par leur standardisation une approche objective et rapide.

Ceci en comparaison avec les méthodes actuellement décrites qui font appel, comme principal critère, à la microscopie optique. De ce fait, une expertise confirmée est requise induisant un biais de subjectivité inter-opérateurs, une difficulté d'accès à l'information et un temps d'examen relativement long. Ce type d'analyse n'est en effet réalisé que dans certains centres spécialisés en pathologies plaquettaires.

Ainsi nous présentons dans le tableau ci-dessous, les différentes TC que nous avons inclus dans l'étude et classées grâce à l'utilisation d'un couple de paramètres. Nous pouvons observer que la répartition des pathologies est strictement identique à celle décrite dans la publication de Noris *et al.* [6]. Cette classification de TC a été possible grâce aux différents seuils que nous avons établis dans le chapitre précédent (§ 7.4.1) :

Tableau XL : Tableau de la classification des TC selon les paramètres automatisés XN SYSMEX® par le canal PLT-F.

Groupe	Taille		Fluorescence	TC
	PLT-F-Z (ch)	P-MFV (fL)	IPF (%)	
TC à plaquettes géantes	> 47,55	> 11,20	> 24,70	MYH9 bBSS
TC à grandes plaquettes	[40,30 ; 47,55]	[8,80 ; 11,20]	[6,80 ; 24,70]	GPS FLNA
TC à plaquettes de taille normale	[36,70 ; 39,35]	[7,3 ; 8,2]	[0,9 ; 6,8]	FPD/AML ANKRD26
TC à petites plaquettes	< 36,7	< 7,30	< 0,9	WAS XLT

Dans le cadre de notre travail, nous n'avons pas pu distinguer, au sein du syndrome MYH9, les patients atteints de mutations au niveau du domaine moteur et du domaine queue. En effet notre effectif ne comporte qu'un seul patient affecté par une mutation du premier domaine.

Nous pouvons cependant observer que les paramètres de taille plaquettaire se comportent de manière tout à fait cohérente avec les observations micrométriques de Noris *et al.* Toutefois les variations de l'IPF sont relativement étonnantes.

En effet, cet indice de fluorescence est initialement décrit comme permettant de faire la différence entre les causes d'hypoproduction médullaire et de destruction périphérique des plaquettes [150]. Hors pour l'ensemble des cas de TC une des étapes de mégacaryopoïèse est impactée, expliquant en parti, la présence d'une thrombopénie avec une taille plaquettaire variable.

On constate tout de même que l'IPF est très élevé dans les cas de TC à plaquettes géantes et très diminué dans les cas de TC à petites plaquettes. Nous avons également montré précédemment que divers articles rapportent une augmentation de l'IPF et/ou du taux de plaquettes réticulées au cours de la stimulation hématopoïétique post-chimiothérapie [188][189].

Il est donc nécessaire de bien différencier ces deux approches. En effet dans le premier cas concernant les TC, nous exploitons cet indice de fluorescence dans le cadre de plaquettes pathologiques provenant d'une dysmégacaryopoïèse, alors que dans le second cas, nous sommes en présence d'une mégacaryopoïèse normale ou en cours de régénération. Ainsi l'interprétation de l'IPF% doit être différente selon le contexte.

Il est incontestable que dans le cadre d'une régénération plaquettaire ou d'une thrombopénie d'origine centrale, l'IPF%, reflet de l'immaturité d'une fraction plaquettaire, est un indicateur efficace. Dans le cadre d'une pathologie plaquettaire, l'IPF% ne peut être le témoin de cette régénération mais peut permettre son classement.

Cette étude multicentrique ayant pour objectif de caractériser les TC par l'utilisation de paramètres plaquettaires innovants automatisés, nous avons pu confirmer la classification existante, basée sur la mesure micrométrique des plaquettes, grâce à l'hématimètre XN SYSMEX®.

Nous avons travaillé de manière rétrospective par l'intermédiaire de cas génétiquement confirmés, mais la poursuite de cette étude dans une démarche prospective et/ou rétrospective permettra de renforcer les effectifs de ces pathologies rares et éventuellement conforter les caractéristiques observées.

8.4 Distinction avec le purpura thrombopénique immunologique

Un des objectifs de ce travail était d'établir un moyen permettant de contribuer au diagnostic différentiel entre le PTI et les TC. En effet cette distinction est parfois très délicate et peut en résulter une mauvaise prise en charge thérapeutique. La littérature rapporte effectivement d'assez nombreux cas de patients ayant été splénectomisés dans le cadre de la cortico-résistance de leur PTI. Ces derniers souffrant finalement d'une forme de TC ne nécessitant pas ce type d'intervention chirurgicale [190].

Cependant nos résultats (figure 28 et tableaux XXI / XXXVIII) rapportent une grande hétérogénéité de répartition de l'ensemble des paramètres plaquettaires dans cette pathologie. Ceci ne permet pas de faire sortir un marqueur ou une combinaison multiparamétrique afin d'orienter le diagnostic vers un PTI.

Toutefois il est possible de relever des biais dans cette section. En effet les critères d'inclusion de ces cas de PTI n'ont pas été initialement définis dans notre protocole. Il n'est pas non plus fait distinction entre les formes aiguës des formes chroniques, des formes traitées/non traitées ou encore résistantes aux traitements. Ces différents arguments peuvent être une des

hypothèses à la grande dispersion des résultats. Il serait intéressant pour l'ensemble de ces cas de remonter à la caractérisation du stade de la pathologie (aigüe/chronique) afin de constater ou non l'existence d'une sous-population différenciable au sein des PTI.

De manière globale, aucun marqueur ne permet de trancher le diagnostic de PTI dans le cadre d'un différentiel avec une TC. Seul le WAS (ou XLT) peut être suspecté avec une bonne sensibilité et spécificité avec un IPF < 3,10 % (cf tableau XXXVIII).

De plus, contrairement à ce qui a été rapporté dans la littérature (et décrit dans un chapitre précédent), la différence PTI / MYH9 n'est pas réalisable sur la seule base des paramètres automatisés. En effet il s'avère que les PTI inclus dans cette étude ont un comportement très hétérogène, recoupant sensiblement les zones de valeurs de certaines TC, même à plaquettes géantes. Il est à noter que dans le syndrome MYH9, seule une certaine proportion de plaquettes est assimilable à des plaquettes géantes. Ainsi le frottis sanguin retrouve une dispersion des plaquettes dans les trois groupes de tailles. Ceci permet d'expliquer que le PTI, pathologie où le frottis peut également montrer une variation de taille plaquettaire importante, est difficilement différenciable du MYH9.

Cependant nous pouvons supposer que la différence avec le syndrome de Bernard-Soulier peut être plus aisée. En effet cette dernière pathologie rapporte une plus faible dispersion de son indice IPF% à la vue des résultats précédents.

Le tableau XLI rapporte les résultats des différentes courbes ROC modélisées afin d'essayer de différencier le PTI des cas de BSS.

Tableau XLI : Tableau récapitulatif des courbes ROC dans la modélisation PTI vs BSS.

	PTI vs bBSS	
	Seuil	AUC
IPF (%)	> 43,20 (100,0 100,0)	1,00
H-IPF (%)	> 25,90 (100,0 100,0)	1,00
IPF # (G/L)	> 14,2 (100,0 100,0)	1,00
PLT-F-X (ch)	> 124,6 (75,0 100,0)	0,98
PLT-F-Y (ch)	> 118,1 (75,00 100,0)	0,80
PLT-F-Z (ch)	> 64,50 (75,0 90,91)	0,75
P-MFV (fL)	< 8,05 (25,0 90,91)	0,59

On constate ainsi qu'il est possible de distinguer, grâce à certains paramètres de fluorescence tels IPF% / H-IPF / PLT-F-X, les deux entités que sont le PTI et le BSS. Il est intéressant de remarquer que les indicateurs de taille plaquettaire ne révèlent pas de performances exploitables dans cette différenciation. On peut alors conclure que sur le plan automatisé,

aucune séparation selon la taille des éléments ne peut être faite, ceci se confirmant par l'analyse des frottis sanguins. Ces derniers ne permettent pas de mettre en évidence une différence significative sur la variabilité des tailles plaquettaires.

Néanmoins, l'IPF% montre de très bons résultats de même que le paramètre de structure, PLT-F-X. Ce dernier s'avère particulièrement élevé dans les cas de BSS par rapport aux PTI. Ce point est relativement étonnant car l'étude des frottis colorés au MGG ne permet pas de mettre en évidence cette différence.

On peut ainsi affirmer qu'il est envisageable de distinguer PTI des deux formes extrêmes de TC, d'un point de vue de la taille, à savoir le WAS et le BSS. L'intérêt n'étant que limité si l'on met en rapport les fréquences de ces différentes pathologies. En effet même si aucun chiffre de prévalence n'est disponible pour les TC, le WAS et le BSS ne sont pas les formes les plus fréquentes dans ce groupe de maladies rares. Ceci à la différence du syndrome MYH9 que nous avons développés précédemment.

Une très récente publication de Fiore *et al.* [191] met en évidence les difficultés de la différenciation entre les PTI et les TC. Néanmoins elle rapporte que la taille plaquettaire par l'évaluation du VPM (sur technologie Coulter) permet, dans une certaine mesure, de séparer les deux groupes de pathologies. Toutefois par l'analyse de la population étudiée, il est possible de constater que leurs patients TC sont pour la plupart des patients MYH9 possédant ainsi des plaquettes géantes. De plus du fait du petit échantillonnage ils démontrent une différence significative entre leurs cas de PTI et leurs TC. Ceci n'est pas retrouvé dans notre série, en cause possiblement, l'utilisation de technologies différentes qui ne sont pas standardisées dans le rendu du VPM [116]. De plus les cas de PTI sélectionnés peuvent également varier par rapport à notre population du fait de critères d'inclusions différents.

Finalement, ils assurent la distinction entre les formes acquises et constitutionnelles principalement par l'âge de découverte, l'histoire familiale, le VPM et l'étude des plaquettes au microscope électronique. Ce dernier point n'étant pas réalisable en routine, ils confirment les principaux éléments diagnostiques connus que nous avons revus.

Le diagnostic de PTI doit résulter d'un faisceau d'arguments cliniques et biologiques, qui ont conduit à éliminer les autres causes de thrombopénie.

Finalement, dans le but d'établir un diagnostic différentiel PTI *versus* TC, seule l'exploitation globale de tout un faisceau d'arguments permettra de s'orienter efficacement. Ainsi une consultation spécialisée des pathologies plaquettaires, l'analyse des antécédents clinico-biologiques du patient et de sa famille, l'analyse des données PLT-F ainsi que le frottis sanguin associés aux tests de deuxième ligne permettront de renseigner davantage ce diagnostic différentiel.

8.5 Algorithme diagnostique

Le dernier objectif de ce travail était d'élaborer un algorithme diagnostique reprenant l'ensemble des données disponibles concernant les TC. Le but étant de déterminer des points essentiels en première ligne et de les confirmer secondairement.

Par compilation des différents algorithmes publiés dans la littérature concernant les TC, nous avons établis plusieurs arbres diagnostiques détaillés ci-dessous. Ces derniers permettent dans diverses situations d'orienter le dialogue clinico-biologique vers la recherche d'une TC et/ou de cibler les analyses de deuxième ligne à réaliser. L'ensemble de ces organigrammes décisionnels se basent sur les phénotypes plaquettaires que nous avons précédemment déterminés.

Il est possible de les utiliser et de les interpréter selon plusieurs portes d'entrée :

1. La première, dans le cas d'une suspicion de TC avec des arguments cliniques. En effet, après mise en évidence d'une thrombopénie dans un contexte familial ou associée à d'autres arguments comme l'existence de la thrombopénie depuis la naissance, des hémopathies type leucémie aiguë dans la famille, des malformations, ... il est possible d'entrer dans l'arbre diagnostique.
2. La seconde est au niveau de la validation biologique de routine. En effet lors de la validation d'une thrombopénie il serait intéressant, en plus de rechercher le contexte et la présence d'antécédents de numération plaquettaire basse, d'observer le comportement des indices de fluorescence PLT-F. Ce faisceau d'arguments permettant d'entrer dans l'arbre diagnostique.

Ce second point peut être validé par l'analyse rétrospective que nous avons réalisé au chapitre 7.4.2 sur plus d'un mois de patients thrombopéniques ayant bénéficiés d'un passage en PLT-F au CHRU de Nancy (tous services confondus).

Il apparaît en effet que l'application de nos algorithmes n'engendre qu'un faible nombre de réponses dans la population générale d'un CHU et ainsi qu'un faible nombre de patients pour lesquels il serait intéressant de pousser le dialogue clinico-biologique plus en profondeur.

Il est toutefois intéressant de noter que dans notre tableau XXXVII un fort pourcentage de patients se situe dans la zone des plaquettes de taille augmentée. Ceci vient du fait que c'est dans ce groupe que nous retrouvons le plus de patients sous chimiothérapie, pour des affections hématologiques ou solides. Ces traitements perturbant fortement l'hématopoïèse de ces patients, il est normal de voir ressortir des plaquettes de grandes tailles en lien avec la forte régénération hématopoïétique. De nombreux papiers s'intéressent en effet à prévoir les sorties d'aplasie sur la base de l'IPF [154][155]. La mégacaryopoïèse étant généralement la première lignée se rétablissant, la sortie d'une fraction de plaquettes réticulées serait le témoin d'une production plaquettaire intense, témoin d'une prochaine sortie d'aplasie.

A l'hôpital, la majorité des cas de thrombopénies est liée à une cause toxique à type de chimiothérapie et de ce fait l'interprétation de ces algorithmes ne peut se concevoir en dehors de l'analyse du contexte clinique et thérapeutique du patient.

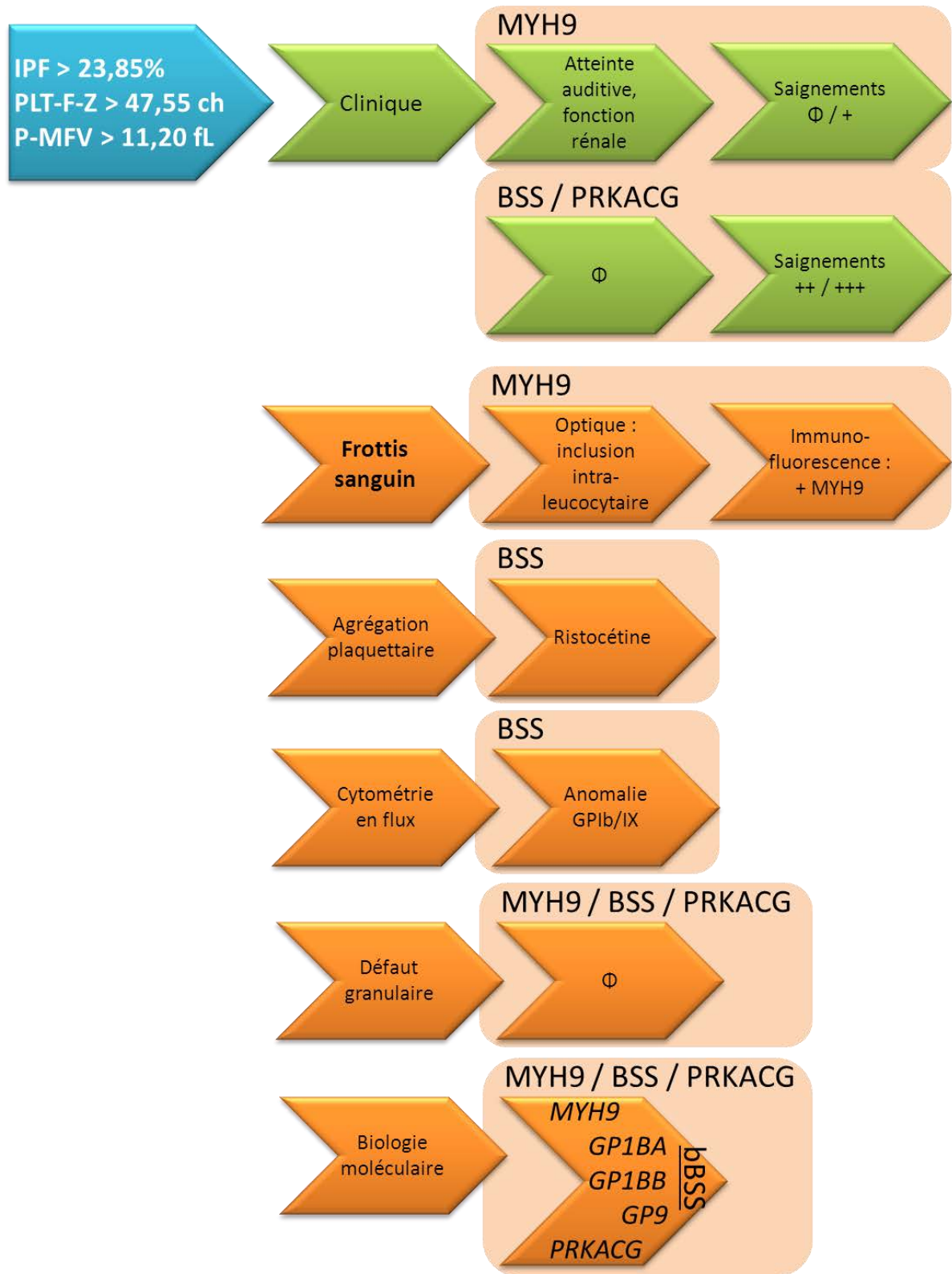


Figure 32 : Arbre diagnostique des TC à plaquettes géantes.

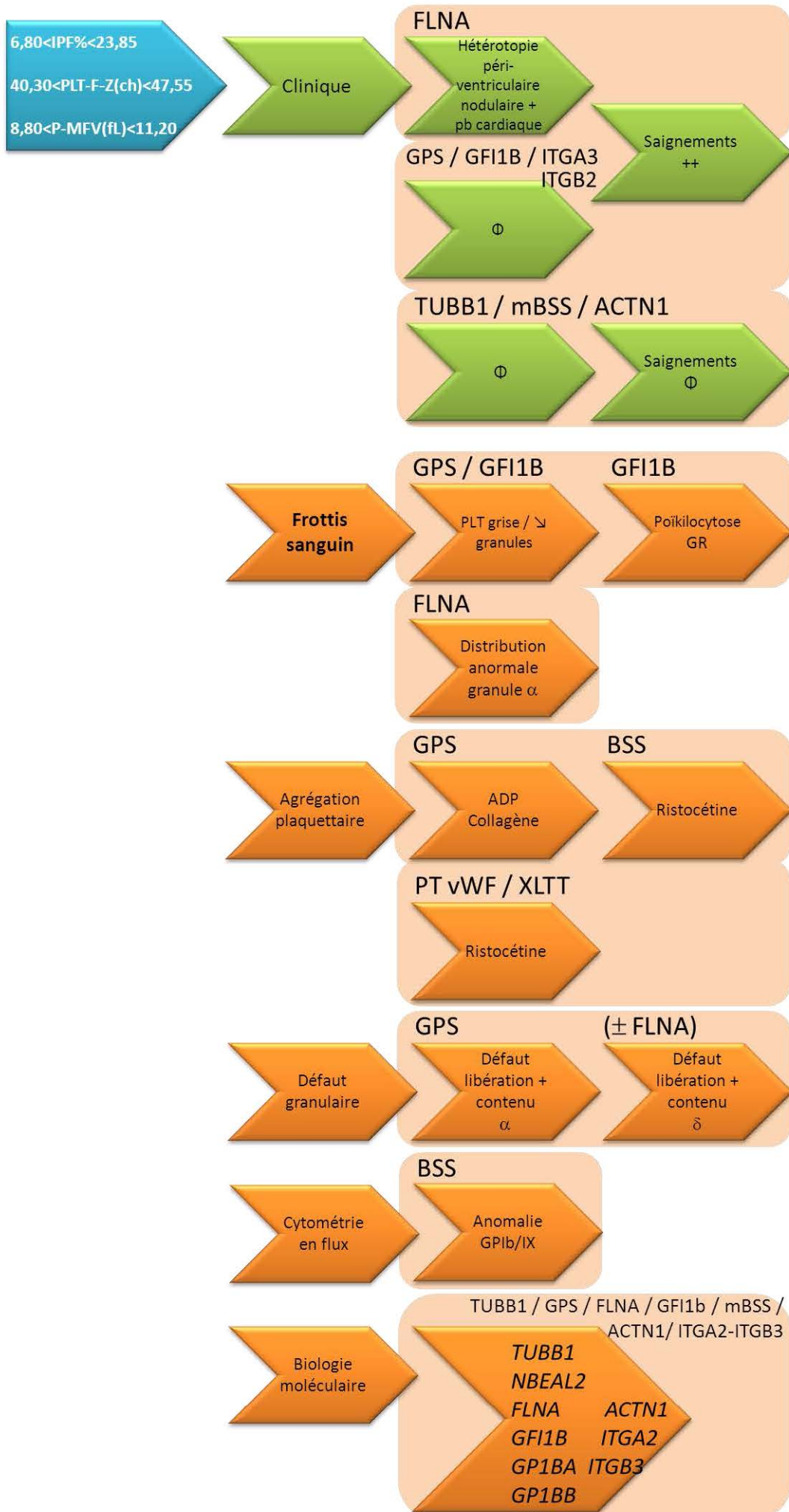


Figure 33 : Arbre diagnostique des TC à grandes plaquettes.

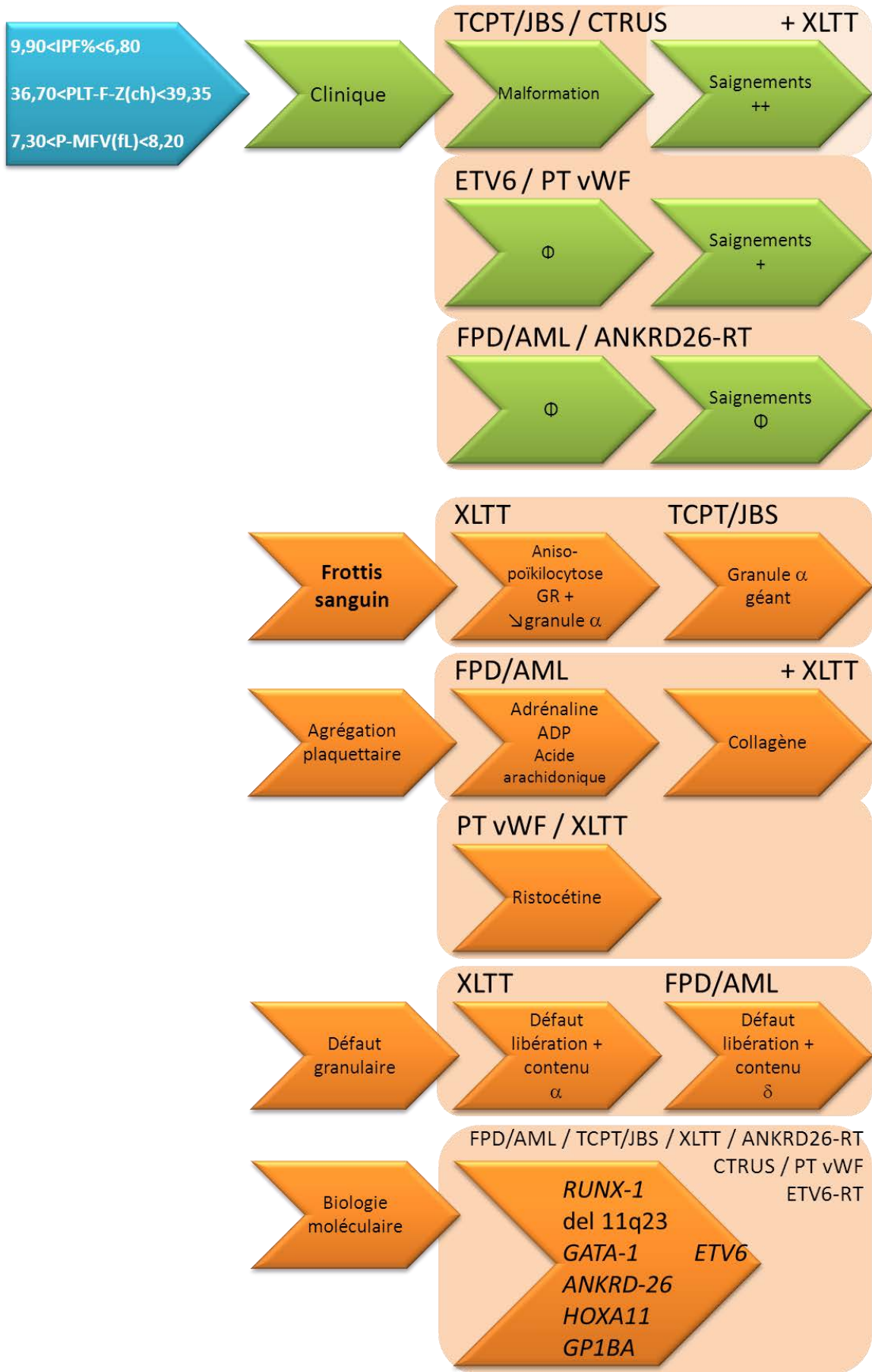


Figure 34 : Arbre diagnostique des TC à plaquettes de taille normale.

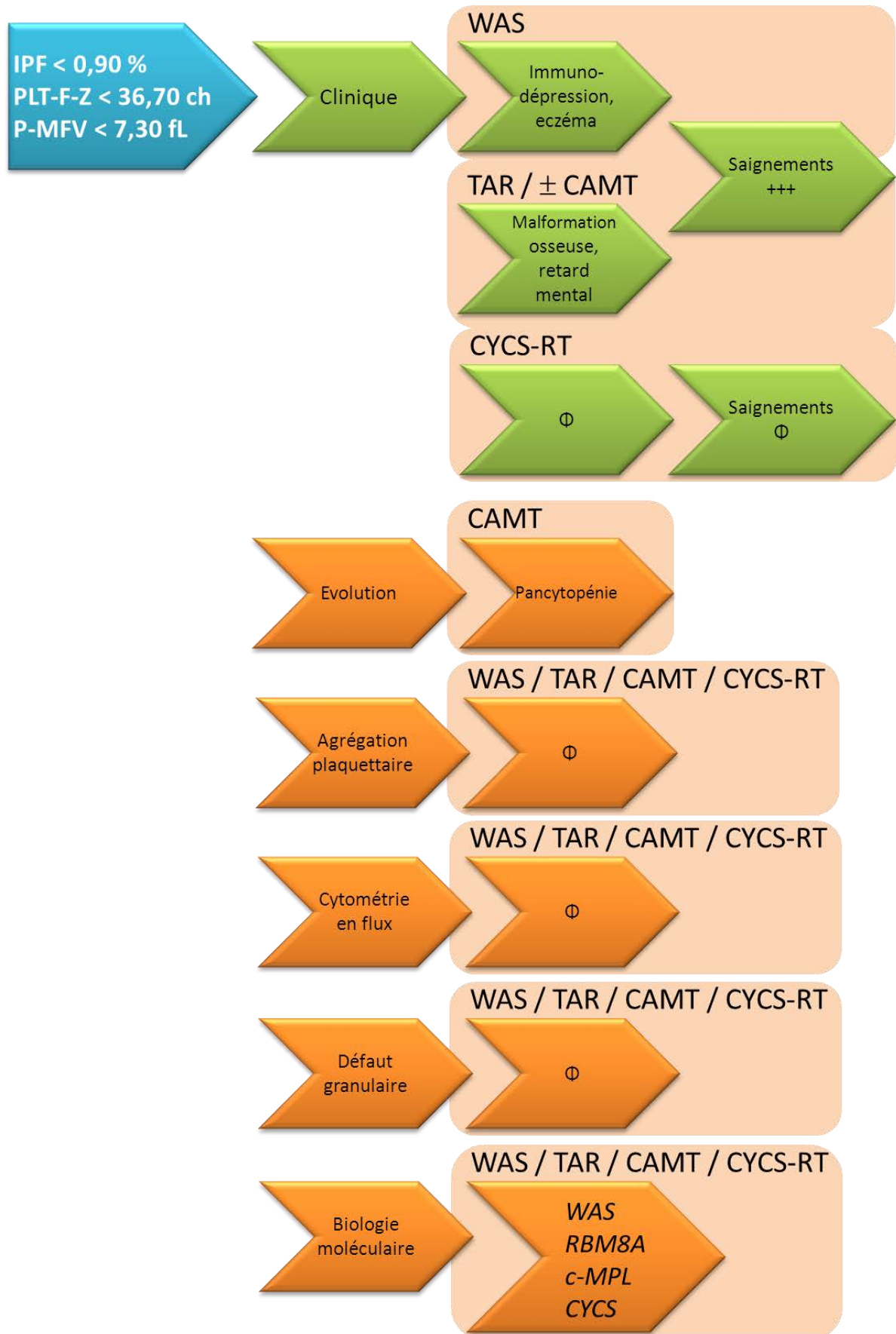


Figure 35 : Arbre diagnostique des TC à plaquettes de petite taille.

9 CONCLUSION

Ce travail avait pour objectif d'aider à la standardisation de la démarche diagnostique des TC grâce à l'utilisation de paramètres innovants portant sur la morphologie plaquettaire. Ces derniers ont l'avantage d'être automatisés et de bénéficier ainsi des performances de robustesse d'un automate. De plus un autre atout de ce type de paramètre est leur rapidité et leur facilité d'obtention de même que leur possible disponibilité dans un grand nombre de laboratoires. L'analyse de la taille et de la morphologie plaquettaire peut en effet être très chronophage quand elle est réalisée manuellement.

Ce travail a également contribué à une meilleure compréhension et une meilleure maîtrise du fonctionnement de l'hématimètre XN SYSMEX® et de certains de ses paramètres.

Nous avons réussi à reproduire la classification de Noris *et al.* publiée en 2014 [6], qui fait actuellement référence dans le domaine des TC. Rappelons que cette dernière est basée sur le critère de la taille plaquettaire, analysée au microscope optique et de ce fait sujette aux variations inter-opérateurs. L'autre inconvénient majeur est l'important temps nécessaire à l'analyse des frottis. Ainsi, par l'utilisation de paramètres automatisés nous avons souhaité réduire ces difficultés afin d'apporter davantage de standardisation.

Ceci a été possible grâce à la collaboration de différents CHU, permettant l'inclusion de pathologies rares, et grâce à l'analyse statistique au sein de notre population de patients atteints de TC, des différents indices plaquettaires disponibles sur l'hématimètre. Le choix des paramètres a été fait sur la base de l'étude de leurs performances, en termes de sensibilité, spécificité et de valeurs prédictives positives et négatives.

L'utilisation de seuils discriminants nous a permis d'établir des algorithmes décisionnels. Ces derniers ont été construits pour répondre à deux problématiques différentes. La première, et selon notre objectif initial, est de participer au dialogue clinico-biologique dans un contexte de suspicion de TC. Ainsi les différents arbres permettent de s'orienter vers différentes catégories de pathologies conduisant à mieux cibler les tests de deuxième intention et les recherches génétiques. Dans le second versant, nous avons voulu donner une vision plus pratique à ces algorithmes en permettant de les utiliser en routine sur les patients. En effet ils peuvent s'appliquer devant toute thrombopénie en orientant le dialogue clinico-biologique afin de concourir au diagnostic différentiel selon le contexte.

Nous avons également, comme régulièrement décrit dans la littérature, tenté d'assurer la distinction entre les formes de TC et les PTI, mais à l'image de la majorité des cas celle-ci n'a pas été possible de manière significative. Seule une discrimination avec les formes extrêmes de TC (WAS et BSS) est réalisable. Mais l'intérêt en est réduit de par la fréquence très faible de ces entités parmi l'ensemble des TC.

Nous avons démontré que l'IPF apparaît comme un paramètre d'intérêt significatif au sein des TC et probablement au sein de l'ensemble des causes de thrombopénie. Cependant le comportement de cet indice au cours des différentes TC reste difficile à expliquer et ce même avec les connaissances physiopathologiques que nous possédons actuellement. Il est probable que des études ultérieures permettront de mieux appréhender ces entités et il est certain que de l'IPF jouera un rôle dans ces compréhensions mécanistiques.

Néanmoins, notre étude rétrospective n'a porté que sur un faible échantillon de patients et il serait intéressant de compléter les données afin de permettre de consolider les seuils

discriminants déterminés. L'application de ces algorithmes de manière prospective pourra également donner des informations essentielles quant à la pertinence de ces derniers. De plus, avec l'ensemble de ces éléments, tous les patients ne bénéficient pas de diagnostic définitif, bien que suspectés de souffrir d'une forme constitutionnelle de thrombopénie selon des critères cliniques. Les avancées technologiques et plus particulièrement dans le domaine du séquençage, pourront permettre de mettre en évidence de nouvelles mutations et ainsi de nouvelles pathologies permettant à terme d'étiqueter l'ensemble des patients.

Ces découvertes permettront également, dans de futurs travaux, de compléter nos connaissances et de mieux appréhender la physiologie de la mégacaryopoïèse ainsi que la physiopathologie de nombreuses pathologies. Ceci étant probablement une des raisons du récent intérêt porté à ces pathologies plaquettaires rares.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] P. Gresele, P. Harrison, L. Bury, E. Falcinelli, C. Gachet, C. P. Hayward, D. Kenny, D. Mezzano, A. D. Mumford, D. Nugent, A. T. Nurden, S. Orsini, and M. Cattaneo, "Diagnosis of suspected inherited platelet function disorders: results of a worldwide survey," *J. Thromb. Haemost.*, vol. 12, no. 9, pp. 1562–1569, Sep. 2014.
- [2] P. Noris, C. Klersy, M. Zecca, L. Arcaini, A. Pecci, F. Melazzini, V. Terulla, V. Bozzi, C. Ambaglio, F. Passamonti, F. Locatelli, and C. L. Balduini, "Platelet size distinguishes between inherited macrothrombocytopenias and immune thrombocytopenia," *J. Thromb. Haemost.*, vol. 7, no. 12, pp. 2131–2136, Dec. 2009.
- [3] B. Bader-Meunier, V. Proulle, C. Trichet, D. Debray, M. Gabolde, J. Yvart, and M. Dreyfus, "Misdiagnosis of chronic thrombocytopenia in childhood," *J. Pediatr. Hematol. Oncol.*, vol. 25, no. 7, pp. 548–552, Jul. 2003.
- [4] F. Gohda, H. Uchiumi, H. Handa, T. Matsushima, N. Tsukamoto, K. Morita, H. Amagai, M. Murakami, H. Murakami, Y. Nojima, and M. Karasawa, "Identification of inherited macrothrombocytopenias based on mean platelet volume among patients diagnosed with idiopathic thrombocytopenia," *Thromb. Res.*, vol. 119, no. 6, pp. 741–746, Jan. 2007.
- [5] L. C. L. Balduini, M. Cattaneo, F. Fabris, P. Gresele, A. Iolascon, F. L. Pulcinelli, and A. Savoia, "Inherited thrombocytopenias: a proposed diagnostic algorithm from the Italian Gruppo di Studio delle Piastrine," *J. Hematol.*, vol. 88, no. 5, pp. 582–592, May 2003.
- [6] P. Noris, G. Biino, A. Pecci, E. Civaschi, A. Savoia, M. Seri, F. Melazzini, G. Loffredo, G. Russo, V. Bozzi, L. D. Notarangelo, P. Gresele, P. G. Heller, N. Pujol-Moix, S. Kunishima, M. Cattaneo, J. Bussel, E. De Candia, C. Cagioni, U. Ramenghi, S. Barozzi, F. Fabris, and C. L. Balduini, "Platelet diameters in inherited thrombocytopenias: analysis of 376 patients with all known disorders," *Blood*, vol. 124, no. 6, pp. e4–e10, Aug. 2014.
- [7] A. Pecci, "Diagnosis and treatment of inherited thrombocytopenias: ITs: diagnosis and treatment," *Clin. Genet.*, p. n/a–n/a, May 2015.
- [8] C. L. Balduini and A. Savoia, "Genetics of familial forms of thrombocytopenia," *Hum. Genet.*, vol. 131, no. 12, pp. 1821–1832, Dec. 2012.
- [9] V. Latger-Cannard and T. Lecompte, "Thrombopénies constitutionnelles : intérêt des paramètres plaquettaires et de la morphologie," *Hématologie*, vol. LIV, no. 310, pp. 1–9, Jan. 2013.
- [10] H. Boutroux, H. Lapillonne, G. Leverger, M. D. Tablone, and R. Favier, "Les thrombopénies constitutionnelles," *Réal. Pédiatriques*, no. 183, pp. 31–35, Jan. 2014.
- [11] M. J. Massaad, N. Ramesh, and R. S. Geha, "Wiskott-Aldrich syndrome: a comprehensive review: Wiskott-Aldrich syndrome," *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 1285, no. 1, pp. 26–43, May 2013.
- [12] A. T. Nurden and P. Nurden, "Inherited thrombocytopenias," *Haematologica*, vol. 92, no. 9, pp. 1158–1164, Sep. 2007.
- [13] S. Sabri, "Deficiency in the Wiskott-Aldrich protein induces premature proplatelet formation and platelet production in the bone marrow compartment," *Blood*, vol. 108, no. 1, pp. 134–140, Jul. 2006.

- [14] K. Boztug, M. Schmidt, A. Schwarzer, P. P. Banerjee, I. A. Díez, R. A. Dewey, M. Böhm, A. Nowrouzi, C. R. Ball, H. Glimm, and others, "Stem-cell gene therapy for the Wiskott–Aldrich syndrome," *N. Engl. J. Med.*, vol. 363, no. 20, pp. 1918–1927, 2010.
- [15] M. H. Albert, T. C. Bittner, S. Nonoyama, L. D. Notarangelo, S. Burns, K. Imai, T. Espanol, A. Fasth, I. Pellier, G. Strauss, and others, "X-linked thrombocytopenia (XLT) due to WAS mutations: clinical characteristics, long-term outcome, and treatment options," *Blood*, vol. 115, no. 16, pp. 3231–3238, 2010.
- [16] C. A. Albers, R. Newbury-Ecob, W. H. Ouwehand, and C. Ghevaert, "New insights into the genetic basis of TAR (thrombocytopenia-absent radii) syndrome," *Curr. Opin. Genet. Dev.*, vol. 23, no. 3, pp. 316–323, Jun. 2013.
- [17] K. L. Greenhalgh, R. T. Howell, A. Bottani, P. J. Ancliff, H. G. Brunner, C. C. Verschuuren-Bemelmans, E. Vernon, K. W. Brown, and R. A. Newbury-Ecob, "Thrombocytopenia-absent radius syndrome: a clinical genetic study," *J. Med. Genet.*, vol. 39, no. 12, pp. 876–881, 2002.
- [18] C. Trichet, A. Beauchamp-Nicoud, V. Proulle, B. Bader-Meunier, G. Tchernia, and M. Dreyfus, "Les thrombopénies constitutionnelles : de la clinique à la biologie," *Hématologie*, vol. 9, no. 6, pp. 439–455, Nov. 2003.
- [19] E. Klopocki, H. Schulze, G. Strauss, C.-E. Ott, J. Hall, F. Trotier, D. Horn, and S. Mundlos, "Complex inheritance pattern resembling autosomal recessive inheritance involving a microdeletion in thrombocytopenia-absent radius syndrome," *Am. J. Hum. Genet.*, vol. 80, pp. 232–240, Feb. 2007.
- [20] C. A. Albers, D. S. Paul, H. Schulze, K. Freson, J. C. Stephens, P. A. Smethurst, J. D. Jolley, A. Cvejic, M. Kostadima, P. Bertone, M. H. Breuning, N. Debili, P. Deloukas, R. Favier, J. Fiedler, C. M. Hobbs, N. Huang, M. E. Hurles, G. Kiddle, I. Krapels, P. Nurden, C. A. L. Ruivenkamp, J. G. Sambrook, K. Smith, D. L. Stemple, G. Strauss, C. Thys, C. van Geet, R. Newbury-Ecob, W. H. Ouwehand, and C. Ghevaert, "Compound inheritance of a low-frequency regulatory SNP and a rare null mutation in exon-junction complex subunit RBM8A causes TAR syndrome," *Nat. Genet.*, vol. 44, no. 4, pp. 435–439, Feb. 2012.
- [21] E. Tassano, S. Gimelli, M. T. Divizia, M. Lerone, C. Vaccari, A. Puliti, and G. Gimelli, "Thrombocytopenia-absent radius (TAR) syndrome due to compound inheritance for a 1q21.1 microdeletion and a low-frequency noncoding RBM8A SNP: a new familial case," *Mol. Cytogenet.*, vol. 8, no. 1, Dec. 2015.
- [22] S. King, M. Germeshausen, G. Strauss, K. Welte, and M. Ballmaier, "Congenital amegakaryocytic thrombocytopenia: a retrospective clinical analysis of 20 patients," *Br. J. Haematol.*, vol. 131, no. 5, pp. 636–644, Dec. 2005.
- [23] M. Ballmaier, M. Germeshausen, S. Krukemeier, and K. Welte, "Thrombopoietin is essential for the maintenance of normal hematopoiesis in humans - development of aplastic anemia in patients with congenital amegakaryocytic thrombocytopenia," *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, no. 996, pp. 17–25, 2003.
- [24] H. Ehrenreich, M. Hasselblatt, F. Knerlich, N. von Ahsen, S. Jacob, S. Sperling, H. Woldt, K. Vehmeyer, K.-A. Nave, and A.-L. Sirén, "A hematopoietic growth factor, thrombopoietin, has a proapoptotic role in the brain," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 102, no. 3, pp. 862–867, 2005.
- [25] M. Ballmaier, M. Germeshausen, H. Schulze, K. Cherkaoui, S. Lang, A. Gaudig, S. Krukemeier, M. Eilers, G. Strauss, and K. Welte, "Cmpl mutations are the cause of congenital amegakaryocytic thrombocytopenia," *Blood*, vol. 97, no. 1, pp. 139–146, 2001.

- [26] A. Savoia, C. Dufour, F. Locatelli, P. Noris, C. Ambaglio, V. Rosti, M. Zecca, S. Ferrari, F. di Bari, A. Corcione, M. Di Stazio, M. Seri, and C. L. Balduini, "Congenital amegakaryocytic thrombocytopenia: clinical and biological consequences of five novel mutations," *Haematologica*, vol. 92, no. 9, pp. 1186–1193, Sep. 2007.
- [27] I. M. Morison, E. M. Cramer Bordé, E. J. Cheesman, P. L. Cheong, A. J. Holyoake, S. Fichelson, R. J. Weeks, A. Lo, S. M. K. Davies, S. M. Wilbanks, R. D. Fagerlund, M. W. Ludgate, F. M. da Silva Tatley, M. S. A. Coker, N. A. Bockett, G. Hughes, D. A. Pippig, M. P. Smith, C. Capron, and E. C. Ledgerwood, "A mutation of human cytochrome c enhances the intrinsic apoptotic pathway but causes only thrombocytopenia," *Nat. Genet.*, vol. 40, no. 4, pp. 387–389, Apr. 2008.
- [28] D. De Rocco, C. Cerqua, P. Goffrini, G. Russo, A. Pastore, F. Meloni, E. Nicchia, C. T. Moraes, A. Pecci, L. Salviati, and A. Savoia, "Mutations of cytochrome c identified in patients with thrombocytopenia *THC4* affect both apoptosis and cellular bioenergetics," *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.*, vol. 1842, no. 2, pp. 269–274, Feb. 2014.
- [29] "Laboratoire d'Hématologie Cellulaire du CHU d'Angers." [Online]. Available: <http://hematocell.univ-angers.fr/index.php/enseignement-de-lhematologie-cellulaire/plaquettes-sanguines-et-leur-pathologie/24-physiologie-de-la-megacaryopoiese>. [Accessed: 23-Jul-2015].
- [30] X. Jiang and X. Wang, "Cytochrome C-mediated apoptosis," *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 73, pp. 87–106, 2004.
- [31] E. Cramer Bordé, Y. Ouzegdouh, E. C. Ledgerwood, and I. M. Morison, "Congenital thrombocytopenia and cytochrome C mutation: a matter of birth and death," *Semin. Thromb. Hemost.*, vol. 37, no. 6, pp. 664–672, Sep. 2011.
- [32] E. Liew and C. Owen, "Familial myelodysplastic syndromes: a review of the literature," *Haematologica*, vol. 96, no. 10, pp. 1536–1542, Oct. 2011.
- [33] D. Bluteau, A. C. Glembotsky, A. Raimbault, N. Balayn, L. Gilles, P. Rameau, P. Nurden, M. C. Alessi, N. Debili, W. Vainchenker, P. G. Heller, R. Favier, and H. Raslova, "Dysmegakaryopoiesis of FPD/AML pedigrees with constitutional *RUNX1* mutations is linked to myosin II deregulated expression," *Blood*, vol. 120, no. 13, pp. 2708–2718, Sep. 2012.
- [34] A. Savoia, "Molecular basis of inherited thrombocytopenias: Molecular basis of inherited thrombocytopenias," *Clin. Genet.*, p. n/a–n/a, May 2015.
- [35] D. Bluteau, L. Gilles, M. Hilpert, I. Antony-Debre, C. James, N. Debili, V. Camara-Clayette, O. Wagner-Ballon, V. Cordette-Lagarde, T. Robert, H. Ripoche, P. Gonin, S. Swierczek, J. Prchal, W. Vainchenker, R. Favier, and H. Raslova, "Down-regulation of the *RUNX1*-target gene *NR4A3* contributes to hematopoiesis deregulation in familial platelet disorder/acute myelogenous leukemia," *Blood*, vol. 118, no. 24, pp. 6310–6320, Dec. 2011.
- [36] S. Girard, C. Pondarre, J.-M. André, M.-P. Pages, and Y. Bertrand, "Diagnostic néonatal d'un syndrome de Jacobsen avec thrombopénie «Paris-Trousseau»,» *Hématologie*, vol. 15, no. 3, pp. 240–242, 2009.
- [37] W. S. Stevenson, D. J. Rabbolini, L. Beutler, Q. Chen, S. Gabrielli, J. P. Mackay, T. A. Brighton, C. M. Ward, and M.-C. Morel-Kopp, "Paris-Trousseau thrombocytopenia is phenocopied by the autosomal recessive inheritance of a DNA-binding domain mutation in *FLI1*," *Blood*, Aug. 2015.
- [38] R. Favier, K. Jondeau, P. Boutard, P. Grossfeld, P. Reinert, C. Jones, F. Bertoni, and E. M. Cramer, "Paris-Trousseau syndrome: clinical, hematological, molecular data of ten new cases," *Thromb. Haemost.*, Sep. 2003.

- [39] J. G. White, "Platelet storage pool deficiency in Jacobsen syndrome," *Platelets*, vol. 18, no. 7, pp. 522–527, Jan. 2007.
- [40] L. Krishnamurti, J. P. Neglia, R. Nagarajan, S. A. Berry, J. Lohr, B. Hirsch, and J. G. White, "Paris-Trousseau syndrome platelets in a child with Jacobsen's syndrome," *Am. J. Hematol.*, vol. 66, no. 4, pp. 295–299, 2001.
- [41] M. Åström, V. Hahn-Strömberg, E. Zetterberg, I. Vedin, M. Merup, and J. Palmblad, "X-linked thrombocytopenia with thalassemia displays bone marrow reticulin fibrosis and enhanced angiogenesis: Comparisons with primary myelofibrosis: XLTT and Myelofibrosis," *Am. J. Hematol.*, vol. 90, no. 3, pp. E44–E48, Mar. 2015.
- [42] W. A. Ciovacco, W. H. Raskind, and M. A. Kacena, "Human phenotypes associated with GATA-1 mutations," *Gene*, vol. 427, no. 1–2, pp. 1–6, Dec. 2008.
- [43] C. L. Balduini, E. De Candia, and A. Savoia, "Why the disorder induced by GATA-1 Arg216Gln mutation should be called 'X-linked thrombocytopenia with thalassemia' rather than 'X-linked gray platelet syndrome,'" *Blood*, vol. 110, no. 7, pp. 1411–1419, Oct. 2007.
- [44] C. L. Balduini, A. Pecci, G. Loffredo, P. Izzo, P. Noris, M. Grosso, U. Magrini, I. F. Ceresa, V. Conti, V. Poggi, and A. Savoia, "Effects of the R216Q mutation of GATA-1 on erythropoiesis and megakaryocytopoiesis," *Thromb. Haemost.*, Nov. 2003.
- [45] K. E. Nichols, J. D. Crispino, M. Poncz, J. G. White, S. H. Orkin, J. M. Maris, and M. J. Weiss, "Familial dyserythropoietic anaemia and thrombocytopenia due to an inherited mutation in GATA1," *Nat. Genet.*, vol. 24, no. 3, pp. 266–270, 2000.
- [46] C. L. Balduini, A. Savoia, and M. Seri, "Inherited thrombocytopenias frequently diagnosed in adults," *J. Thromb. Haemost.*, vol. 11, no. 6, pp. 1006–1019, Jun. 2013.
- [47] D. Bluteau, A. Balduini, N. Balayn, M. Currao, P. Nurden, C. Deswarte, G. Leverger, P. Noris, S. Perrotta, E. Solary, W. Vainchenker, N. Debili, R. Favier, and H. Raslova, "Thrombocytopenia-associated mutations in the ANKRD26 regulatory region induce MAPK hyperactivation," *J. Clin. Invest.*, vol. 124, no. 2, pp. 580–591, Feb. 2014.
- [48] T. Pippucci, A. Savoia, S. Perrotta, N. Pujol-Moix, P. Noris, G. Castegnaro, A. Pecci, C. Gnan, F. Punzo, C. Marconi, S. Gherardi, G. Loffredo, D. De Rocco, S. Scianguetta, S. Barozzi, P. Magini, V. Bozzi, L. Dezzani, M. Di Stazio, M. Ferraro, G. Perini, M. Seri, and C. L. Balduini, "Mutations in the 5' UTR of ANKRD26, the Ankinin Repeat Domain 26 Gene, Cause an Autosomal-Dominant Form of Inherited Thrombocytopenia, THC2," *Am. J. Hum. Genet.*, vol. 88, no. 1, pp. 115–120, Jan. 2011.
- [49] A. A. Thompson and L. T. Nguyen, "Amegakaryocytic thrombocytopenia and radio-ulnar synostosis are associated with HOXA11 mutation," *Nat. Genet.*, vol. 26, no. 4, pp. 397–398, 2000.
- [50] R. D. Horvat-Switzer and A. A. Thompson, "HOXA11 mutation in amegakaryocytic thrombocytopenia with radio-ulnar synostosis syndrome inhibits megakaryocytic differentiation in vitro," *Blood Cells. Mol. Dis.*, vol. 37, no. 1, pp. 55–63, Jul. 2006.
- [51] T. Niihori, M. Ouchi-Uchiyama, Y. Sasahara, T. Kaneko, Y. Hashii, M. Irie, A. Sato, Y. Saito-Nanjo, R. Funayama, T. Nagashima, S. Inoue, K. Nakayama, K. Ozono, S. Kure, Y. Matsubara, M. Imaizumi, and Y. Aoki, "Mutations in MECOM, Encoding Oncoprotein EVI1, Cause Radioulnar Synostosis with Amegakaryocytic Thrombocytopenia," *Am. J. Hum. Genet.*, Nov. 2015.

- [52] A. Hamilton, M. Ozelo, J. Leggo, C. Notley, H. Brown, J. P. Frontroth, A. Angelillo-Scherrer, F. Baghaei, S. M. Enayat, E. Favaloro, D. Lillicrap, and M. Othman, "Frequency of Platelet type versus Type 2B von Willebrand Disease: An international registry-based study," *Thromb. Haemost.*, vol. 105, no. 3, pp. 501–508, Feb. 2011.
- [53] S. Guerhazi, J. Conard, M. M. Samama, and K. Dellagi, "Maladie de Willebrand de type 2B et pseudomaladie de Willebrand de type 2B ; à propos de trois observations," *Pathol. Biol.*, no. 54, pp. 159–165, 2006.
- [54] M. Y. Zhang, J. E. Churpek, S. B. Keel, T. Walsh, M. K. Lee, K. R. Loeb, S. Gulsuner, C. C. Pritchard, M. Sanchez-Bonilla, J. J. Delrow, R. S. Basom, M. Forouhar, B. Gyurkocza, B. S. Schwartz, B. Neistadt, R. Marquez, C. J. Mariani, S. A. Coats, I. Hofmann, R. C. Lindsley, D. A. Williams, J. L. Abkowitz, M. S. Horwitz, M.-C. King, L. A. Godley, and A. Shimamura, "Germline ETV6 mutations in familial thrombocytopenia and hematologic malignancy," *Nat. Genet.*, vol. 47, no. 2, pp. 180–185, Jan. 2015.
- [55] L. Noetzli, R. W. Lo, A. B. Lee-Sherick, M. Callaghan, P. Noris, A. Savoia, M. Rajpurkar, K. Jones, K. Gowan, C. L. Balduini, A. Pecci, C. Gnan, D. De Rocco, M. Doubek, L. Li, L. Lu, R. Leung, C. Landolt-Marticorena, S. Hunger, P. Heller, A. Gutierrez-Hartmann, L. Xiayuan, F. G. Pluthero, J. W. Rowley, A. S. Weyrich, W. H. A. Kahr, C. C. Porter, and J. Di Paola, "Germline mutations in ETV6 are associated with thrombocytopenia, red cell macrocytosis and predisposition to lymphoblastic leukemia," *Nat. Genet.*, vol. 47, no. 5, pp. 535–538, Mar. 2015.
- [56] S. Topka, J. Vijai, M. F. Walsh, L. Jacobs, A. Maria, D. Villano, P. Gaddam, G. Wu, R. B. McGee, E. Quinn, H. Inaba, C. Hartford, C. Pui, A. Pappo, M. Edmonson, M. Y. Zhang, P. Stepensky, P. Steinherz, K. Schrader, A. Lincoln, J. Bussel, S. M. Lipkin, Y. Goldgur, M. Harit, Z. K. Stadler, C. Mullighan, M. Weintraub, A. Shimamura, J. Zhang, J. R. Downing, K. E. Nichols, and K. Offit, "Germline ETV6 Mutations Confer Susceptibility to Acute Lymphoblastic Leukemia and Thrombocytopenia," *PLOS Genet.*, vol. 11, no. 6, p. e1005262, Jun. 2015.
- [57] S. Kunishima, R. Kobayashi, T. J. Itoh, M. Hamaguchi, and H. Saito, "Mutation of the β 1-tubulin gene associated with congenital macrothrombocytopenia affecting microtubule assembly," *Blood*, vol. 113, no. 2, pp. 458–461, 2009.
- [58] S. Kunishima, S. Nishimura, H. Suzuki, M. Imaizumi, and H. Saito, "TUBB1 mutation disrupting microtubule assembly impairs proplatelet formation and results in congenital macrothrombocytopenia," *Eur. J. Haematol.*, vol. 92, no. 4, pp. 276–282, Apr. 2014.
- [59] J. A. Guerrero, C. Bennett, L. Van der Weyden, H. McKinney, M. Chin, P. Nurden, Z. McIntyre, E. L. Cambridge, J. Estabel, H. Wardle-Jones, A. O. Speak, W. N. Erber, A. Rendon, W. H. Ouwehand, and C. Ghevaert, "Gray platelet syndrome : proinflammatory megakaryocytes and alpha-granule loss cause myelofibrosis and confer metastasis resistance in mice," *Blood*, vol. 124, no. 24, pp. 3624–3634, Dec. 2014.
- [60] F. Aminkeng, "GFI1B mutation causes autosomal dominant gray platelet syndrome," *Clin. Genet.*, vol. 85, no. 6, pp. 534–535, 2014.
- [61] C. Deppermann, D. Cherpokova, P. Nurden, J.-N. Schulz, I. Thielmann, P. Kraft, T. Vögtle, C. Kleinschnitz, S. Dütting, G. Krohne, S. A. Eming, A. T. Nurden, B. Eckes, G. Stoll, D. Stegner, and B. Nieswandt, "Gray platelet syndrome and defective thrombo-inflammation in Nbeal2-deficient mice," *J. Clin. Invest.*, vol. 123, no. 8, pp. 3331–3342, Aug. 2013.
- [62] A. T. Nurden and P. Nurden, "Inherited disorders of platelet function: selected updates," *J. Thromb. Haemost.*, vol. 13, pp. S2–S9, Jun. 2015.

- [63] P. Nurden, N. Debili, I. Coupry, M. Bryckaert, I. Youlyouz-Marfak, G. Solé, A.-C. Pons, E. Berrou, F. Adam, A. Kauskot, and others, “Thrombocytopenia resulting from mutations in filamin A can be expressed as an isolated syndrome,” *Blood*, vol. 118, no. 22, pp. 5928–5937, 2011.
- [64] R. Favier and H. Raslova, “Progress in understanding the diagnosis and molecular genetics of macrothrombocytopenias,” *Br. J. Haematol.*, vol. 170, no. 5, pp. 626–639, Sep. 2015.
- [65] E. Berrou, F. Adam, M. Lebret, P. Fergelot, A. Kauskot, I. Coupry, M. Jandrot-Perrus, A. Nurden, R. Favier, J.-P. Rosa, and others, “Heterogeneity of platelet functional alterations in patients with filamin A mutations,” *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 33, no. 1, pp. e11–e18, 2013.
- [66] K. Freson, A. Wijgaerts, and C. van Geet, “Update on the causes of platelet disorders and functional consequences,” *Int. J. Lab. Hematol.*, vol. 36, no. 3, pp. 313–325, Jun. 2014.
- [67] W. S. Stevenson, M.-C. Morel-Kopp, Q. Chen, H. P. Liang, C. J. Bromhead, S. Wright, R. Turakulov, A. P. Ng, A. W. Roberts, M. Bahlo, and C. M. Ward, “GFI1B mutation causes a bleeding disorder with abnormal platelet function,” *J. Thromb. Haemost.*, vol. 11, no. 11, pp. 2039–2047, Nov. 2013.
- [68] L. Vassen, T. Okayama, and T. Moroy, “Gfi1b:green fluorescent protein knock-in mice reveal a dynamic expression pattern of Gfi1b during hematopoiesis that is largely complementary to Gfi1,” *Blood*, vol. 109, no. 6, pp. 2356–2364, Mar. 2007.
- [69] N. Songdej and A. K. Rao, “Hematopoietic transcription factor mutations and inherited platelet dysfunction,” *F1000prime Rep.*, vol. 7, 2015.
- [70] P. Noris, S. Perrotta, R. Bottega, A. Pecci, F. Melazzini, E. Civaschi, S. Russo, S. Magrin, G. Loffredo, V. Di Salvo, G. Russo, M. Casale, D. De Rocco, C. Grignani, M. Cattaneo, C. Baronci, A. Dragani, V. Albano, M. Jankovic, S. Scianguetta, A. Savoia, and C. L. Balduini, “Clinical and laboratory features of 103 patients from 42 Italian families with inherited thrombocytopenia derived from the monoallelic Ala156Val mutation of GPIb (Bolzano mutation),” *Haematologica*, vol. 97, no. 1, pp. 82–88, Jan. 2012.
- [71] A. Savoia, C. L. Balduini, M. Savino, P. Noris, M. Del Vecchio, S. Perrotta, S. Belletti, V. Poggi, and A. Iolascon, “Autosomal dominant macrothrombocytopenia in Italy is most frequently a type of heterozygous Bernard-Soulier syndrome,” *Blood*, vol. 97, no. 5, pp. 1330–1335, 2001.
- [72] A. Balduini, A. Malara, A. Pecci, S. Badalucco, V. Bozzi, I. Pallotta, P. Noris, M. Torti, and C. L. Balduini, “Proplatelet formation in heterozygous Bernard-Soulier syndrome type Bolzano,” *J. Thromb. Haemost.*, vol. 7, no. 3, pp. 478–484, Mar. 2009.
- [73] T. Sato, S. Kunishima, R. Shirayama, S. Ichikawa, M. Sakai, and K. Kusuhara, “Bernard-Soulier Syndrome due to Compound Heterozygosity for a Novel Glycoprotein Ib β Mutation,” *Acta Haematol.*, no. 131, pp. 46–49, 2014.
- [74] R. Bottega, C. Marconi, M. Faleschini, G. Baj, C. Cagioni, A. Pecci, T. Pippucci, U. Ramenghi, S. Pardini, L. Ngu, and others, “ACTN1-related thrombocytopenia: identification of novel families for phenotypic characterization,” *Blood*, vol. 125, no. 5, pp. 869–872, 2015.
- [75] A. Koneti Rao and N. Songdej, “Inherited thrombocytopenias : the beat goes on,” *Blood*, vol. 125, no. 5, pp. 748–750, 2015.
- [76] S. Kunishima, Y. Okuno, K. Yoshida, Y. Shiraishi, M. Sanada, H. Muramatsu, K. Chiba, H. Tanaka, K. Miyazaki, M. Sakai, M. Ohtake, R. Kobayashi, A. Iguchi, G. Niimi, M. Otsu, Y. Takahashi, S. Miyano, H. Saito, S. Kojima, and S. Ogawa, “ACTN1 Mutations Cause Congenital Macrothrombocytopenia,” *Am. J. Hum. Genet.*, vol. 92, no. 3, pp. 431–438, Mar. 2013.

- [77] P. Guéguen, K. Rouault, J.-M. Chen, O. Raguénès, Y. Fichou, E. Hardy, E. Gobin, B. Panpetesch, M. Kerbiriou, P. Trouvé, P. Marcorelles, J. Abgrall, C. Le Maréchal, and C. Férec, “A Missense Mutation in the Alpha-Actinin 1 Gene (ACTN1) Is the Cause of Autosomal Dominant Macrothrombocytopenia in a Large French Family,” *PLoS ONE*, vol. 8, no. 9, p. e74728, Sep. 2013.
- [78] L. Bury, A. Malara, G. Paolo, and A. Balduini, “Outside-in signalling generated by a constitutively activated integrin α IIb β 3 impairs proplatelet formation in human megakaryocytes,” *PLoS ONE*, vol. 7, no. 4, pp. 1–7, Apr. 2012.
- [79] C. Ghevaert, A. Salsmann, N. A. Watkins, E. Schaffner-Reckinger, A. Rankin, S. F. Garner, J. Stephens, G. A. Smith, N. Debili, W. Vainchenker, P. G. de Groot, J. A. Huntington, M. Laffan, N. Kieffer, and W. H. Ouwehand, “A nonsynonymous SNP in the ITGB3 gene disrupts the conserved membrane-proximal cytoplasmic salt bridge in the Iib 3 integrin and cosegregates dominantly with abnormal proplatelet formation and macrothrombocytopenia,” *Blood*, vol. 111, no. 7, pp. 3407–3414, Apr. 2008.
- [80] H. Kashiwagi, S. Kunishima, K. Kiyomizu, Y. Amano, H. Shimada, M. Morishita, Y. Kanakura, and Y. Tomiyama, “Demonstration of novel gain-of-function mutations of α IIb β 3: association with macrothrombocytopenia and glanzmann thrombasthenia-like phenotype,” *Mol. Genet. Genomic Med.*, vol. 1, no. 2, pp. 77–86, Jul. 2013.
- [81] A. Jayo, I. Conde, P. Lastres, C. Martinez, J. Rivera, V. Vicente, and C. Gonzalez-Manchon, “L718P mutation in the membrane-proximal cytoplasmic tail of 3 promotes abnormal Iib 3 clustering and lipid microdomain coalescence, and associates with a thrombasthenia-like phenotype,” *Haematologica*, vol. 95, no. 7, pp. 1158–1166, Jul. 2010.
- [82] S. Kunishima, H. Kashiwagi, M. Otsu, N. Takayama, K. Eto, M. Onodera, Y. Miyajima, Y. Takamatsu, J. Suzumiya, Y. Matsubara, and H. Saito, “Heterozygous ITGA2B R995W mutation inducing constitutive activation of the α IIb β 3 receptor affects proplatelet formation and causes congenital macrothrombocytopenia,” *Blood*, vol. 117, no. 20, pp. 5479–5484, May 2011.
- [83] M. K. Larson, “Regulation of proplatelet formation and platelet release by integrin Iibeta3,” *Blood*, vol. 108, no. 5, pp. 1509–1514, May 2006.
- [84] C. L. Balduini, A. Pecci, and A. Savoia, “Recent advances in the understanding and management of MYH9-related inherited thrombocytopenias: Review,” *Br. J. Haematol.*, vol. 154, no. 2, pp. 161–174, Jul. 2011.
- [85] J. C. Cawley and F. G. J. Hayhoe, “The Inclusions of the May-Hegglin Anomaly and Dohle Bodies of Infection: an Ultrastructural Comparison,” *Br. J. Haematol.*, vol. 22, no. 4, pp. 491–496, 1972.
- [86] C. Strassel, A. Eckly, C. Leon, C. Petitjean, M. Freund, J.-P. Cazenave, C. Gachet, and F. Lanza, “Intrinsic impaired proplatelet formation and microtubule coil assembly of megakaryocytes in a mouse model of Bernard-Soulier syndrome,” *Haematologica*, vol. 94, no. 6, pp. 800–810, Jun. 2009.
- [87] P. Nurden and A. T. Nurden, “Congenital disorders associated with platelet dysfunctions,” *Thromb. Haemost.*, Jan. 2008.
- [88] V. T. Manchev, M. Hilpert, E. Berrou, Z. Elaib, A. Aouba, S. Boukour, S. Souquere, G. Pierron, P. Rameau, R. Andrews, F. Lanza, R. Bobe, W. Vainchenker, J.-P. Rosa, M. Bryckaert, N. Debili, R. Favier, and H. Raslova, “A new form of macrothrombocytopenia induced by a germ-line mutation in the PRKACG gene,” *Blood*, vol. 124, no. 16, pp. 2554–2563, Oct. 2014.

- [89] C. Landolt-Marticorena and W. Kahr, "Inherited macrothrombocytopenias on the rise," *Blood*, vol. 124, no. 16, pp. 2473–2475, 2014.
- [90] M. P. Lambert, "Update on the inherited platelet disorders," *Curr. Opin. Hematol.*, vol. 22, no. 5, pp. 460–466, Sep. 2015.
- [91] HAS, "Purpura thrombopénique immunologique - Protocole national de diagnostic et de soins.," *Guide - Affect. Longue Durée*, p. 44, Oct. 2009.
- [92] F. Rodeghiero and M. Ruggeri, "ITP and international guidelines: What do we know, what do we need?," *Presse Médicale*, vol. 43, no. 4, pp. e61–e67, Apr. 2014.
- [93] E. Lo and S. Deane, "Diagnosis and classification of immune-mediated thrombocytopenia," *Autoimmun. Rev.*, vol. 13, no. 4–5, pp. 577–583, Apr. 2014.
- [94] C. Neunert, W. Lim, M. Crowther, A. Cohen, L. Solberg, and M. A. Crowther, "The American Society of Hematology 2011 evidence-based practice guideline for immune thrombocytopenia," *Blood*, vol. 117, no. 16, pp. 4190–4207, 2011.
- [95] J. G. Drachman, "Inherited thrombocytopenia: when a low platelet count does not mean ITP," *Blood*, vol. 103, no. 2, pp. 390–398, Jan. 2004.
- [96] D. Provan, R. Stasi, A. C. Newland, V. S. Blanchette, P. Bolton-Maggs, J. B. Bussel, B. H. Chong, D. B. Cines, T. B. Gernsheimer, B. Godeau, and others, "International consensus report on the investigation and management of primary immune thrombocytopenia," *Blood*, vol. 115, no. 2, pp. 168–186, 2010.
- [97] P. Noris, N. Schlegel, C. Klersy, P. G. Heller, E. Civaschi, N. Pujol-Moix, F. Fabris, R. Favier, P. Gresele, V. Latger-Cannard, A. Cuker, P. Nurden, A. Greinacher, M. Cattaneo, E. De Candia, A. Pecci, M.-F. Hurtaud-Roux, A. C. Glembotsky, E. Muniz-Diaz, M. L. Randi, N. Trillot, L. Bury, T. Lecompte, C. Marconi, A. Savoia, C. L. Balduini, S. Bayart, A. Bauters, S. Benabdallah-Guedira, F. Boehlen, J.-Y. Borg, R. Bottega, J. Bussel, D. De Rocco, E. de Maistre, M. Faleschini, E. Falcinelli, S. Ferrari, A. Ferster, T. Fierro, D. Fleury, P. Fontana, C. James, F. Lanza, V. Le Cam Duche, G. Loffredo, P. Magini, D. Martin-Coignard, F. Menard, S. Mercier, A. Mezzasoma, P. Minuz, I. Nichele, L. D. Notarangelo, T. Pippucci, G. M. Podda, C. Pouymayou, A. Rigouzzo, B. Royer, P. Sie, V. Siguret, C. Trichet, A. Tucci, B. Saposnik, D. Veneri, and on behalf of the European Hematology Association - Scientific Working Group on Thrombocytopenias and Platelet Function Disorders, "Analysis of 339 pregnancies in 181 women with 13 different forms of inherited thrombocytopenia," *Haematologica*, vol. 99, no. 8, pp. 1387–1394, Aug. 2014.
- [98] P. Gresele and the Subcommittee on Platelet Physiology, "Diagnosis of inherited platelet function disorders: guidance from the SSC of the ISTH," *J. Thromb. Haemost.*, vol. 13, no. 2, pp. 314–322, Feb. 2015.
- [99] F. Rodeghiero, A. Tosetto, T. Abshire, D. M. Arnold, B. Coller, P. James, C. Neunert, D. Lillicrap, and ON BEHALF OF THE ISTH/SSC JOINT VWF AND PERINATAL/PEDIATRIC HEMOSTASIS SUBCOMMITTEES WORKING GROUP, "ISTH/SSC bleeding assessment tool: a standardized questionnaire and a proposal for a new bleeding score for inherited bleeding disorders: ISTH/SSC bleeding assessment tool," *J. Thromb. Haemost.*, vol. 8, no. 9, pp. 2063–2065, Sep. 2010.
- [100] G. C. Lowe, M. Lordkipanidzé, S. P. Watson, and on behalf of the UK GAPP study group, "Utility of the ISTH bleeding assessment tool in predicting platelet defects in participants with suspected inherited platelet function disorders," *J. Thromb. Haemost.*, vol. 11, no. 9, pp. 1663–1668, Sep. 2013.

- [101] A. C. Glembotsky, R. F. Marta, A. Pecci, D. De Rocco, C. Gnan, Y. R. Espasandin, N. P. Goette, F. Negro, P. Noris, A. Savoia, C. L. Balduini, F. C. Molinas, and P. G. Heller, "International collaboration as a tool for diagnosis of patients with inherited thrombocytopenia in the setting of a developing country: International collaboration for diagnosis of inherited thrombocytopenia," *J. Thromb. Haemost.*, vol. 10, no. 8, pp. 1653–1661, Aug. 2012.
- [102] T. P. Lecompte and M. P. Bernimoulin, "Novel Parameters in Blood Cell Counters," *Clin. Lab. Med.*, vol. 35, no. 1, pp. 209–224, Mar. 2015.
- [103] C. Briggs, P. Harrison, and S. J. Machin, "Continuing developments with the automated platelet count," *Int. J. Lab. Hematol.*, vol. 29, no. 2, pp. 77–91, Apr. 2007.
- [104] SYSMEX, "XN Présentation et Principes."
- [105] C. Briggs, I. Longair, P. Kumar, D. Singh, and S. J. Machin, "Performance evaluation of the Sysmex haematology XN modular system," *J. Clin. Pathol.*, vol. 65, no. 11, pp. 1024–1030, Nov. 2012.
- [106] H. C. Segal, C. Briggs, S. Kunka, A. Casbard, P. Harrison, S. J. Machin, and M. F. Murphy, "Accuracy of platelet counting haematology analysers in severe thrombocytopenia and potential impact on platelet transfusion," *Br. J. Haematol.*, vol. 128, no. 4, pp. 520–525, Feb. 2005.
- [107] SYSMEX, "Alarmes XN," Sep-2013.
- [108] C. Briggs, S. Kunka, and S. J. Machin, "The most accurate platelet count on the sysmex XE2100, optical or impedance," *Clin. Lab. Haematol.*, no. 26, pp. 157–158, 2004.
- [109] Y. Tanaka, Y. Tanaka, K. Gondo, Y. Maruki, T. Kondo, S. Asai, H. Matsushita, and H. Miyachi, "Performance Evaluation of Platelet Counting by Novel Fluorescent Dye Staining in the XN-Series Automated Hematology Analyzers: Platelet Counting by Fluorescent Dye Staining," *J. Clin. Lab. Anal.*, p. n/a–n/a, Mar. 2014.
- [110] SYSMEX, "The Future of Hematology - XN - Series Technology," Feb-2013.
- [111] A. Wada, Y. Takagi, M. Kono, and T. Morikawa, "Accuracy of a New Platelet Count System (PLT-F) Depends on the Staining Property of Its Reagents," *PLOS ONE*, vol. 10, no. 10, p. e0141311, Oct. 2015.
- [112] M. Schoorl, M. Schoorl, J. Oomes, and J. van Pelt, "New Fluorescent Method (PLT-F) on Sysmex XN2000 Hematology Analyzer Achieved Higher Accuracy in Low Platelet Counting," *Am. J. Clin. Pathol.*, vol. 140, no. 4, pp. 495–499, Oct. 2013.
- [113] A. Tessier-Marteau, F. Geneviève, A. Godon, L. Macchi, and M. Zandecki, "Anomalies et erreurs de détermination de l'hémogramme avec les automates d'hématologie cellulaire. Partie 1 : les plaquettes sanguines," *Ann. Biol. Clin. (Paris)*, vol. 68, no. 4, pp. 393–407, juillet-août 2010.
- [114] V. Latger-Cannard, S. Salignac, A. Salmon, L. Mansuy, E. De Maistre, C. Botte, P. Bordigoni, N. Schlegel, and T. Lecompte, "Validation et classification clinicobiologique d'une thrombopénie," *Ann. Biol. Clin. (Paris)*, vol. 63, no. 6, pp. 599–610, Nov. 2005.
- [115] J. Y. Seo, S.-T. Lee, and S.-H. Kim, "Performance evaluation of the new hematology analyzer Sysmex XN-series," *Int. J. Lab. Hematol.*, p. n/a–n/a, May 2014.

- [116] V. Latger-Cannard, M. Hoarau, S. Salignac, D. Baumgart, P. Nurden, and T. Lecompte, "Mean platelet volume: comparison of three analysers towards standardization of platelet morphological phenotype: STANDARDIZATION OF PLATELET SIZE," *Int. J. Lab. Hematol.*, vol. 34, no. 3, pp. 300–310, Jun. 2012.
- [117] A. Leader, D. Pereg, and M. Lishner, "Are platelet volume indices of clinical use? A multidisciplinary review," *Ann. Med.*, vol. 44, no. 8, pp. 805–816, Dec. 2012.
- [118] N. Pujol-Moix, M. Vázquez-Santiago, A. Morera, A. Ziyatdinov, A. Remacha, J. F. Nomdedeu, J. Fontcuberta, J. M. Soria, and J. C. Souto, "Genetic determinants of Platelet Large-Cell Ratio, Immature Platelet Fraction, and other platelet-related phenotypes," *Thromb. Res.*, vol. 136, no. 2, pp. 361–366, Aug. 2015.
- [119] G. Strauß, C. Vollert, A. von Stackelberg, A. Weimann, G. Gaedicke, and H. Schulze, "Immature platelet count: A simple parameter for distinguishing thrombocytopenia in pediatric acute lymphocytic leukemia from immune thrombocytopenia," *Pediatr. Blood Cancer*, vol. 57, no. 4, pp. 641–647, Oct. 2011.
- [120] J. J. M. L. Hoffmann, "Reticulated platelets: analytical aspects and clinical utility," *Clin. Chem. Lab. Med. CCLM*, vol. 52, no. 8, Jan. 2014.
- [121] J. M. Pekelharing, O. Hauss, R. De Jonge, J. Lokhoff, J. Sodikromo, M. Spaans, R. Brouwer, S. De Lathouder, and R. Hinzmann, "Haematology reference intervals for established and novel parameters in healthy adults," *Sysmex J. Int.*, vol. 20, no. 1, 2010.
- [122] M. G. Farias, E. G. Schunck, S. Dal Bó, and S. M. de Castro, "Definition of reference ranges for the platelet distribution width (PDW): a local need," *Clin. Chem. Lab. Med.*, vol. 48, no. 2, Jan. 2010.
- [123] C. Briggs, "Quality counts: new parameters in blood cell counting," *Int. J. Lab. Hematol.*, vol. 31, no. 3, pp. 277–297, Jun. 2009.
- [124] Y. J. Ko, M. Hur, H. Kim, S. G. Choi, H.-W. Moon, and Y.-M. Yun, "Reference interval for immature platelet fraction on Sysmex XN hematology analyzer: a comparison study with Sysmex XE-2100," *Clin. Chem. Lab. Med. CCLM FESCC*, vol. 53, no. 7, pp. 1091–1097, Jun. 2015.
- [125] E. Varol, "Normal range of mean platelet volume in healthy subjects," *Thromb. Res.*, Aug. 2011.
- [126] H. Demirin, H. Ozhan, T. Ucgun, A. Celer, S. Bulur, H. Cil, C. Gunes, and H. A. Yildirim, "Normal range of mean platelet volume in healthy subjects: Insight from a large epidemiologic study," *Thromb. Res.*, vol. 128, no. 4, pp. 358–360, Oct. 2011.
- [127] M. D. Lancé, R. van Oerle, Y. M. C. Henskens, and M. A. E. Marcus, "Do we need time adjusted mean platelet volume measurements?," *Lab. Hematol. Off. Publ. Int. Soc. Lab. Hematol.*, vol. 16, no. 3, pp. 28–31, Sep. 2010.
- [128] S. G. Chu, R. C. Becker, P. B. Berger, D. L. Bhatt, J. W. Eikelboom, B. Konkle, E. R. Mohler, M. P. Reilly, and J. S. Berger, "Mean platelet volume as a predictor of cardiovascular risk: a systematic review and meta-analysis," *J. Thromb. Haemost.*, vol. 8, no. 1, pp. 148–156, Jan. 2010.
- [129] B. Shah, D. Sha, D. Xie, E. R. Mohler, and J. S. Berger, "The Relationship Between Diabetes, Metabolic Syndrome, and Platelet Activity as Measured by Mean Platelet Volume: The National Health and Nutrition Examination Survey, 1999-2004," *Diabetes Care*, vol. 35, no. 5, pp. 1074–1078, May 2012.

- [130] P. Noris, C. Klersy, P. Gresele, F. Giona, P. Giordano, P. Minuz, G. Loffredo, A. Pecci, F. Melazzini, E. Civaschi, A. Mezzasoma, M. Piedimonte, F. Semeraro, D. Veneri, F. Menna, L. Ciardelli, C. L. Balduini, and the Italian “Gruppo di Studio delle Piastrine,” “Platelet size for distinguishing between inherited thrombocytopenias and immune thrombocytopenia: a multicentric, real life study,” *Br. J. Haematol.*, vol. 162, no. 1, pp. 112–119, Jul. 2013.
- [131] C. Sen Tanrikulu, Y. Tanrikulu, M. Zafer Sabuncuoglu, M. Akif Karamercan, N. Akkapulu, and F. Coskun, “Mean Platelet Volume and Red Cell Distribution Width as a Diagnostic Marker in Acute Appendicitis,” *Iran. Red Crescent Med. J.*, vol. 16, no. 5, May 2014.
- [132] E. Vagdatli, E. Gounari, E. Lazaridou, E. Katsibourlia, F. Tsikopoulou, and I. Labrianou, “Platelet distribution width: a simple, practical and specific marker of activation of coagulation,” *Hippokratia*, vol. 14, no. 1, p. 28, 2010.
- [133] O. Kamisli, S. Kamisli, Y. Kablan, S. Gonullu, and C. Ozcan, “The prognostic value of an increased mean platelet volume and platelet distribution width in the early phase of cerebral venous sinus thrombosis,” *Clin. Appl. Thromb. Off. J. Int. Acad. Clin. Appl. Thromb.*, vol. 19, no. 1, pp. 29–32, Feb. 2013.
- [134] Y.-G. Zheng, T. Yang, C.-M. Xiong, J.-G. He, Z.-H. Liu, Q. Gu, Z.-H. Zhao, and X.-H. Ni, “Platelet Distribution Width and Mean Platelet Volume in Idiopathic Pulmonary Arterial Hypertension,” *Heart Lung Circ.*, vol. 24, no. 6, pp. 566–572, Jun. 2015.
- [135] A. Karateke, R. K. Kurt, and A. Baloğlu, “Relation of platelet distribution width (PDW) and platelet crit (PCT) to preeclampsia,” *Ginekol. Pol.*, vol. 86, no. 5, pp. 372–375, May 2015.
- [136] Ş. Ulucan, A. Keser, Z. Kaya, H. Katlandur, H. Özdil, M. Bilgi, İ. Ateş, and M. S. Ülgen, “Association between PDW and Long Term Major Adverse Cardiac Events in Patients with Acute Coronary Syndrome,” *Heart Lung Circ.*, Jul. 2015.
- [137] G. Ntaios, A. Papadopoulos, A. Chatzinikolaou, Z. Saouli, P. Karalazou, G. Kaiafa, F. Girtovitis, Z. Kontoninas, C. Savopoulos, A. Hatzitolios, and S. Alexiou-Daniel, “Increased Values of Mean Platelet Volume and Platelet Size Deviation Width May Provide a Safe Positive Diagnosis of Idiopathic Thrombocytopenic Purpura,” *Acta Haematol.*, vol. 119, no. 3, pp. 173–177, 2008.
- [138] R.-L. Xu, “Platelet volume indices have low diagnostic efficiency for predicting bone marrow failure in thrombocytopenic patients,” *Exp. Ther. Med.*, Nov. 2012.
- [139] K. Kaito, H. Otsubo, N. Usui, M. Yoshida, J. Tanno, E. Kurihara, K. Matsumoto, R. Hirata, K. Domitsu, and M. Kobayashi, “Platelet size deviation width, platelet large cell ratio, and mean platelet volume have sufficient sensitivity and specificity in the diagnosis of immune thrombocytopenia,” *Br. J. Haematol.*, vol. 128, no. 5, pp. 698–702, Mar. 2005.
- [140] G. De Luca, M. Santagostino, G. G. Secco, E. Casseti, L. Giuliani, L. Coppo, A. Schaffer, A. Fundaliotis, S. Iorio, L. Venegoni, G. Bellomo, and P. Marino, “Platelet-Large Cell Ratio and the extent of coronary artery disease: results from a large prospective study,” *J. Thromb. Thrombolysis*, vol. 30, no. 4, pp. 426–433, Nov. 2010.
- [141] E. Babu and D. Basu, “Platelet large cell ratio in the differential diagnosis of abnormal platelet counts,” *Indian J. Pathol. Microbiol.*, vol. 47, no. 2, pp. 202–205, Apr. 2004.
- [142] D. Schwartz, L. Sharkey, P. J. Armstrong, C. Knudson, and J. Kelley, “Platelet Volume and Plateletcrit in Dogs with Presumed Primary Immune-Mediated Thrombocytopenia,” *J. Vet. Intern. Med.*, vol. 28, no. 5, pp. 1575–1579, Sep. 2014.

- [143] D. Yavuzcan Öztürk, S. Erçin, T. Gürsoy, G. Karatekin, and F. Ovalı, “Platelet mass index: is it a hope for reduction of platelet transfusion in NICU?,” *J. Matern. Fetal Neonatal Med.*, pp. 1–4, Sep. 2015.
- [144] E. Gerday, V. L. Baer, D. K. Lambert, D. A. Paul, M. C. Sola-Visner, T. J. Pysher, and R. D. Christensen, “Testing platelet mass versus platelet count to guide platelet transfusions in the neonatal intensive care unit,” *Transfusion (Paris)*, vol. 49, no. 10, pp. 2034–2039, Oct. 2009.
- [145] M. Ergelen and H. Uyarel, “Plateletcrit: A novel prognostic marker for acute coronary syndrome,” *Int. J. Cardiol.*, vol. 177, no. 1, p. 161, Nov. 2014.
- [146] N. Demir, E. Peker, İ. Ece, K. Ağengin, K. A. Bulan, and O. Tuncer, “Is platelet mass a more significant indicator than platelet count of closure of patent ductus arteriosus?,” *J. Matern. Fetal Neonatal Med.*, pp. 1–4, Aug. 2015.
- [147] J. Tang, X. Gao, M. Zhi, H. M. Zhou, M. Zhang, H. W. Chen, Q. F. Yang, and Z. Z. Liang, “Plateletcrit: A sensitive biomarker for evaluating disease activity in Crohn’s disease with low hs-CRP: PCT as biomarker for CD activity,” *J. Dig. Dis.*, vol. 16, no. 3, pp. 118–124, Mar. 2015.
- [148] F. Cymbalista, “Usefulness of NEUT-X determination in routine diagnostic procedures: application to myelodysplastic syndromes,” in *Sysmex Luncheon Symposium. ISLH Sydney*, 2008.
- [149] P. Harrison and A. H. Goodall, “‘Message in the Platelet’ – more than just vestigial mRNA!,” *Platelets*, vol. 19, no. 6, pp. 395–404, Jan. 2008.
- [150] M. Sakuragi, S. Hayashi, M. Maruyama, O. Kabutomori, T. Kiyokawa, K. Nagamine, H. Kato, H. Kashiwagi, Y. Kanakura, and Y. Tomiyama, “Clinical significance of IPF% or RP% measurement in distinguishing primary immune thrombocytopenia from aplastic thrombocytopenic disorders,” *Int. J. Hematol.*, vol. 101, no. 4, pp. 369–375, Apr. 2015.
- [151] R. Sokolic, N. Oden, and F. Candotti, “Assessment of Immature Platelet Fraction in the Diagnosis of Wiskott Aldrich Syndrome,” *Front. Pediatr.*, vol. 3, Jun. 2015.
- [152] K. Miyazaki, Y. Koike, S. Kunishima, R. Ishii, M. Danbara, R. Horie, Y. Yatomi, and M. Higashihara, “Immature platelet fraction measurement is influenced by platelet size and is a useful parameter for discrimination of macrothrombocytopenia,” *Hematol. Amst. Neth.*, Jun. 2015.
- [153] A. A. M. Adly, I. A. Ragab, E. A. R. Ismail, and M. M. Farahat, “Evaluation of the immature platelet fraction in the diagnosis and prognosis of childhood immune thrombocytopenia,” *Platelets*, vol. 26, no. 7, pp. 645–650, Oct. 2015.
- [154] N. van der Linden, L. J. J. Klinkenberg, S. J. R. Meex, E. A. M. Beckers, N. C. J. de Wit, and L. Prinzen, “Immature platelet fraction measured on the Sysmex XN hemocytometer predicts thrombopoietic recovery after autologous stem cell transplantation,” *Eur. J. Haematol.*, vol. 93, no. 2, pp. 150–156, Aug. 2014.
- [155] W. Mao, Y. Hu, Y. Lou, J. Dou, and L. Zou, “Immature platelet fraction values predict recovery of platelet counts following liver transplantation,” *Clin. Res. Hepatol. Gastroenterol.*, vol. 39, no. 4, pp. 469–474, Sep. 2015.
- [156] L. Perl, H. Lerman-Shivek, E. Rechavia, M. Vaduganathan, D. Leshem-Lev, N. Zemer-Wassercug, O. Dadush, P. Codner, T. Bental, A. Battler, R. Kornowski, and E. I. Lev, “Response to Prasugrel and Levels of Circulating Reticulated Platelets in Patients With ST-Segment Elevation Myocardial Infarction,” *J. Am. Coll. Cardiol.*, vol. 63, no. 6, pp. 513–517, Feb. 2014.

- [157] V. Latger-Cannard, A. Proust, J. Devignes, S. Salignac, D. Bensoussan, A. Salmon, P. Bordigoni, J. Delaunay, and T. Lecompte, "Syndrome de Wiskott-Aldrich chez un enfant révélé par l'examen morphologique attentif des plaquettes," *Hématologie*, vol. 14, no. 5, pp. 387–391, 2008.
- [158] B. E. Kehrel and M. F. Brodde, "State of the Art in Platelet Function Testing," *Transfus. Med. Hemotherapy*, vol. 40, no. 2, pp. 73–86, 2013.
- [159] I. Elalamy, V. Gkakea, G. Gerotziakas, H. Ketatni, and M. Hatmi, "L'exploration fonctionnelle plaquettaire : intérêts en pratique clinique," *Ann. Biol. Clin. (Paris)*, vol. 71, no. 1, pp. 47–57, Nov. 2013.
- [160] P. Harrison, I. Mackie, A. Mumford, C. Briggs, R. Liesner, M. Winter, S. Machin, and British Committee for Standards in Haematology, "Guidelines for the laboratory investigation of heritable disorders of platelet function: Guideline," *Br. J. Haematol.*, vol. 155, no. 1, pp. 30–44, Oct. 2011.
- [161] P. Harrison, "Platelet function analysis," *Blood Rev.*, vol. 19, no. 2, pp. 111–123, Mar. 2005.
- [162] P. Rubak, P. H. Nissen, S. D. Kristensen, and A.-M. Hvas, "Investigation of platelet function and platelet disorders using flow cytometry," *Platelets*, pp. 1–9, Aug. 2015.
- [163] G. Schmitz, G. Rothe, A. Ruf, S. Barlage, D. Tschöpe, K. J. Clemetson, A. H. Goodall, A. D. Michelson, A. T. Nurden, and T. V. Shankey, "European working group on clinical cell analysis : consensus protocol for the flow cytometric characterisation of platelet function," *Thromb. Haemost.*, no. 79, pp. 885–896, 1998.
- [164] F. Rendu and B. Brohard-Bohn, "The platelet release reaction: granules' constituents, secretion and functions," *Platelets*, vol. 12, no. 5, pp. 261–273, Jan. 2001.
- [165] A. D. Michelson, M. R. Barnard, L. A. Krueger, A. L. Frelinger, and M. I. Furman, "Evaluation of Platelet Function by Flow Cytometry," *Methods*, vol. 21, no. 3, pp. 259–270, Jul. 2000.
- [166] E. Maurer-Spurej, C. Pittendreigh, and J. Wu, "Diagnosing Platelet δ -Storage Pool Disease in Children by Flow Cytometry," *Am. J. Clin. Pathol.*, vol. 127, no. 4, pp. 626–632, Apr. 2007.
- [167] J. Wall, M. Buijs-Wilts, J. Arnold, W. Wang, M. White, L. Jennings, and C. Jackson, "A flow cytometric assay using mepacrine for study of uptake and release of platelet dense granule contents," *Br. J. Haematol.*, no. 89, pp. 380–385, 1995.
- [168] N. Gordon, J. Thom, C. Cole, and R. Baker, "Rapid detection of hereditary and acquired platelet storage pool deficiency by flow cytometry," *Br. J. Haematol.*, no. 89, pp. 117–123, 1995.
- [169] M. Nishibori, B. Cham, A. McNicol, A. Shalev, N. Jain, and J. M. Gerrard, "The protein CD63 is in platelet dense granules, is deficient in a patient with Hermansky-Pudlak syndrome, and appears identical to granulophysin.," *J. Clin. Invest.*, vol. 91, no. 4, p. 1775, 1993.
- [170] The British Society For Haematology BSCH Haemostasis and Thrombosis Task Force, "Guidelines on platelet function testing," *J. Clin. Pathol.*, no. 41, pp. 1322–1330, 1988.
- [171] C. Ingerman, J. Smith, and M. Silver, "Direct measurement of platelet secretion in whole blood," *Thromb. Res.*, no. 16, pp. 335–344, 1979.
- [172] G. Gobbi, P. Mirandola, P. L. Tazzari, F. Ricci, L. Caimi, A. Cacchioli, S. Papa, R. Conte, and M. Vitale, "Flow cytometry detection of serotonin content and release in resting and activated platelets," *Br. J. Haematol.*, vol. 121, no. 6, pp. 892–896, 2003.

- [173] P. Noris and C. L. Balduini, "Inherited thrombocytopenias in the era of personalized medicine," *Haematologica*, vol. 2, no. 100, pp. 145–148, 2015.
- [174] M. Buttarello, "Quality specification in haematology: the automated blood cell count," *Clin. Chim. Acta*, vol. 346, no. 1, pp. 45–54, Aug. 2004.
- [175] G. Togni, C. Volken, and G. Sabo, "Préanalytique," *Forum Med Suisse*, no. 6, pp. 113–120, février 2002.
- [176] M. Daves, E. M. Zagler, R. Cemin, F. Gnech, A. Joos, S. Platzgummer, and G. Lippi, "Sample stability for complete blood cell count using the Sysmex XN haematological analyser," *Blood Transfu.*, no. 4, pp. 576–582, Oct. 2015.
- [177] F. Trimoreau, C. Martin, N. Gachard, and J. Feuillard, "Phase pré-analytique en hématologie cellulaire de routine."
- [178] E. M. Van Cott, K. B. Lewandrowski, S. Patel, D. Y. Grzybek, H. S. Patel, S. R. Fletcher, and A. Kratz, "Comparison of glass K3EDTA versus plastic K2EDTA blood-drawing tubes for complete blood counts, reticulocyte counts, and white blood cell differentials," *Lab. Hematol.*, vol. 9, no. 1, pp. 10–14, 2003.
- [179] COFRAC, "Guide technique d'accréditation de vérification (portée A) / validation (portée B) des méthodes en biologie médicale. SH GTA 04." .
- [180] COFRAC, "Guide technique d'accréditation pour l'évaluation des incertitudes de mesure en biologie médicale. SH-GTA-14." .
- [181] P. S. Horn, A. J. Pesce, and B. E. Copeland, "A robust approach to reference interval estimation and evaluation," *Clin. Chem.*, vol. 44, no. 3, pp. 622–631, 1998.
- [182] A. Geffré, D. Concordet, J.-P. Braun, and C. Trumel, "Reference Value Advisor: a new freeware set of macroinstructions to calculate reference intervals with Microsoft Excel: Reference Value Advisor," *Vet. Clin. Pathol.*, vol. 40, no. 1, pp. 107–112, Mar. 2011.
- [183] S. H. Park, C.-J. Park, M.-J. Kim, M.-Y. Han, B.-R. Lee, Y.-U. Cho, and S. Jang, "The Sysmex XN-2000 Hematology Autoanalyzer Provides a Highly Accurate Platelet Count than the Former Sysmex XE-2100 System Based on Comparison with the CD41/CD61 Immunoplatelet Reference Method of Flow Cytometry," *Ann. Lab. Med.*, vol. 34, no. 6, p. 471, 2014.
- [184] A. Vassault, D. Grafmeyer, D. De Graeve, R. Cohen, A. Beaudonnet, and J. Bienvenu, "Analyses de biologie médicale : spécifications et normes d'acceptabilité à l'usage de la validation de techniques," *Ann. Biol. Clin. (Paris)*, vol. 57, no. 6, pp. 685–695, Nov. 1999.
- [185] X. Troussard, S. Vol, E. Cornet, V. Bardet, J.-P. Couaillac, C. Fossat, J.-C. Luce, E. Maldonado, V. Siguret, J. Tichet, and others, "Étude des valeurs normales de l'hémogramme chez l'adulte: un besoin pour une meilleure interprétation et pour l'accréditation du laboratoire," in *Annales de Biologie Clinique*, 2014, vol. 72, pp. 561–581.
- [186] V. Latger-Cannard, C. Philippe, A. Bouquet, V. Baccini, M.-C. Alessi, A. Ankri, A. Bauters, S. Bayart, P. Cornillet-Lefebvre, S. Daliphard, M.-J. Mozziconacci, A. Renneville, P. Ballerini, G. Leverger, H. Sobol, P. Jonveaux, C. Preudhomme, P. Nurden, T. Lecompte, and R. Favier, "Haematological spectrum and genotype-phenotype correlations in nine unrelated families with RUNX1 mutations from the French network on inherited platelet disorders," *Orphanet J. Rare Dis.*, vol. 11, no. 1, Dec. 2016.

- [187] E. Giannini and V. Savarino, "Thrombocytopenia in liver disease," *Curr. Opin. Hematol.*, vol. 15, pp. 473–480, 2008.
- [188] N. van der Linden, L. J. J. Klinkenberg, S. J. R. Meex, E. A. M. Beckers, N. C. J. de Wit, and L. Prinzen, "Immature platelet fraction measured on the Sysmex XN hemocytometer predicts thrombopoietic recovery after autologous stem cell transplantation," *Eur. J. Haematol.*, vol. 93, no. 2, pp. 150–156, Aug. 2014.
- [189] J. J. M. L. Hoffmann, "Reticulated platelets: analytical aspects and clinical utility," *Clin. Chem. Lab. Med. CCLM*, vol. 52, no. 8, Jan. 2014.
- [190] B. Thakral, T. Rojanapremsuk, K. Saluja, and M. Eldibany, "Misdiagnosed MYH9 related inherited macrothrombocytopenia with an inadvertent splenectomy," *Pathology (Phila.)*, vol. 47, no. 4, pp. 377–379, Jun. 2015.
- [191] M. Fiore, X. Pillois, S. Lorrain, M.-A. Bernard, N. Moore, P. Sié, J.-F. Viillard, and P. Nurden, "A diagnostic approach that may help to discriminate inherited thrombocytopenia from chronic immune thrombocytopenia in adult patients," *Platelets*, pp. 1–8, Mar. 2016.

ANNEXES

ANNEXE 1: Modèle de la feuille de renseignements clinico-biologiques nécessaire à toute inclusion à l'étude.

Etude "Paramètres plaquettaires XN, Sysmex et Thrombopénies constitutionnelles"

Merci de participer à notre étude, cette feuille d'inclusion est à envoyer par mail à :
François-Xavier DOUCET - fx.doucet@chu-nancy.fr

Associer en pièce jointe les deux fichiers extraits de l'IPU comme indiqué dans la procédure d'extraction des données (*.smp et *.116)

Joindre également par courrier un frottis étalé automatiquement et coloré ainsi qu'un frottis étalé manuellement et non coloré.

Centre

Nom

Prénom

Date de naissance

Diagnostic

Mutation(s)

Nom/Code des
fichiers Sysmex

Heure de
prélèvement h

Heure d'analyse h

Traitements
éventuels

ANNEXE 2 : Protocole destiné à la paillasse technique, résumant brièvement les principaux critères de notre étude.

PROTOCOLE

Etude « Paramètres plaquettaires XN, Sysmex et Thrombopénies constitutionnelles »

Evaluation de l'automate XN SYSMEX dans le cadre de thrombopénies constitutionnelles.

Patients à inclure :

Tout patient présentant une

- Thrombopénie Constitutionnelle
- Purpura Thrombopénique Idiopathique

Pré-analytique

Délai

Délai prélèvement / analyse des échantillons ≤ à **3h**.

Anticoagulant

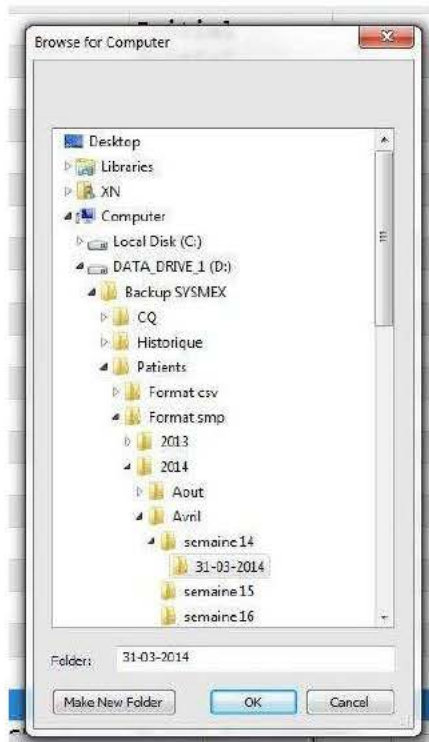
Tube EDTA K2.

Contrôles de qualité

Suivi normal et selon les procédures du laboratoire des CIQ, EEQ et de l'externalisation des contrôles internes.

Données nécessaires

- Analyse du tube en canal **PLT-F**
- **Frottis**
 - a. Automatique par SP-10 (étalé et coloré automatiquement)
 - b. Manuel (étalé mais non coloré)
- **Données informatiques** (selon procédure jointe)
 - a. Fichier *.SMP
 - b. Fichier *.116 (temporaire 3 semaines sur l'IPU)
- **Feuille d'inclusion** (pdf à envoyer au centre de référence pour chaque patient)



- **Fichier *.116**

- Sur l'IPU :

- Ouvrir l'explorateur Windows
 - Allez vers C:/Program Files/Sysmex/RAWDATA

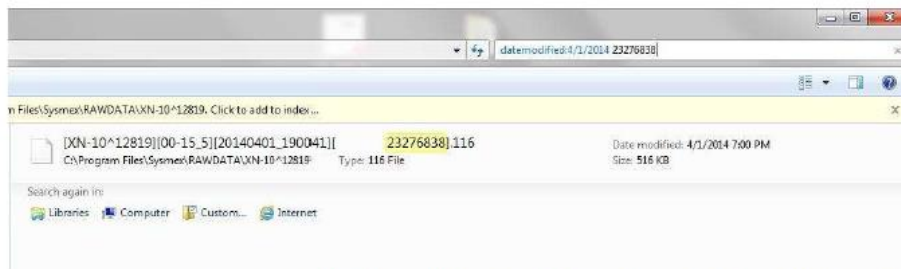


- Puis dans la case de recherche, saisissez la date de l'analyse sur le calendrier qui s'affiche





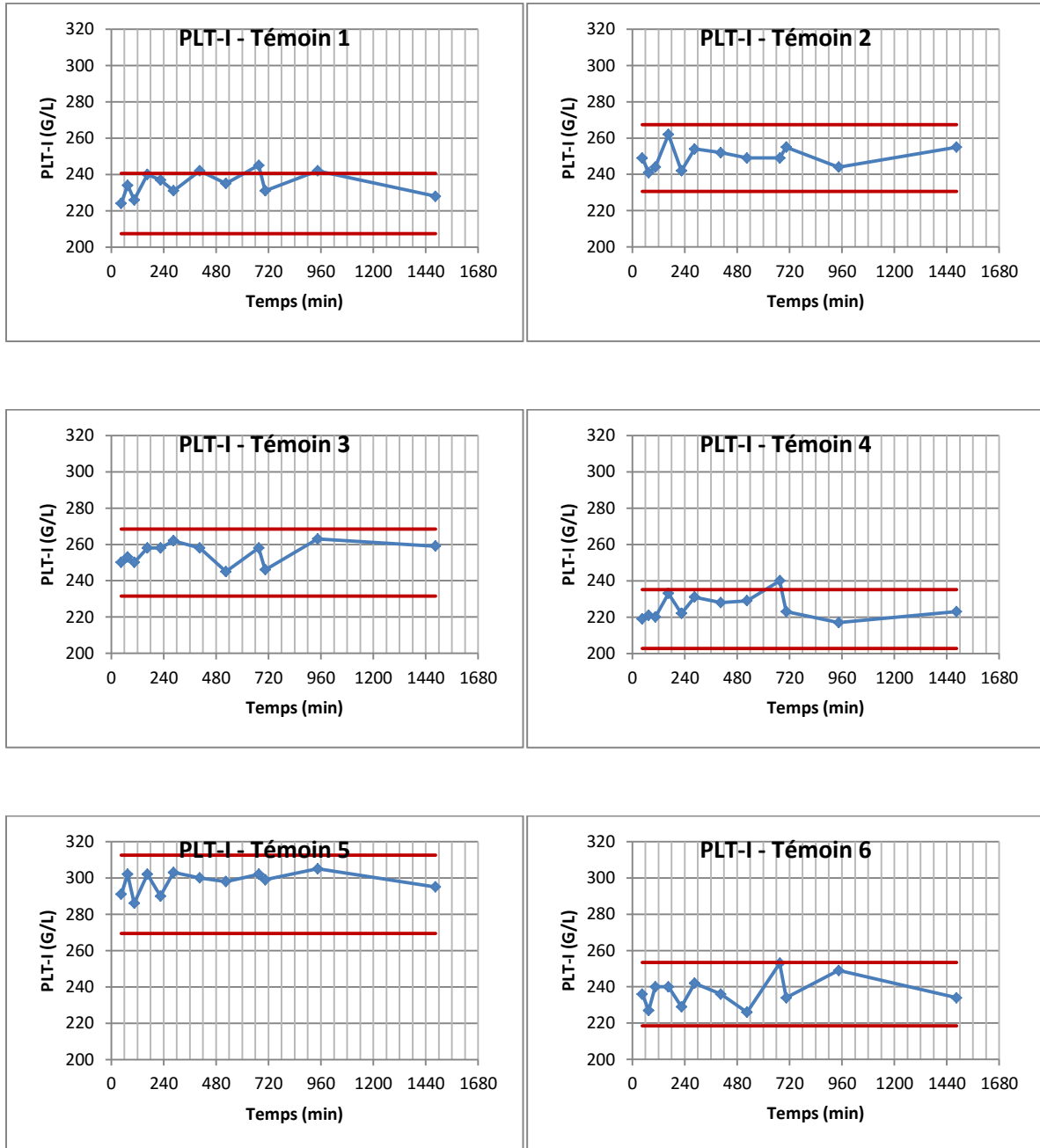
- Puis entrez le numéro de l'échantillon (numéro de tube)

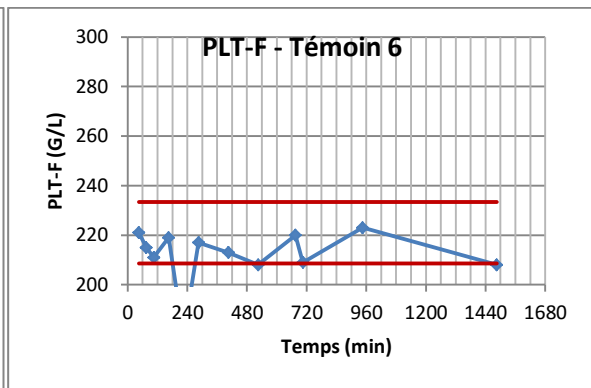
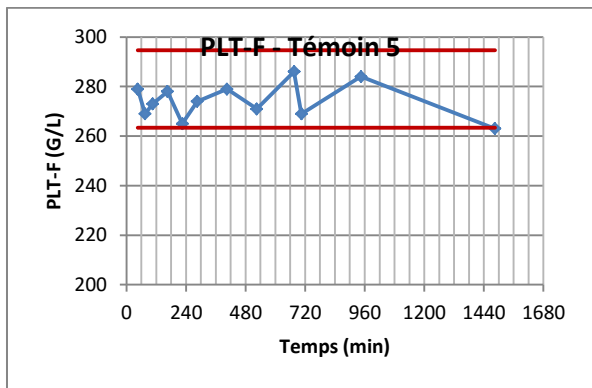
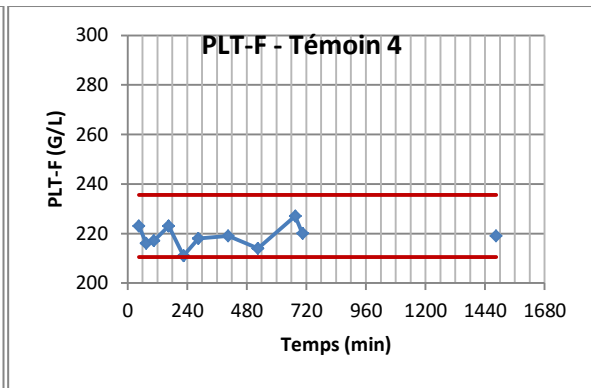
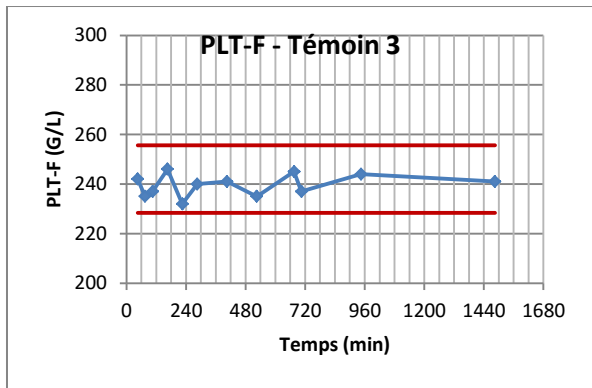
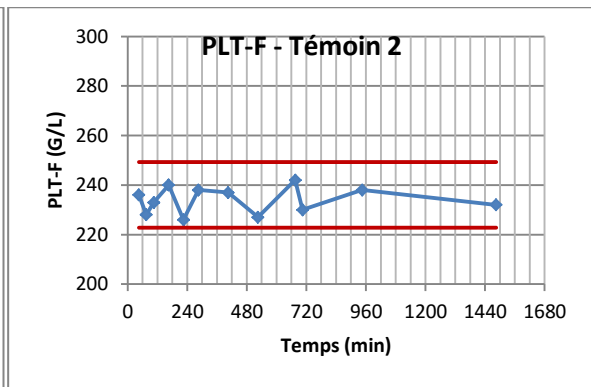
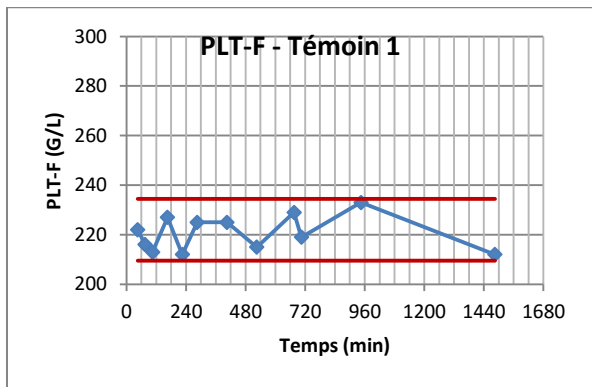


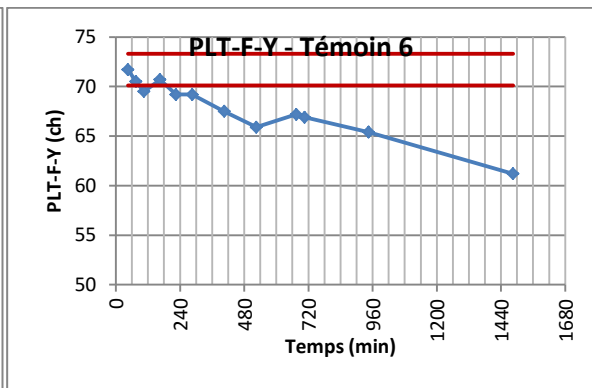
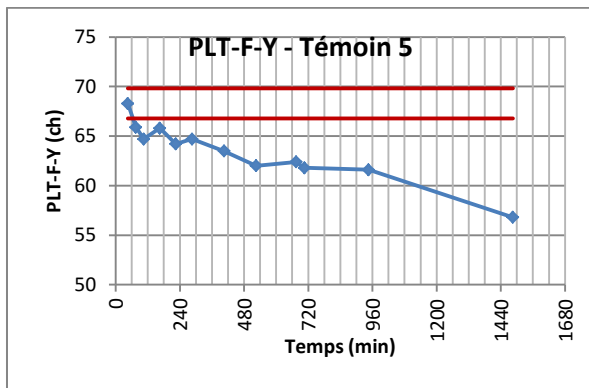
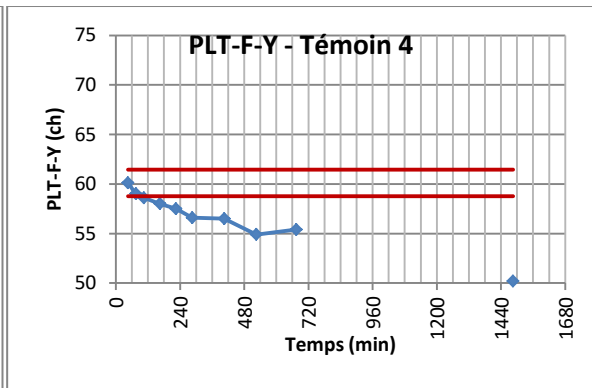
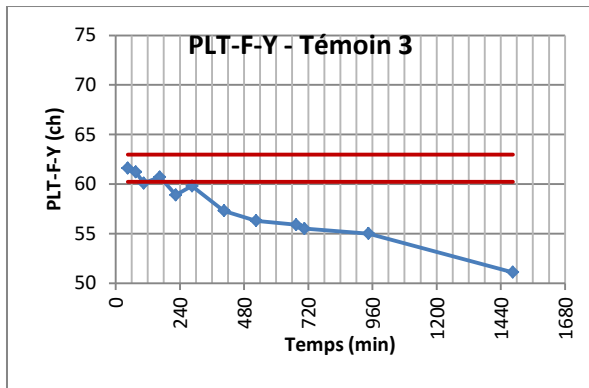
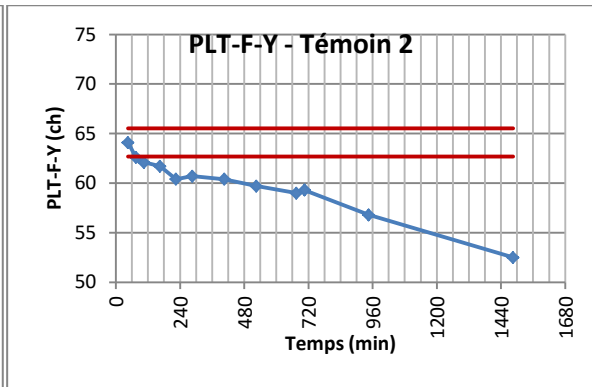
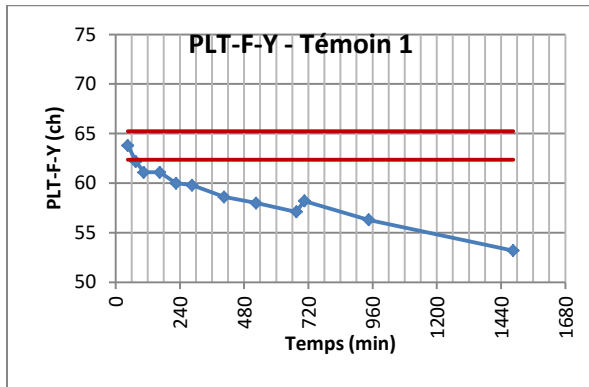
- Copiez ensuite ce fichier *.116 vers le répertoire de votre choix en le renommant de la même manière que le fichier *.smp

ANNEXE 4 : Analyse de l'étude de stabilité selon les recommandations COFRAC, norme NF EN ISO 15189 pour le PLT-I, PLT-F et PLT-F-Y.

Les valeurs des patients se distribuant sur les courbes bleus alors que les limites d'acceptabilités, calculées sur la base des biais déterminés en 7.1.3, figurent en traits rouges.







N° d'identification :

TITRE

Optimisation du diagnostic des thrombopénies constitutionnelles par l'utilisation des paramètres plaquettaires morphométriques

**Thèse soutenue le 13 juin 2016
Par François-Xavier DOUCET**

RESUME :

Les thrombopénies constitutionnelles (TC) sont des pathologies rares résultantes d'anomalies qualitatives et quantitatives des plaquettes. Diverses voies de signalisation, différents récepteurs ou étapes de la mégacaryopoïèse peuvent être affectés et aboutir à ces pathologies. Aujourd'hui la grande hétérogénéité de ces thrombopénies est représentée par l'existence de 23 formes de TC portées sur 22 gènes. Toutefois un certain nombre de patients reste encore actuellement sans diagnostic précis.

Ce n'est que très récemment qu'une publication de Noris *et al.* (2014) a établi une classification des TC à partir de l'observation morphologique au microscope optique : les TC à plaquettes de petite taille, de taille normale, de taille augmentée et à plaquettes géantes.

L'objectif principal de cette thèse est de reproduire cette classification, initialement réalisée sur la base de mesures micrométriques des plaquettes, en utilisant les paramètres automatisés de l'hématimètre XN SYSMEX®. Pour ce faire, il a été exploité principalement les données du canal dédié aux plaquettes, le PLT-F, marquant spécifiquement par un fluorochrome les éléments plaquettaires.

Dans ce but, les différents paramètres disponibles, leurs significations ainsi que leurs performances respectives seront détaillés. Nous avons calculé pour chacun d'entre eux des seuils discriminants en fonction des différentes entités de TC. Puis par l'utilisation d'une combinaison de marqueurs, une classification des TC a été obtenue avec des valeurs de sensibilité et spécificité optimales.

L'objectif secondaire de ce travail a été d'établir des algorithmes décisionnels afin d'aider au diagnostic de TC. Nous avons élaboré des arbres à double lecture, selon que l'on se place dans un contexte de caractérisation d'une TC suspectée ou dans un contexte de validation biologique de routine d'une thrombopénie.

Enfin un point a été fait sur les possibilités et perspectives de différenciation des TC avec les PTI.

MOTS CLES :

Thrombopénie constitutionnelle – SYSMEX – Plaquette – Hématimètre – IPF – Fluorescent – PTI

Directeur de thèse	Intitulé du laboratoire	Nature
Dr Véronique LATGER-CANNARD, PH Dr Julien PERRIN, MCU-PH, co-directeur	Service d'Hématologie Biologique, CHRU Nancy	Expérimentale <input checked="" type="checkbox"/> Bibliographique <input type="checkbox"/> Thème <input checked="" type="checkbox"/> 5

Thèmes 1 – Sciences fondamentales 2 – Hygiène/Environnement
 3 – Médicament 4 – Alimentation – Nutrition
 – Biologie 6 – Pratique professionnelle