

UNIVERSITÉ DE NANTES

FACULTÉ DE MÉDECINE

Année : 2020

N°

THÈSE

pour le

DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN MÉDECINE

Diplôme d'étude spécialisée de médecine interne

par

Guillaume Bonnard

Présentée et soutenue publiquement le 13 octobre 2020

**ETUDE DE LA SIALYLATION PLAQUETTAIRE PAR CYTOMETRIE
EN FLUX POUR LE DIAGNOSTIC DIFFERENTIEL DES
THROMBOPENIES IMMUNOLOGIQUES ET CONSTITUTIONNELLES
: EVALUATION DE L'INTERET DIAGNOSTIQUE ET PRONOSTIQUE**

Président : Monsieur le Professeur Mohamed Hamidou

Membres du jury : Madame le Professeur Marie Christine Béné, Monsieur
le Professeur Bertrand Godeau, Monsieur le Professeur Matthieu Mahévas

Directeur de thèse : Monsieur le Docteur Marc Fouassier

Remerciements :

Je voudrais remercier chaleureusement le Professeur Hamidou pour son accompagnement et son soutien constant durant tout mon parcours d'interne. L'apprentissage de la pratique médicale repose essentiellement sur le compagnonnage et je suis fier d'avoir pu vous compter parmi mes mentors. Je vous remercie de m'avoir enseigné tant de chose tant sur le plan théorique, que sur le plan du « savoir être ». Un grand merci pour votre soutien et vos conseils dans les moments difficiles, quand il fallait s'organiser pour gérer les patients d'hospitalisation, quand il fallait défendre les intérêts des internistes lors des choix de stage, ou lorsqu'il fallait rebondir après un refus d'interCHU. Un grand merci pour la confiance que vous m'avez accordée, en me recommandant à vos collègues parisiens ou bien en me confiant des travaux de recherche.

Je remercie bien amicalement Marc Fouassier pour avoir accepté de m'encadrer durant ce travail de thèse d'exercice. Je te remercie pour m'avoir bien formé à l'hémostase biologique et clinique durant mes stages au laboratoire, et de m'avoir sensibilisé aux thrombopathies/thrombopénies constitutionnelles. Ce furent des moments très enrichissants, tant sur le plan intellectuel que sur le plan humain. Notre intérêt commun pour les « maladies des plaquettes » nous a permis de concevoir ce projet et de le mener à bien. Je suis fier que nous ayons pu le réaliser ensemble et je te remercie de m'avoir encadré tout au long de cette aventure.

Je remercie Marie-Christine Béné pour son aide essentielle dans la mise au point des techniques de cytométrie en flux plaquettaire, pour son expertise dans l'analyse des résultats et les statistiques. Merci également de m'avoir accueilli pour la seconde fois au sein de votre équipe que j'apprécie tant. Je remercie également Marion Eveillard pour ses conseils et son expertise sur l'IPF et son aide pour les tableaux de contingence.

Je voudrais remercier le Professeur Godeau de m'avoir accueilli au sein de son service, malgré les aléas et les imprévus administratifs. Ce fut un réel honneur de travailler avec vous et avec votre équipe. Découvrir un nouveau service et de nouvelles pratiques fut une expérience très enrichissante et particulièrement dans le domaine des cytopénies auto-immunes. Je souhaiterais vous remercier également de m'avoir fait confiance, en me proposant de poursuivre l'aventure avec vous et votre équipe et j'espère que je saurai être à la hauteur de votre confiance.

Je remercie Matthieu Mahévas, pour m'avoir fait découvrir le monde de la recherche en m'accueillant au sein de son équipe INSERM. Un grand merci pour m'avoir transmis ton esprit critique, ton sens de la clarté à l'oral, ainsi que pour m'avoir encadré tant dans la rédaction du mémoire que dans sa soutenance. Mon année de master 2 fut une incroyable opportunité professionnelle, une année remplie de découverte captivantes associée à de belles rencontres humaines.

Je remercie également Imane Azzaoui et Etienne Crickx, avec qui j'ai beaucoup aimé travailler durant mon année de master 2. J'ai pu apprendre à leur contact la rigueur, l'organisation, la persévérance et la réflexion scientifique indispensable à tout projet de recherche.

Je remercie Nicolas Drillaud, Antoine Babuty et Clémentine Wahl pour avoir participé à ce travail en réalisant les analyses de cytométrie en flux au laboratoire. J'ai conscience que sans cet esprit d'entraide entre internes, ce projet n'aurait sûrement pas pu aboutir.

Je remercie également Nathalie, Catherine, Emmanuelle et Marine, techniciennes au laboratoire hémostase pour m'avoir aidé dans les dernières « manip' » et pour m'avoir appris les fondamentaux concernant les techniques d'explorations de l'hémostase.

Je remercie les hémostasiens du CHU de Nantes, Marc, Catherine, Nicolas, Benjamin et Marianne pour m'avoir appris tant de choses sur l'hémostase clinique et biologique. Mes stages au laboratoire et au centre de traitement de l'hémophilie furent riches d'enseignement dans cette discipline passionnante.

Je remercie tous les praticiens de médecine interne ayant inclus des patients dans le protocole, avec une attention toute particulière pour Alexandra Espitia, Antoine Néel et Anaïs Wahbi.

Je remercie Alexandra Espitia pour son écoute et sa gentillesse. Mon parcours d'interne n'a pas toujours été facile, et tu as su être à l'écoute dans les moments de doute et de profonde remise en cause. Ceci m'a aidé à progresser et à gagner en maturité.

Je remercie également mes co-internes du service d'hématologie clinique, Romain Collot, Cyrille Morvant, Chloé Antier, Domitille Costes, qui ont inclus contentieusement les patients dont ils avaient la charge.

Un grand merci à mes parents, qui m'ont toujours soutenu avec bienveillance et compréhension dans tous mes projets de vie. Merci d'avoir été présents à toutes les étapes importantes de ma vie.

Un grand merci à ma sœur Marie, avec qui j'aime toujours autant partager nos aventures de vie et sur qui je pourrais toujours compter.

Un grand merci à ma chère Sophie qui partage ma vie depuis presque 7 ans, et à qui je dois beaucoup dans mon accomplissement personnel et professionnel. Merci pour ton écoute attentive en toute circonstance. Merci d'avoir cru en moi et de m'avoir soutenu malgré les épreuves. Je suis fier de partager ma vie et mon avenir avec toi.

Je dois également remercier mon petit chou, qui malgré sa petite taille est un concentré d'amour et de tendresse qui m'a donné la force et la persévérance malgré les épreuves. Tu étais un bébé exemplaire, d'une extrême adaptabilité malgré les profonds changements de vie et déménagements successifs que nous t'avons fait subir. Ton petit regard coquin et ton enthousiasme inépuisable nous comble de bonheur avec ta maman.

Merci à mes amis Bordelais Clara, Fanny, Simon et Sylvain, Bertrand avec qui j'ai toujours gardé contact et que j'ai plaisir à revoir au fil des années.

Merci à Cécile qui m'a gentiment soutenu et écouté durant ce dernier semestre d'internat un peu particulier.

Table des matières

| | |
|---|----|
| Remerciements : | 2 |
| Liste des abréviations : | 6 |
| I) Introduction : | 8 |
| A) La thrombopénie immunologique (PTI) : | 8 |
| 1) Généralités : | 8 |
| 2) Difficultés diagnostiques du PTI : | 9 |
| 2.1) Les thrombopénies constitutionnelles | 10 |
| 2.2) les insuffisances médullaires : | 12 |
| B) Outils disponibles pour le diagnostic différentiel des thrombopénies | 12 |
| 1) Généralités | 12 |
| 2) Les plaquettes réticulées ou plaquettes immatures : | 14 |
| 3) Principe de mesure de l'IPF : | 15 |
| 4) Apport de l'IPF dans le diagnostic différentiel des thrombopénies. | 17 |
| 5) L'IPF au cours du PTI | 18 |
| C) L'acide sialique et les phénomènes de sialylation : | 20 |
| 1) Définitions | 20 |
| D) Le rôle clé de l'acide sialique dans la régulation de la clairance des plaquettes : | 26 |
| 1) Glycosylation des plaquettes : | 26 |
| 2) Lien entre glycosylation et durée de vie des plaquettes : | 27 |
| 3) Apport des travaux sur le stockage des plaquettes au froid : | 27 |
| 4) Le rôle clé du Ashwell-Morell receptor dans la clairance des plaquettes désialylées et la régulation de la synthèse de TPO : | 30 |
| E) La désialylation plaquettaire au cours du PTI : | 32 |
| 1) Rôle clé des auto-anticorps dans la physiopathologie du PTI : | 32 |
| 2) Activation et destruction des plaquettes de façon Fc-indépendante par les anticorps anti GPIb/IX : | 33 |
| II) Objectifs : | 34 |
| III) Patients et méthodes : | 35 |
| A) Inclusion des patients : | 35 |
| B) Etude de la sialylation plaquettaire et des paramètres plaquettaires : | 36 |
| 1) Obtention des échantillons : | 36 |
| 2) Analyse en cytométrie en flux : | 37 |
| 3) Obtention des paramètres plaquettaires (numération plaquettaire et morphologie plaquettaire) : | 37 |
| C) Dosage de la P sélectine (CD62P) soluble : | 37 |

| | | |
|------|---|----|
| D) | Analyse statistique : | 38 |
| E) | Aspects éthiques : | 38 |
| IV) | Résultats : | 39 |
| A) | Mise au point de la technique d'analyse de la sialylation plaquettaire : | 39 |
| | Influence du type de tube de prélèvement utilisé et du délai d'analyse de la sialylation : | 39 |
| | Détection d'une désialylation plaquettaire induite <i>in vitro</i> : | 43 |
| B) | Description des patients inclus : | 45 |
| 1) | Patients du groupe PTI : | 46 |
| 2) | Patients du groupe thrombopénie chimio-induite : | 47 |
| 3) | Patients du groupe thrombopénie constitutionnelle : | 47 |
| C) | Analyse de la sialylation et de l'activation plaquettaire en cytométrie en flux | 48 |
| 1) | Intérêt de l'analyse de la sialylation plaquettaire pour le diagnostic différentiel du PTI et des thrombopénies constitutionnelles | 48 |
| 2) | Etude du lien entre sialylation plaquettaire et réponse thérapeutique au cours du PTI | 50 |
| 3) | Etude de l'activation plaquettaire par cytométrie en flux | 50 |
| D) | Dosage plasmatique de la P sélectine soluble : | 53 |
| E) | Analyse des paramètres plaquettaire avancés (IPF) : | 55 |
| F) | Analyse des courbes ROC pour distinguer PTI et thrombopénies constitutionnelles : | 58 |
| V) | Discussion : | 60 |
| | Mises au point de la technique d'analyse de la sialylation et de l'activation plaquettaire | 60 |
| | L'analyse de la sialylation plaquettaire ne permet pas de distinguer les patients ayant un PTI et ceux ayant une thrombopénie constitutionnelle. | 62 |
| | L'analyse de la sialylation pourrait avoir un intérêt pronostique au cours du PTI | 63 |
| | L'étude de l'état d'activation plaquettaire pourrait permettre le diagnostic différentiel entre PTI et thrombopénie constitutionnelle | 65 |
| | L'IPF peut être un outil pour distinguer PTI et thrombopénie constitutionnelle dans les cas complexes | 68 |
| VI) | Conclusion: | 71 |
| VII) | Références bibliographiques : | 72 |
| | Annexes: | 86 |
| A) | ANNEXE 1 : note d'information à l'attention des patients | 86 |
| B) | ANNEXE 2 : formulaire de consentement | 88 |

Liste des abréviations :

| | |
|---------|--|
| ANKRD26 | ankyrin repeat domain 26 |
| AMR | Ashwell Morell receptor |
| AUC | Area under curve |
| CMAH | Cytidine monophospho-acide N-acétyl neuraminique hydroxylase |
| DANA | Acide N-Acétyl-2,3-déhydro-2-désoxyneuraminique |
| ECA | <i>Erythrina cristagalli agglutinin</i> |
| EDTA | Éthylène diamine tétraacétique |
| ELISA | enzyme-linked immunosorbent assay |
| EIQ | Écart interquartile |
| Fc | Fraction cristallisable |
| FDP/AML | Familial platelet disorder with predisposition to acute myeloid leukemia |
| fL | Femtolitre |
| FSC | Forward scattered light |
| GalNAc | Acétyl-galactosamine |
| GlcNAc | Acétylglucosamine |
| GPIBB | glycoprotein 1b-beta |
| GlcNAc | N-Acétylglucosamine |
| LBD | Ligand binding domain |
| MAIPA | Monoclonal Antibody Immobilization of Platelet Antigens |
| MALII | <i>Maackia amurensis lectin II</i> |
| MFI | Mean fluorescence intensity |
| MSD | Mecanosensory domain |
| Neu5Ac | Acide N-acétylneuraminique |
| Neu5Gc | Acide N-glycolyl neuraminique |
| PTI | Purpura thrombopénique immunologique |
| R-ASGP | Récepteurs aux asialoglycoprotéines |
| RCA | <i>Ricinus communis agglutinin I</i> |
| ROC | Receiver operating characteristics |
| RUSAT | Radio Ulnar Synostosis with Amegakaryocytic Thrombocytopenia |
| SAMPs | Self-associated molecular patterns |
| SAPL | Syndrome des anti-phospholipides |
| sCD40 | CD40 soluble |
| sCD62P | CD62P soluble |
| SFL | Side fluorescent light |
| Siglecs | sialic acid binding immunoglobulin-like lectins |
| SSC | Side scattered light |

| | |
|--------------|---|
| sWGA | succinyl wheat germ agglutinin |
| TAR syndrome | Thrombocytopenia-Absent Radius Syndrome |
| TPO | Thrombopoïétine |
| TPO-Ra | Agoniste des récepteurs de la thrombopoïétine |
| VPM | Volume Plaquettaire Moyen |
| VPN | Valeur prédictive négative |
| VPP | Valeur prédictive positive |
| vWF | Facteur von Willebrand |
| WAS | Wiskott-Aldrich Syndrome |

I) Introduction :

A) La thrombopénie immunologique (PTI) :

1) Généralités :

La thrombopénie immunologique, ou purpura thrombopénique immunologique (PTI) est une maladie hémorragique acquise. Il s'agit d'une maladie auto-immune, induite par la présence d'anticorps anti-plaquettes (1) et définie par une thrombopénie inférieure à 100 G/L, isolée, en l'absence d'autre cause ou maladie pouvant être associée à une thrombopénie (2).

Cliniquement, la thrombopénie expose les patients à des saignements essentiellement cutanés et muqueux, même si de rares hémorragies viscérales sont rapportées. Les principaux signes sont le purpura pétéchial, les ecchymoses et les saignements muqueux. Le risque d'hémorragie est globalement bien corrélé au taux de plaquettes, avec une augmentation significative en dessous de 20 G/L (3). Le PTI est associé à une morbidité importante liée aux hospitalisations, aux effets secondaires infectieux ou thrombotiques des traitements et à une altération de la qualité de vie (4,5). Enfin, la mortalité globale à long terme au cours du PTI est plus élevée que dans la population générale (odd ratio estimé à 1,5), avec une mortalité à 10 ans estimée à 34% (6).

C'est une maladie rare, avec une incidence estimée à 2,92/100.000 habitants/an en France (7), mais il s'agit néanmoins de la cytopénie auto-immune la plus fréquente. La maladie est présente à tous les âges de la vie, avec deux pics d'incidence : le premier se situe chez l'enfant, principalement entre 1 et 5 ans, et le second après l'âge de 60 ans. Pour ces deux pics d'incidence on observe une légère prédominance masculine, alors qu'il y a une prédominance féminine de la maladie en dehors de ces pics entre 18 et 50 ans. Il existe également une variation de l'incidence selon la saison (prédominance durant les mois d'hiver), et géographique avec un gradient Nord-Sud bien décrite sur le territoire français.

L'évolution naturelle de la maladie varie selon l'âge d'apparition. Chez l'enfant, il s'agit le plus souvent d'une maladie transitoire : 80% des enfants présentent une guérison

spontanée en quelques semaines. A l'inverse, le PTI évolue vers une maladie chronique chez 70% des adultes avec une alternance de rémissions et de rechutes.

On distingue 3 phases évolutives (8) :

- Le PTI *nouvellement diagnostiqué*, i.e. évoluant depuis moins de 3 mois.
- Le PTI *persistant*, i.e. comprenant la période entre 3 et 12 mois après le diagnostic.
- Le PTI *chronique*, i.e. évoluant depuis plus de 12 mois après le diagnostic.

Cette distinction est utile afin de guider l'attitude thérapeutique. En effet, les chances de rémission spontanée diminuent avec la durée d'évolution de la maladie : elles sont de 30% environ dans les 3 premiers mois, pour devenir quasi nulles à la phase chronique chez l'adulte (estimées inférieures à 5%). De ce fait, les traitements irréversibles comme la splénectomie ou présentant des effets secondaires importants comme les immunosuppresseurs ne s'envisagent que dans les phases chroniques.

On oppose classiquement les formes primaires ou idiopathiques représentant 80 à 85% des cas, aux PTI dits secondaires (8). Dans les formes secondaires le PTI accompagne une autre maladie ou une cause associée, comme certaines maladies auto-immunes (lupus systémique, SAPL, syndrome d'Evans, thyroïdite d'Hashimoto), maladies infectieuses chroniques (VIH, VHC, *Helicobacter pylori*), déficits immunitaires (DICV, ALPS, déficit en CTLA-4, syndrome de Di Georges), hémopathie malignes (syndrome myélodysplasique, LLC, LMMC, lymphome angio-immunoblastique, MGUS), ou d'autres causes plus rares.

Le diagnostic de PTI reste un diagnostic d'élimination, en l'absence de critère clinique, d'imagerie ou biologique spécifique permettant d'établir un diagnostic de certitude. Le diagnostic est posé sur un faisceau d'arguments, et par l'exclusion des autres causes de thrombopénie (9).

2) Difficultés diagnostiques du PTI :

Si les causes classiques de thrombopénie sont facilement écartées par la majorité des cliniciens (fausse thrombopénie à l'EDTA, thrombopénie de consommation, splénomégalie,

chimiothérapies cytotoxiques), il reste des situations complexes où le mécanisme de la thrombopénie reste incertain malgré les explorations complémentaires conventionnelles. Les principaux diagnostics différentiels pouvant mimer un PTI sont les thrombopénies constitutionnelles, les insuffisances médullaires ou syndromes myélodysplasiques avec thrombopénie isolée initiale et les thrombopénies médicamenteuses (10). De façon plus anecdotique, le PTI peut dans de rares cas être confondu avec une maladie de Willebrand de type 2B (11). Ce sous-type de maladie de Willebrand est caractérisé par une mutation dans l'exon 28 du gène *VWF*, entraînant une hyperaffinité du domaine de liaison du facteur Willebrand (vWF) pour la GPIb plaquettaire (12) et occasionnant parfois une thrombopénie de consommation par phagocytose des complexes plaquettes/vWF (13). La thrombopénie est inconstante et parfois fluctuante, mais certains patients ont une thrombopénie permanente (14) liée à une altération de la mégacaryopoïèse associée, induite par le vWF anormal (15). Le diagnostic est parfois difficile du fait de la profondeur de la thrombopénie et parfois d'une apparente normalité des dosages de vWF en contexte aigu (11).

2.1) Les thrombopénies constitutionnelles

Le groupe de maladies pouvant faire évoquer un PTI et mener à une errance diagnostique voire à un traitement inapproprié des patients est celui des thrombopénies constitutionnelles. Il s'agit d'un groupe hétérogène de maladies caractérisées par une thrombopénie de profondeur variable, causée par une mutation génétique affectant soit la différenciation des précurseurs mégacaryocytaire, soit la maturation des mégacaryocytes ou bien le relargage des pro-plaquettes (16). Avant l'ère du séquençage à haut débit, il n'existait que peu de tests diagnostiques spécifiques pour la plupart de ces pathologies, bien souvent méconnues du fait de leur rareté et dont le diagnostic reposait sur un faisceau d'arguments. Une thrombopénie constitutionnelle doit être suspectée en cas de thrombopénie présente depuis la petite enfance, à fortiori en cas d'antécédent familial de thrombopénie. La présence de signes extra-hématologiques associés doit également alerter le clinicien. L'association d'une thrombopénie à une surdité, une néphropathie, une cataracte, un retard mental, des malformations cardiaques ou bien un déficit immunitaire associé doivent alerter le clinicien. Une anomalie de taille ou de structure des plaquettes doit faire également

suspecter le diagnostic. Des plaquettes de grande taille avec un volume plaquettaire moyen (VPM) élevé ou bien la mise en évidence par l'examen cytologique de plaquettes géantes peuvent se rencontrer de façon caractéristique dans deux entités principalement : le syndrome MYH9 et le syndrome de Bernard-Soulier bi-allélique. A l'inverse, des plaquettes de petite taille, avec un VPM <7 fL, peuvent faire évoquer un syndrome de Wiskott-Aldrich (WAS) ou une thrombopénie liée à l'X (XLT). Les anomalies orthopédiques sont également à rechercher, car pouvant faire évoquer un TAR syndrome (17), un RUSAT (18), ou un syndrome oculo-oto-radial (19).

Enfin, l'absence de réponse aux traitements de première ligne par corticoïdes ou immunoglobulines polyvalentes (IgIV) doivent faire reconsidérer le diagnostic de PTI. Cependant, cet argument peut être mis en défaut par des fluctuations spontanées du taux de plaquettes observées dans certaines thrombopénies constitutionnelles. Dans le WAS, la thrombopénie est en partie liée à une durée de vie raccourcie des plaquettes pathologiques qui sont phagocytées au niveau splénique, expliquant une correction partielle possible de la thrombopénie après splénectomie ou après IgIV (20).

Depuis l'apparition du séquençage haut débit, une quarantaine de gènes ont été décrits comme impliqués dans les thrombopénies constitutionnelles, rendant compte de la grande hétérogénéité phénotypique rencontrée au cours de ces maladies (21). Malgré les progrès considérables ces vingt dernières années dans ce domaine, environ 50% des patients suspects de thrombopénie constitutionnelle n'ont pas de cause génétique clairement identifiée. Même en l'absence de traitement spécifique dans la majorité des cas, la reconnaissance de ces entités demeure essentielle. D'une part parce que certaines d'entre elles s'accompagnent d'un sur-risque d'hémopathies malignes sur le long terme comme dans le FDP/AML (familial platelet disorder with predisposition to acute myeloid leukemia) ou bien dans le cas des mutations de ETV6 ou de l'ANKRD26 dont le dépistage et le diagnostic précoce pourraient avoir un intérêt individuel (22–24). D'autre part, afin d'éviter un traitement inapproprié potentiellement pourvoyeur de morbi-mortalité tel qu'une corticothérapie prolongée, l'usage non justifié d'immunoglobulines polyvalentes, d'immunosuppresseurs ou de gestes invasifs comme la splénectomie.

2.2) les insuffisances médullaires :

Un syndrome myélodysplasique peut se révéler initialement par une thrombopénie isolée dans 10% des cas environ (25,26). C'est pourquoi il est recommandé en France de réaliser un myélogramme systématique devant toute thrombopénie isolée au-delà de 60 ans (9) et en cas de PTI réfractaire aux traitements de première ligne. Cependant cet examen invasif peut être pris en défaut initialement. Les signes de dysmyélopoïèse sont parfois discrets et l'analyse cytologique est opérateur-dépendante (27). Cependant au cours de l'évolution, d'autres cytopénies apparaissent permettant de corriger le diagnostic le plus souvent.

B) Outils disponibles pour le diagnostic différentiel des thrombopénies

1) Généralités

Hormis les critères cliniques, il existe peu d'examens biologiques permettant d'exclure formellement les diagnostics différentiels du PTI.

L'analyse de la numération formule sanguine (NFS) et du frottis sanguin peut parfois donner des arguments pour une cause génétique. En effet, la mesure de la taille des plaquettes est un paramètre important devant une suspicion de thrombopénie constitutionnelle. Plus de la moitié des thrombopénies constitutionnelles présentent des plaquettes de taille augmentée (28) et ont un VPM significativement plus élevé que les PTI (29,30). Cependant, ce paramètre peut être mis en échec car certaines thrombopénies constitutionnelles n'ont pas d'anomalies de taille des plaquettes (20). La recherche d'autres anomalies cytologiques sur le frottis sanguin peut parfois orienter le diagnostic. Par exemple, la présence de corps de Döhle dans les polynucléaires associée à une thrombopénie et des plaquettes de grande taille est quasi-pathognomonique du syndrome MYH9 (31).

La recherche d'anticorps antiplaquettaires, les tests d'agrégation plaquettaire, ou la microscopie électronique pris isolément ne sont pas des tests permettant de séparer efficacement les PTI chroniques des patients avec thrombopénie constitutionnelle (30). Le

dosage de la TPO a été rapporté comme significativement plus bas chez les patients PTI comparé aux patients avec macrothrombopénie constitutionnelle (32). Cependant ce dosage n'est pas réalisé en routine et n'est pas extrapolable à toutes les thrombopénies constitutionnelles.

Le myélogramme avec analyse cytogénétique est un examen permettant de distinguer les insuffisances médullaires des PTI dans la majorité des cas. Cependant l'examen cytologique comprend une part de subjectivité et de variabilité inter-observateur au moment de l'analyse, particulièrement dans le cas des myélodysplasie avec dysplasie uni-lignée, ne permettant pas d'exclure formellement un syndrome myélodysplasique débutant (27). De plus, l'analyse du frottis médullaire ne permet pas de distinguer PTI et thrombopénie constitutionnelle.

Du fait de l'hétérogénéité clinique des patients avec une thrombopénie constitutionnelle, certains auteurs ont proposé un score de probabilité clinique afin d'aider au diagnostic différentiel avec le PTI. Fiore *et al* (30) ont comparé les données cliniques et biologiques, dont des analyses plaquettaires spécialisées de patients PTI et ayant une thrombopénie constitutionnelle afin de d'identifier les caractéristiques permettant de les distinguer. Les auteurs rapportent un score composite comprenant plusieurs items évocateurs de thrombopénie constitutionnelle à savoir l'âge de découverte < 34 ans, une histoire familiale de thrombopénie, une histoire personnelle de syndrome hémorragique, un VPM >11fL, un excès de plaquettes géantes sur le frottis sanguin et un pourcentage élevé de plaquettes de grande taille en microscopie électronique. La présence d'au moins 3 de ces critères chez un patient permettrait d'obtenir une sensibilité de 91%, et une spécificité et VPP à 100% pour le diagnostic de thrombopénie constitutionnelle. Ceci démontre l'intérêt de combiner plusieurs paramètres afin de prendre en compte l'hétérogénéité clinique des deux entités et de cibler les éventuels patients pour lesquels une recherche génétique de thrombopénie constitutionnelle pourrait se justifier.

Enfin, les analyses génétiques par next generation séquencing (NGS) sont des techniques spécialisées, longues et coûteuses. Du fait de ces contraintes et sachant que la fréquence du PTI est plus élevée que celle des thrombopénies constitutionnelles, ces analyses doivent être réalisées uniquement lorsque la suspicion clinique de thrombopénie constitutionnelle est forte. Ainsi, il n'est pas recommandé de réaliser une analyse en NGS des gènes associés aux

thrombopénies constitutionnelles de façon systématique dans le cadre de l'exploration d'une thrombopénie.

Récemment, la mesure de la fraction de plaquettes immatures, une nouvelle technique d'analyse des plaquettes par fluorocytométrie, semble prometteuse pour aider au diagnostic différentiel des thrombopénies.

2) Les plaquettes réticulées ou plaquettes immatures :

Les plaquettes sont des cellules anucléées, dérivant de la fragmentation du cytoplasme des mégacaryocytes médullaires. Elles représentent le dernier stade de la mégacaryopoïèse, qui comprend une phase de prolifération allant de la cellule souche hématopoïétique jusqu'au mégacaryoblaste. Il s'ensuit une phase de maturation caractérisée par la présence d'endomitoses successives. Enfin, son cytoplasme se fragmente au niveau de prolongements cytoplasmiques dans la lumière des capillaires sinusoides médullaires, relarguant dans la circulation des plaquettes matures (Figure 1). Bien que dépourvues de noyau, les plaquettes conservent une certaine activité de synthèse protéique a minima, grâce à de faibles quantités d'ARN et d'ADN encore présentes dans les plaquettes nouvellement formées (33). Le contenu en acide nucléique s'épuise rapidement avec leur vieillissement (34).

Un seul mégacaryocyte génère en moyenne 5000 plaquettes. La production plaquettaire chez le sujet sain est estimée entre 1 à 2 millions de plaquettes par jour. Dans les conditions où les besoins en plaquettes augmentent, la production quotidienne peut être multipliée jusqu'à 10 fois la production de base. Afin de répondre aux besoins les plaquettes sont libérées par les mégacaryocytes à un stade plus précoce, avec une taille augmentée et un contenu plus riche en acides nucléiques. Ces plaquettes sont appelées plaquettes réticulées (par analogie avec les réticulocytes), ou bien plaquettes dites « immatures ». Ainsi, les plaquettes réticulées sont le reflet de la thrombopoïèse médullaire et du turn-over plaquettaire (35,36).

Les plaquettes réticulées furent décrites en 1969 pour la première fois (37). Après coloration par le bleu de méthylène, elles présentaient des condensations ponctuelles, grossières, colorées, semblables à ce qui était observé dans les réticulocytes, suggérant que ces

agrégats étaient constitués d'ARN (figure 1A). Ainsi, le nom de « réticulée » par analogie aux réticulocytes fut retenu.

3) Principe de mesure de l'IPF :

Historiquement, la quantification des plaquettes réticulées était réalisée par cytométrie en flux, avec un marquage fluorescent des plaquettes par le Thiazole Orange (35). Cette technique présente plusieurs inconvénients : elle est consommatrice de temps, nécessite une expertise technique importante et les valeurs de référence ne sont pas standardisées. Plus récemment, les techniques de fluorocytométrie ont permis d'automatiser l'identification des plaquettes réticulées et de standardiser leur mesure. Cette technologie dérive de la cytométrie en flux, où les éléments cellulaires sont marqués spécifiquement par un fluorochrome. Les cellules à étudier passent dans une colonne hydrofocalisée, et sont frappés par un faisceau laser. Des photomultiplicateurs enregistrent simultanément la lumière diffusée (Forward SCattered light ou FSC) estimant la taille de l'élément et la lumière réfractée (Side SCattered light ou SSC) renseignant sur sa structure (figure 1B). Une troisième dimension a été apportée au scattergramme SSC/FSC en ajoutant un fluorochrome fixant spécifiquement les acides nucléiques intra-cellulaires (ADN et ARN). Le fluorochrome excité par le faisceau laser va émettre un faisceau lumineux à une longueur d'onde donnée, appelé SFL (Side Fluorescent Light). L'intensité de cette fluorescence pourra être quantifiée et sera proportionnelle au contenu intracellulaire en acides nucléiques. L'analyse en 3 dimensions du FSC, SSC et SFL permet de distinguer une sous-population particulière de plaquettes immatures, appelées Immature Platelet Fraction (IPF). Ces plaquettes sont identifiées par leur taille supérieure à la moyenne, et le fait de posséder un cytoplasme très riche en acide nucléique (sous population marquée en vert, figure 1). Cette sous-population plaquettaire peut être quantifiée en valeur absolue (IPF#). Le ratio de l'IPF# sur le nombre total de plaquettes définit l'IPF en pourcentage (IPF%). Les valeurs normales d'IPF # et d'IPF% chez le sujet sain dépendent de l'automate utilisé et les intervalles varient selon les études (38). Deux études Coréennes de grand effectif estiment l'intervalle de l'IPF% entre 0,5-3% et 0,3-7,4% (39,40). Une étude sur plus de 1600 sujets sains danois retrouvait des intervalles normaux entre 1,3 et 9% (41). Dans une cohorte britannique de plus de 2300 témoins, l'IPF#

médian était de 10,9 G/L (4,37–23,21 G/L) (42). Les valeurs de l'IPF ne sont pas modifiées par l'âge et le sexe, et ne suivent pas une distribution Gaussienne (42–44).

Actuellement, deux marques d'automates d'hématologie sont capables de mesurer les plaquettes réticulées ou plaquettes immatures : il s'agit des automates de la gamme XE et XN (SYSMEX), et l'automate CELL-DYN Sapphire (ABBOTT).

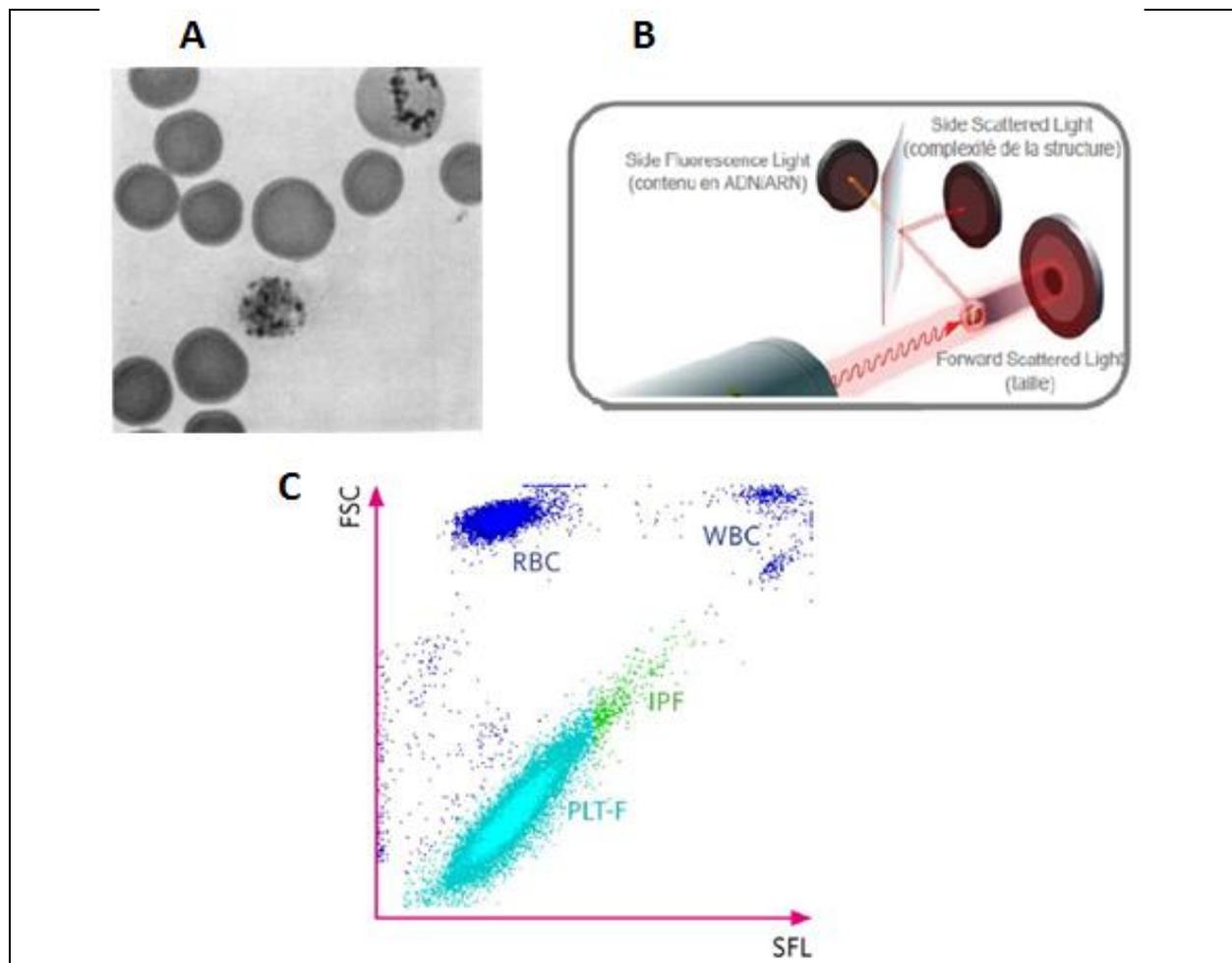


Figure 1: Les plaquettes réticulées et mesure de l'IPF.

A. Plaquette de très grande taille, présentant des grosses granulations diffuses après coloration par le bleu de méthylène, correspondant à une plaquette réticulée. A noter un réticulocyte en haut à droite. Grossissement $\times 1000$. D'après Igram *et al.* (16). **B.** Représentation schématique du principe de la fluorocytométrie. **C.** Scattergramme des automates de la gamme XN (Sysmex) permettant isoler la fraction immature des plaquettes (IPF), en vert. FSC: Forward scattered light; SSC: Side scattered light; SFL: Side fluorescent light; RBC: red blood cells; WBC: white blood cells

4) Apport de l'IPF dans le diagnostic différentiel des thrombopénies.

Plusieurs travaux ont rapporté que l'IPF% pouvait être un outil intéressant pour distinguer les thrombopénies centrales ou périphériques. Plusieurs équipes ont étudié l'IPF au cours de diverses causes de thrombopénie (32,43–48). L'IPF était significativement augmenté en cas de thrombopénie d'origine périphérique (par consommation) et particulièrement au cours du PTI. D'autres équipes confirment ces données dans une population pédiatrique (49–51). Les performances diagnostiques de l'IPF pour distinguer thrombopénie centrale ou périphérique sont globalement bonnes et superposables selon les études. La valeur de l'AUC (aire sous la courbe) des courbes ROC (receiver operating characteristics) varie entre 0,71 et 0,95 selon les études (39,43,46–48). Li *et al* retrouvent avec un seuil d'IPF% à 5,05% une sensibilité de 93% et une spécificité de 82% pour distinguer thrombopénie liée à une insuffisance de production versus excès de destruction (43), tandis que Abe *et al* avec un seuil à 7,7% ont une sensibilité à 86,8% et une spécificité à 92,6%. Chez l'enfant, Adly *et al* retrouvent pour un seuil d'IPF% supérieur à 9,4% une sensibilité de 88% et une spécificité de 85,7% pour distinguer PTI et thrombopénie chimio-induite (49). De la même façon Mc Donnell *et al* avec un seuil à 5,2% trouvent une sensibilité de 93% et une spécificité de 91% pour distinguer PTI et insuffisance médullaire.

Les patients ayant une thrombopénie chimio-induite ont des valeurs d'IPF% comparables aux sujets sains, mais lors de la phase de régénération médullaire ces patients peuvent avoir transitoirement un IPF augmenté par rapport aux sujets normaux et qui précède la remontée de la numération plaquettaire de 2 à 3 jours (52). Cet indicateur simple pourrait permettre d'éviter des transfusions plaquettaires inutiles en onco-hématologie (38).

L'IPF pourrait également aider à estimer la taille des plaquettes. La taille des plaquettes est un élément important dans le diagnostic différentiel d'une thrombopénie et peut être évaluée de deux façon :

- soit par la mesure automatique du VPM par l'automate. Cependant en cas de forte anisocytose l'automate n'est parfois pas capable de rendre un chiffre fiable. De plus, le VPM présente une variabilité significative selon le type d'automate utilisé, ce qui rend la comparaison difficile entre les différents laboratoires (53).

- Soit par estimation de la taille des plaquettes en micromètres sur le frottis sanguin. Cette technique manuelle présente des inconvénients car elle est consommatrice de temps, non standardisée et nécessite un opérateur entraîné. Il existe une corrélation démontrée entre la taille des plaquettes et la valeur de l'IPF% (54,55). Ainsi l'IPF obtenue de façon automatisée et reproductible peut être un reflet de la taille plaquettaire et potentiellement utile dans le diagnostic différentiel des thrombopénies.

L'IPF a été évalué au cours des thrombopénies constitutionnelles dans 3 études publiées (32,54,56). Il a été montré dans deux d'entre elles que l'IPF% est significativement plus haut chez les patients avec macrothrombopénie constitutionnelle comparé aux patients PTI, liée très probablement à la plus grande taille des plaquettes (32,54). Ces résultats sont similaires avec la mesure de l'IPF#. En fixant un seuil arbitraire à 17,4%, l'IPF% permettrait de distinguer les PTI des macrothrombopénies constitutionnelle avec une sensibilité de 70% et une spécificité de 90% pour Ferreira *et al* (32).

5) L'IPF au cours du PTI

Au cours du PTI la valeur de l'IPF% semble corrélée à la profondeur de la thrombopénie. De façon intéressante, il existe une corrélation inverse entre la numération plaquettaire et la valeur de l'IPF% (32,45,47,49), *i.e* plus les patients sont thrombopéniques et plus la valeur de l'IPF% est élevée. Cette corrélation entre numération plaquettaire et IPF% se retrouve également chez des sujets sains non thrombopéniques, mais aussi chez les patients avec macrothrombopénie constitutionnelle (32,43,47). Les patients PTI en poussée avaient les valeurs d'IPF les plus élevées, alors que les patients PTI en rémission avaient en revanche un IPF normal, ou discrètement augmenté (44,45,49).

Les hémorragies sont l'une des principales causes de morbi-mortalité au cours du PTI (6). Les événements hémorragiques graves sont heureusement rares (57). Le risque hémorragique est principalement lié à la profondeur de la thrombopénie (58–60) ce qui a été récemment confirmé dans une étude rétrospective française (3). Toutefois, il n'existe pas une stricte corrélation entre la numération plaquettaire et le risque d'événements hémorragiques

graves (61) comme le suggère deux séries de cas d'hémorragies sévères intracrâniennes rapportant des accidents hémorragiques avec une numération plaquettaire supérieure à 30 G/L (62,63). Par ailleurs, à taux de plaquettes équivalent, les patients présentent une hétérogénéité clinique : certains patients ont un syndrome hémorragie cutanéomuqueux marqué et d'autres quasiment aucun symptôme. Il existe peu de facteurs prédictifs de complications hémorragiques graves décrits dans la littérature, hormis la thrombopénie profonde, la présence d'un traitement anticoagulant et la présence de signes hémorragiques mineurs préalables (57). Sachant que les patients ayant un PTI ont un IPF significativement plus élevé et qu'il existe plusieurs arguments suggérant que les plaquettes immatures ont une efficacité hémostatique supérieure (64–68), l'hypothèse du rôle protecteur des plaquettes immatures sur le risque hémorragique a donc été suggéré. De plus, dans le cas des thrombopénies liées aux hémopathies malignes, l'IPF# était un facteur prédictif d'événements hémorragiques, indépendamment du taux de plaquettes (69). Plusieurs travaux ont évalué la corrélation entre la valeur de l'IPF et le risque hémorragique au cours du PTI (50,60,70). Deux études tendent à montrer qu'un IPF# ou IPF% haut est associé à un score hémorragique faible chez l'adulte et l'enfant, tandis qu'une troisième étude pédiatrique montre à l'inverse une corrélation entre score hémorragique élevé et IPF% élevé. Même si un IPF élevé semble associé à un moindre risque hémorragique, du fait de ces données contradictoires et des faibles effectifs de patients avec hémorragie sévère liée à la population majoritairement ambulatoire dans ces études, il n'est actuellement pas possible de conclure formellement sur l'utilité de l'IPF comme facteur prédictif d'hémorragies au cours du PTI (50,60,70).

Récemment, des travaux ont mis en évidence grâce à la cytométrie en flux le rôle clé de la glycosylation et de l'acide sialique dans les mécanismes de clairance plaquettaire normale, ainsi qu'un nouveau mécanisme physiopathologique au cours du PTI.

C) L'acide sialique et les phénomènes de sialylation :

1) Définitions

Le phénomène de sialylation est défini par l'ajout d'acide sialique sur des chaînes glycosidiques exprimées à la surface des cellules eucaryotes et procaryotes. Le terme « acide sialique » (du grec τὸ σίαλον, *to sialon*, désignant la salive) est un terme générique désignant une famille de composés glucidiques. Il fut décrit pour la première fois en 1936 par Gunnar Blix, un physiologiste Suédois travaillant sur la composition des mucines issues des glandes salivaires bovines (71). Celui-ci rapporta au cours de ses travaux la présence d'une fraction cristalline insoluble obtenue à partir de la salive de bovin (figure 2). L'analyse cristallographique de ces composés permis de décrire la structure des acides sialiques.

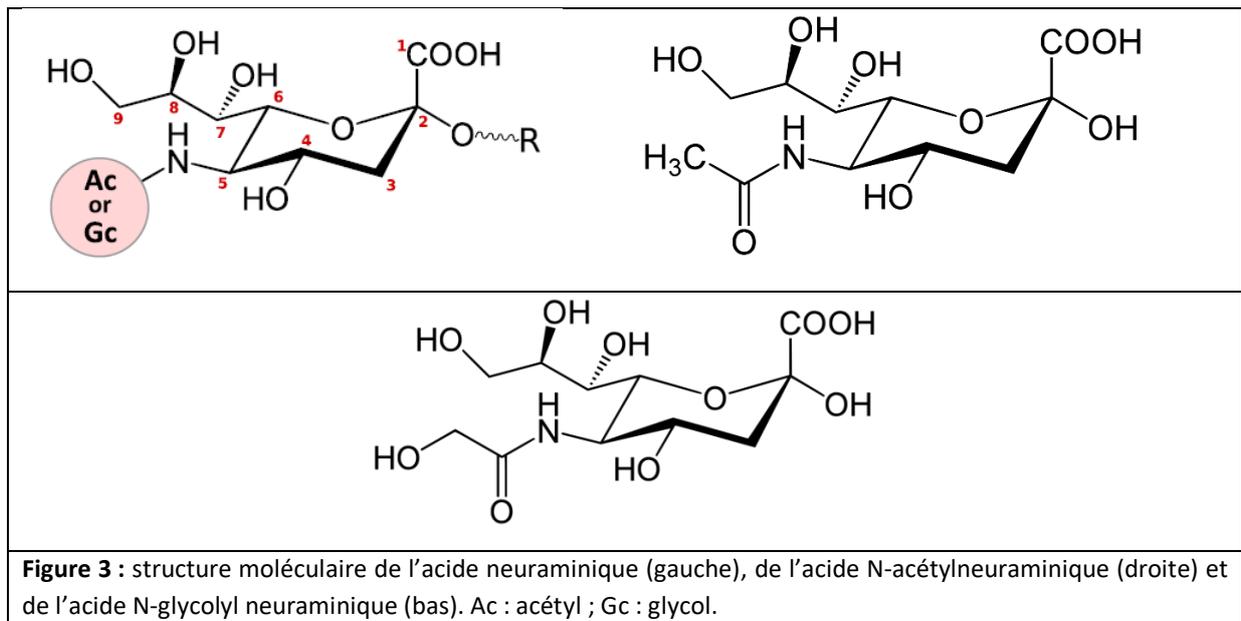


Figure 2 : Cristaux d'acide sialique isolés à partir de salive bovine par Blix en 1936. D'après Lundblad A, Upsala Journal of Medical Sciences 2015.

La structure de base commune des acides sialiques est l'acide neuraminique : c'est un dérivé de cétose à neuf atomes de carbone (figure 3). Il n'existe pas en tant que tel dans le milieu naturel car ses groupements amine et hydroxyl sont substitués par divers composants. Le groupe amine peut porter un groupe acétyle (Ac) ou glycol (Gc), tandis que plusieurs O-substitutions ont été décrites au niveau du carbone 4, 7, 8, et 9 avec de multiples substitués (acétyle, lactyle, méthyle, sulfate et phosphate). Cette combinatoire importante rend compte de l'importante diversité des acides sialiques comprenant plus de 50 dérivés

actuellement décrits. Chez les animaux, les molécules d'acide sialique sont fixées à l'extrémité distale des chaînes de glycanes associées soit à des protéines (glycoprotéines) soit à des lipides (gangliosides). Ils sont transférés en bout de chaîne glucidique essentiellement sur des résidus galactose ou N acétyl-galactosamine de façon enzymatique par des sialyltransférases. Plusieurs types de liaisons osidiques entre l'acide sialique et son glucide porteur sont possibles, en fonction du carbone concerné par la liaison (par exemple α 2-3, α 2-6, α 2-8). La variabilité des liaisons de l'acide sialique avec les sucres sous-jacents confère un niveau de diversité supplémentaire à la famille des acides sialiques. En effet, il existe une spécificité ligand-récepteur en fonction du type d'acide sialique exprimé, mais également en fonction du type de liaison osidique utilisée. A l'inverse, les acides sialiques peuvent être clivés de leur glycanes porteur par des sialidases, aussi appelées neuraminidases. Chez les mammifères, il existe 4 isoformes de neuraminidases (Neu-1 à Neu-4), ayant des localisations cellulaires et des spécificités différentes vis-à-vis de certaines liaisons osidiques (72,73).

Les deux acides sialiques majoritaires chez les mammifères sont l'acide N-acétylneuraminique (Neu5Ac) et l'acide N-glycolyl neuraminique (Neu5Gc) (figure 3), qui diffèrent par un seul atome d'oxygène qui est ajouté de façon irréversible par une enzyme appelée cytidine monophospho-acide N-acetyl neuraminique hydroxylase (CMAH). Cette enzyme permet de transformer le Neu5Ac en Neu5Gc. Chez la plupart des mammifères, l'acide sialique tissulaire le plus abondant est le Neu5Gc, sauf chez l'homme où la perte d'expression de la CMAH liée à une délétion inactivatrice survenue il y a environ 2 millions d'années ne permet pas la synthèse du Neu5Gc. L'acide sialique majoritaire dans les tissus humains et donc le Neu5Ac (74).



L'acide sialique a plusieurs fonctions physiologiques essentielles, qui peuvent être résumées en trois grandes catégories :

2.1) Solubilisation des molécules et enveloppe protectrice cellulaire :

Les acides sialiques portent par leur composition beaucoup de charges négatives. Cette propriété permet d'augmenter la solubilité des protéines et des complexes macromoléculaires dans les liquides biologiques comme le plasma humain (75). L'acide sialique est également le principal constituant du glycocalyx. Cette couche glucidique recouvrant les cellules humaines à une fonction protectrice et une fonction de senseur de l'environnement extérieur, ce qui en fait un élément clé dans les mécanismes d'interaction cellule-cellule et dans la signalisation cellulaire. Les glycanes sialylés sont également un élément fondamental dans la composition du mucus sécrété par les épithéliums (76).

Enfin, le glycocalyx participe à la différence de potentiel transmembranaire, par l'accumulation de charges négatives sur le versant extra-cellulaire liées à la grande quantité d'acide sialique (77).

2.2) Rôle de l'acide sialique comme ligand :

L'acide sialique peut aussi agir en tant que ligand pour certains récepteurs spécifiques constituant la famille des lectines et jouer un rôle clé dans la régulation du système immunitaire. Les lectines (du latin *legere*, « sélectionner ») appartiennent à une grande famille de récepteurs reconnaissant spécifiquement certaines structures osidiques, dont l'acide sialique. Elles sont parfois appelées « hémagglutinines », car elles possèdent la capacité d'agglutiner *in vitro* les globules rouges fortement glycosylés. Parmi les lectines, il existe des récepteurs appelé Siglecs (sialic acid binding immunoglobulin-like lectins) qui reconnaissent spécifiquement les acides sialiques via leur domaine Ig (superfamille des immunoglobulines). Ils peuvent lier l'acide sialique soit sous forme *cis*, c'est-à-dire ceux exprimés à la surface de la cellule elle-même, ou bien de façon *trans*, c'est-à-dire les acides sialiques exprimés par une autre cellule. Par cette double fonction de ligand au sein d'une même cellule et au cours des interactions inter-cellulaires, l'acide sialique a un rôle essentiel dans la régulation du système immunitaire innée et adaptatif. Par exemple le rôle des Siglecs et de l'acide sialique a été particulièrement bien étudié dans la régulation de l'activation des lymphocytes B, via le récepteur CD22 (78). CD22 reconnaît spécifiquement le Neu5Ac et a une fonction inhibitrice sur le BCR lui conférant un rôle essentiel dans les mécanismes de tolérance périphérique (78–80).

L'acide sialique a également un rôle majeur dans la reconnaissance du « soi ». La plupart des pathogènes n'ont pas d'expression d'acide sialique à leur surface, à l'inverse des cellules humaines qui en expriment de forte quantité de façon constitutive. Il a été suggéré que l'acide sialique fixé à l'extrémité des glycanes pourrait être reconnu comme un SAMPs (self-associated molecular patterns) par les récepteurs Siglecs permettant une reconnaissance des cellules du « soi » et jouer un rôle clé dans les mécanismes de tolérance (81). Pour conforter cette hypothèse, de nombreux pathogènes ont développé des mécanismes d'échappement au système immunitaire en utilisant l'acide sialique (82).

La forte densité en acide sialique protège également les cellules humaines de l'action lytique du complément. Le C3b libéré par l'activation permanente de la voie alterne du complément

est capable de se fixer par une liaison covalente forte aux membranes cellulaires (83). L'expression de grandes quantités d'acide sialique et de glycoaminoglycane permet la fixation à la surface du principal inhibiteur de la voie alterne du complément, représenté par le facteur H. Celui-ci se lie aux acides sialiques et inhibe la voie alterne d'une part en dissociant le complexe C3bBb et d'autre part en servant de cofacteur au facteur I qui inactive le C3b (84). A l'inverse, le système du complément peut s'activer et s'auto-amplifier sur les surfaces hyposialylées des pathogènes conduisant à leur destruction rapide.

En plus de son rôle de ligand des Siglecs, l'acide sialique entre dans la composition du motif glucidique nommé sialyl Lewis^x (CD15s). Ce tétra-saccharide composé d'acide sialique, de fucose et de N-acétyl-lactosamine est habituellement attaché aux glycanes membranaires où il joue un rôle clé dans la reconnaissance inter-cellulaire. Tout d'abord le sialyl Lewis^x est exprimé à la surface des globules rouges et constitue l'un des groupes sanguins majeurs chez l'homme. De plus, il s'agit du ligand des sélectines, une famille de récepteurs transmembranaires impliqués dans l'adhésion cellulaire. Les sélectines en reconnaissant les motifs sialyl Lewis^x permettent entre autres aux leucocytes de réaliser le phénomène de rolling, de se fixer à l'endothélium et de réaliser la transcytose pour migrer dans les tissus (85). Enfin, le sialyl Lewis^x joue un rôle clé dans la reproduction : l'ovocyte est enveloppé d'une matrice protéo-glucidique appelée *zona pellucida* fortement glycosylée et riche en séquences sialyl Lewis^x à l'extrémité des glycanes. Ces séquences sont reconnues par des lectines présentes à la surface des spermatozoïdes leur permettant de reconnaître, de se fixer, et de traverser la *zona pellucida* pour féconder l'ovocyte (86).

2.3) Rôle de masquage d'autres glycanes :

L'acide sialique a également une fonction de masquage des ligands glucidiques sous-jacents auxquels il est lié. La plupart du temps l'acide sialique est lié à un résidu galactose (Gal) ou N acétyl-galactosamine (N-GalNAc) et il empêche la fixation de ces sucres à certains récepteurs spécifiques des protéines désialylées (R-ASGP ou récepteurs aux asialoglycoprotéines). Le plus connu et le plus décrit de ces récepteurs est l'AMR (Ashwell Morell receptor), du nom des deux scientifiques Nord-Américains l'ayant identifié en 1974 à partir d'hépatocytes de rat (Gilbert Ashwell et Anatol Morell) (87). Chez l'homme, il est

exprimé essentiellement à la surface de la membrane baso-latérale (sinusoïdale) des hépatocytes (88). En revanche, il ne semble pas être exprimé par les cellules de Kupffer (89).

Le récepteur AMR est un récepteur transmembranaire homo ou hétéro-oligomérique comprenant 2 sous unités : asialoglycoprotéine-1 (asgr-1) et asialoglycoprotéine-2 (asgr-2). Il appartient à la famille des lectines et reconnaît les résidus galactose rendu accessibles sur les chaînes de glycanes par la perte des acides sialiques. Il a été démontré que ce récepteur situé sur la face vasculaire de l'hépatocyte était impliqué dans la clairance de protéines plasmatiques désialylées comme la phosphatase alcaline, la gamma-glutamine transférase, des protéines de la coagulation (tPA, fibrinogène, facteur Willebrand) ou encore la fraction Fc désialylée des IgA ou des IgG après formation des complexes immuns (88). Par ailleurs, il a été suggéré que ce récepteur était également impliqué dans la clairance des cellules sanguines circulantes. Les globules rouges humains sont des cellules fortement glycosylées à leur surface et exprimant de grandes quantités d'acide sialique. Au cours du vieillissement normal du globule rouge il a été démontré une perte de 10 à 20% de la quantité totale d'acide sialique (90). La désialylation progressive de leur membrane avec le temps serait un marqueur de sénescence. L'exposition des résidus galactose par perte de l'acide sialique sur la glycophorine des globules rouges sénescents permettrait leur élimination de la circulation par phagocytose au niveau du foie et de la rate (91,92). De plus, la perte des charges négatives de surface liée à la diminution de l'acide sialique a également des conséquences fonctionnelles et morphologiques (93–95) favorisant ainsi leur élimination dans le système réticuloendothélial (96). La désialylation serait donc l'un des mécanismes de l'érythrophagocytose physiologique (97).

L'acide sialique a également un rôle dans les mécanismes de clairance des cellules apoptotiques. Au cours de l'apoptose, la cellule exprime à sa surface de grandes quantités de galactose rendu accessibles par la désialylation des glycoprotéines de surface (98,99). Cette désialylation est due à une activation de la sialidase Neu-1 membranaire activée de façon caspase 3-dépendante. Parallèlement, les glycoprotéines exprimant de grandes quantités de mannose présentes sur la face interne de la membrane du réticulum endoplasmique sont exprimées à la surface de la cellule et des corps apoptotiques. Ce profil glucidique de surface particulier riche en galactose et en mannose correspond à un signal

« eat me », permettant la reconnaissance des cellules en apoptose par les macrophages et favorisent leur phagocytose (100).

D) Le rôle clé de l'acide sialique dans la régulation de la clairance des plaquettes :

De la même façon que pour les globules rouges, plusieurs travaux récents ont mis en évidence un rôle clé de l'acide sialique dans la régulation de la clairance des plaquettes à l'état physiologique et au cours de différents états pathologiques.

1) Glycosylation des plaquettes :

Les plaquettes sont des cellules fortement glycosylées. Quatre-vingt pourcent (80%) de l'acide sialique de surface est lié au complexe membranaire GPIb-IX-V, dont les deux tiers uniquement par la sous unité GPIb α (101,102).

Le complexe GPIb-IX-V (CD42) est un complexe protéique transmembranaire spécifique des plaquettes et des mégacaryocytes. Il comprend le complexe GPIb-IX qui est un hétérotétramère constitué de 4 sous unités : la GPIb α , deux sous unités GPIb β et la GPIX (figure 4), auxquels s'associe la GPV via des liaisons faibles au niveau de leurs domaines transmembranaires. Le complexe GPIb-IX-V joue un rôle clé dans la fonction hémostatique des plaquettes car il peut lier le vWF au cours d'une lésion vasculaire et déclencher l'activation plaquettaire et leur agrégation (103).

La GPIb α est la sous unité principale de ce complexe, car sa portion N-terminal correspond au récepteur pour le vWF. Son domaine extracellulaire comprend trois portions : une portion LBD (ligand bonding domain) N-terminale de liaison au vWF N-glycosylée et recouverte d'acide sialique ; une portion comprenant une structure similaire aux mucines, fortement O-glycosylées comprenant de nombreuses séquences glucidiques répétées se terminant par des acides sialiques. Cette structure souple donne une certaine mobilité à la portion N-terminale sus-jacente ; enfin une portion stable proche de la membrane plasmique appelée MSD (mechanosensory domain), ayant une fonction de mécanorécepteur (104). Lors d'une brèche vasculaire, le vWF expose ses sites de liaisons au domaine LBD de la GPIb α . Après sa

fixation sur la GPIIb/IIIa, le vWF déclenche par effet de traction un dépliement du domaine MSD juxta-membranaire. Le dépliement de ce domaine entraîne un changement de conformation des sous unités GPIIb/IIIa et GPIIb/IIIa adjacentes et déclenche un signal d'activation intra-cellulaire (104,105). L'activation plaquettaire se manifeste entre autres par la libération des granules intracellulaires, qui peut être mise en évidence par la détection de la P sélectine membranaire, habituellement localisée dans les granules α . L'excrétion du contenu granulaire libère également des neuraminidases, qui désialyent des glycoprotéines à la surface des plaquettes activées. La désialylation des O-glycanes de la GPIIb/IIIa peut également conduire à son changement de conformation et à l'activation plaquettaire, indépendamment de la fixation du vWF (106). Ainsi, la libération des neuraminidases par les plaquettes activées pourrait participer à la propagation du caillot, en activant les plaquettes adjacentes non liées au vWF.

2) Lien entre glycosylation et durée de vie des plaquettes :

Le rôle clé de l'acide sialique dans la durée de vie des plaquettes est fortement suspecté depuis les années 70 : Greenberg *et al* démontrent en 1975 que le clivage enzymatique des acides sialiques plaquettaires par la neuraminidase diminue fortement leur durée de vie après transfusion (107). En 1982, une équipe Nord-Américaine démontre que les plaquettes se désialyent spontanément *in vitro* et que cette désialylation peut être bloquée par l'ajout de substrats de la neuraminidase en excès, suggérant l'implication de cette enzyme dans ce mécanisme (108). Ainsi dans les années 90, il a été proposé que cette désialylation *in vitro* pouvait se produire *in vivo*, exposant des « auto-antigènes » à la surface et participant à la clairance plaquettaire au niveau du système réticulo-endothélial (109).

3) Apport des travaux sur le stockage des plaquettes au froid :

L'implication de l'acide sialique dans la clairance des plaquettes a surtout été mise en lumière par les travaux sur le stockage des plaquettes avant transfusion. Contrairement à toutes les autres cellules et organes humains utilisés en transfusion ou transplantation, il est

connu de longue date que les plaquettes ne peuvent pas se conserver à basse température (110). Leur conservation, même brève, au froid réduit considérablement leur durée de vie une fois transfusée. De ce fait, les plaquettes sont actuellement conservées à température ambiante (+22°C), limitant fortement leur durée de conservation. Initialement cette durée de vie raccourcie était attribuée à la perte de la forme discoïde des plaquettes induite par le froid. Ces plaquettes de forme irrégulière seraient ainsi piégées et détruites dans la microcirculation. Cependant, il a été démontré que les plaquettes de forme discoïde normale exposées au froid avaient une durée de vie raccourcie et que les plaquettes de forme irrégulière pouvaient circuler avec une durée de vie normale (111,112). Par la suite, le rôle de la GPIb α et des glycanes dans ce mécanisme fut mis en évidence et notamment que le froid pouvait induire l'agglutination irréversible des GPIb α à la surface des plaquettes (111). Cette agglutination de GPIb α peut d'une part déclencher l'apoptose des plaquettes (113) et d'autre part déclencher leur phagocytose par les macrophages spléniques (114). En effet, Hoffmeister *et al* ont démontré en 2003 que l'agglutination de GPIb α à la surface des plaquettes induite par le froid pouvait être reconnue par l'intégrine α M β 2 (CD18/CD11b) des macrophages hépatiques (cellules de Kupffer) et déclencher leur phagocytose (111). La même équipe a ensuite montré que cette clairance des plaquettes exposées au froid est liée à l'interaction entre les résidus β -GlcNAc situés sur les agrégats de GPIb α et l'intégrine α M β 2 des macrophages (114). Ainsi, ils confirment l'hypothèse émise dans les années 80 que la perte des acides sialiques plaquettaires exposant ainsi les β -GlcNAc, peut participer à la clairance des plaquettes en cas de conservation au froid mais aussi dans un contexte physiologique. Dans le cas des plaquettes stockées au froid, la désialylation de la GPIb α est liée à l'action de la neuraminidase Neu-1 présente à l'état basal dans les granules plaquettaires. Lors de l'exposition au froid Neu-1 est libéré à la surface des plaquettes et exerce son activité sialidase lors du réchauffement (115). L'ajout d'un inhibiteur de Neu-1, l'acide N-Acétyl-2,3-déhydro-2-désoxyneuraminique (DANA) aux plaquettes stockées au froid permet de restaurer leur durée de vie et leur rendement après transfusion chez la souris en inhibant leur désialylation. Cependant, l'intérêt de l'ajout de DANA dans les poches de concentrés plaquettaires humains n'a pas été évalué.

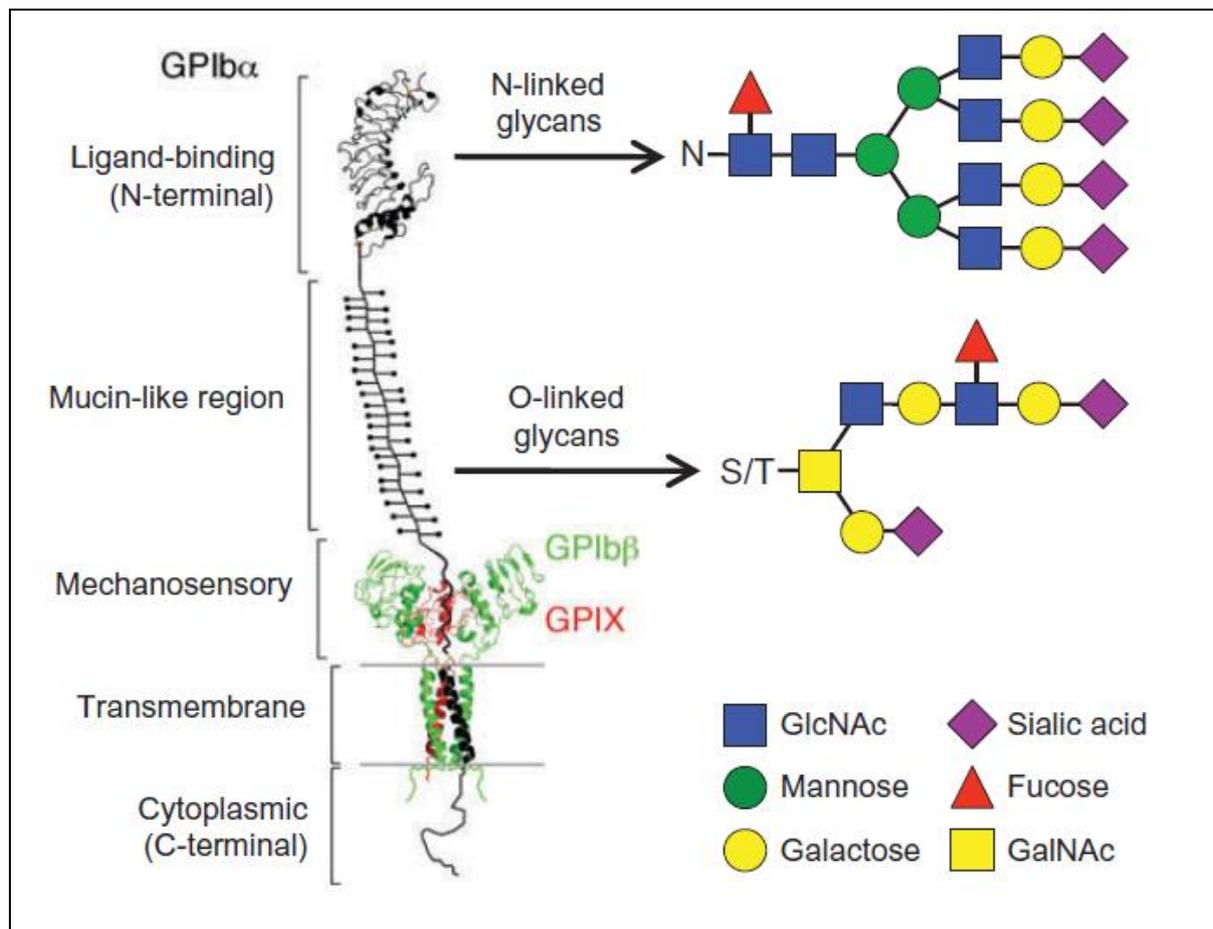


Figure 4 : Représentation schématique du complexe GPIb-IX (d'après Li.R *et al*, Platelets 2016). Le complexe GPIb-IX est un hétérotétramère constitué de 4 sous unités : la GPIb α , deux sous unités GPIb β et la GPIX. Le domaine extracellulaire de la GPIb α comprend trois portions : une portion N-terminale de liaison au vWF (« Ligand-binding ») ; une portion comprenant une structure similaires aux mucines (« mucin-like region ») ; et une portion stable, agissant comme un mécanorécepteur (« Mechanosensory »). La portion « Ligand-binding » de la GPIb α et le domaine extracellulaire de la GPIb β et GPIX sont recouverts par des glycanes liés par des liaisons N-glycosyl (oligosaccharides liés à un atome d'azote issus de résidus asparagine (N)). La portion « mucin-like region » de la GPIb α est fortement glycosylée. Elle est recouverte par des glycanes liés par des liaisons O-glycosyl (oligosaccharides liés à un atome d'oxygène issus de résidus sérine ou thréonine (S/T)). GlcNAc : N-acétylglucosamine ; GalNAc : N-acétylgalactosamine.

Dans un modèle murin, l'adjonction d'UDP-galactose (UDP-Gal) aux concentrés plaquettaires stockés 2 heures au froid a permis une galactosylation enzymatique de la GPIb α et un masquage des résidus β -GlcNAc qui ont été rendus visibles après désialylation induite par le froid. Ce procédé a permis d'améliorer significativement la durée de vie des plaquettes transfusées malgré leur conservation au froid sans altérer leur capacités fonctionnelles (116). Malheureusement, lors d'un stockage plus prolongé au froid (48 heures ou plus), ces résultats encourageants n'ont pas été confirmés chez l'homme comme chez la souris avec

une durée de vie très courte des plaquettes transfusées malgré la supplémentation en UDP-Gal (117).

Dans un modèle de souris déficiente pour l'intégrine $\alpha M\beta 2$, il n'a pas été montré d'augmentation significative de la durée de vie des plaquettes transfusées après exposition au froid, suggérant que lors d'une exposition prolongée au froid, la reconnaissance des résidus β -GlcNAc par l'intégrine $\alpha M\beta 2$ des macrophages n'est pas le seul mécanisme impliqué dans la clairance rapide des plaquettes et qu'un autre couple ligand-récepteur intervient.

4) Le rôle clé du Ashwell-Morell receptor dans la clairance des plaquettes désialylées et la régulation de la synthèse de TPO :

Quelques années plus tard, il a été clairement établi que l'activation des plaquettes au cours du sepsis, lors du stockage au froid prolongé, au cours de certains Willebrand de type 2B ou bien chez la souris déficiente pour la sialyl-transférase ST3Gal-IV la perte des acides sialiques à la surface des plaquettes permet l'exposition de résidus galactose sur la GPIb α (104,118–121). Ces résidus galactose sont reconnus par le récepteur AMR des hépatocytes, qui phagocytent les plaquettes désialylées (118–120). Ce récepteur de type lectine connu depuis les années 1970 semble jouer un rôle clé dans l'élimination des plaquettes désialylées. En effet, les plaquettes stockées au froid 48 heures et transfusées chez des souris déficientes pour l'une des sous-unités de l'AMR (Asgr-1 ou 2) ont une durée de vie comparable aux plaquettes stockées à température ambiante et transfusées chez des souris sauvages (119). De la même façon, la durée de vie après transfusion des plaquettes désialylées issues de souris déficientes pour ST3Gal-IV est restaurée par l'injection d'asialofetueine, un inhibiteur compétitif de l'AMR (118).

Les travaux de Grozovsky *et al* en 2015 mettent en lumière l'implication essentielle de l'acide sialique et du récepteur AMR dans la clairance plaquettaire et la régulation du taux de plaquettes (122). Ils démontrent *in vivo* chez la souris et *in vitro* que les plaquettes par leur désialylation progressive au cours du temps exposent des résidus galactose à leur surface. Ces résidus galactose sont reconnus par le récepteur AMR à la surface des hépatocytes,

conduisant à la destruction des plaquettes et à la stimulation de la synthèse de thrombopoïétine (TPO), via l'activation de la voie de signalisation JAK2/STAT3 (figure 5). La sécrétion de TPO par le foie induite par la destruction plaquettaire réalise une boucle de rétrocontrôle positive en stimulant la mégacaryopoïèse médullaire, participant ainsi au maintien d'un taux constant de plaquettes circulantes. Ces travaux confirment l'existence et précisent le fonctionnement d'un mécanisme de régulation physiologique de la clairance plaquettaire médiée par leur état de sialylation.

De plus, ces données apportent une preuve supplémentaire que la régulation de la thrombopoïèse par la TPO est un mécanisme finement régulé.

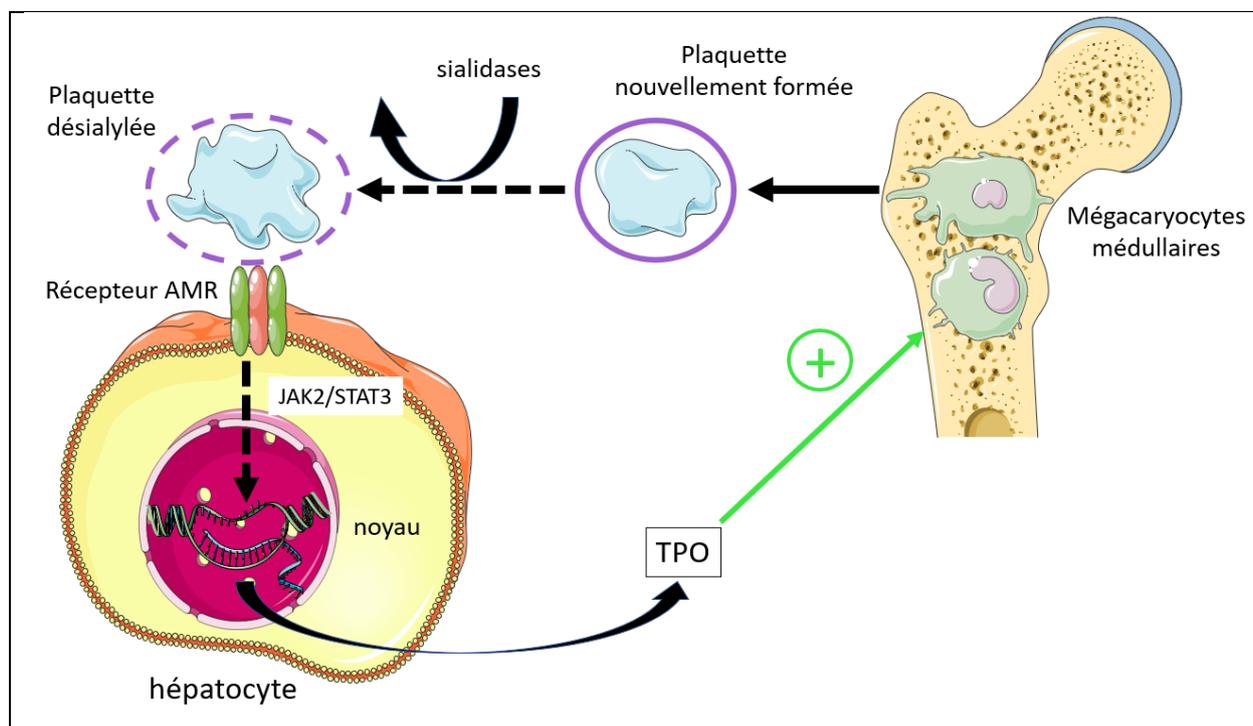


Figure 5 : représentation schématique de la synthèse de TPO induite par l'activation de la voie JAK2/STAT3 après reconnaissance des plaquettes désialylées par le récepteur AMR.

Les plaquettes circulantes perdent progressivement leurs résidus d'acide sialique de surface au cours du temps sous l'effet de sialidases. Les plaquettes désialylées sont reconnues par le récepteur AMR hépatocytaire, ce qui stimule la production d'ARNm de la TPO, via l'activation de la voie de signalisation JAK2/STAT3. La synthèse et la sécrétion de TPO par le foie stimule la production médullaire de plaquettes en agissant sur les mégacaryocytes.

TPO: thrombopoïétine ; AMR : Ashwell Morell receptor; JAK2: Janus kinase 2 ; STAT3: signal transducers and activators of transcription 3.

La thrombopoïétine (TPO) est un facteur de croissance mégacaryocytaire essentiellement synthétisé par le foie. En se fixant sur son récepteur myeloproliférative leukemia protein (MPL), elle stimule la prolifération et la survie des cellules souches hématopoïétiques et la différenciation mégacaryocytaire. L'hypothèse initiale suggérait que sa synthèse était constitutive et que les taux de TPO circulants étaient régulés passivement par la quantité de plaquettes et de mégacaryocytes, exprimant MPL. La fixation de la TPO sur son récepteur entraînant son internalisation et sa dégradation, il existe une corrélation inverse entre le taux de plaquettes circulantes et la quantité de TPO disponible (123–125). Cependant, la mise en évidence d'une stimulation de la synthèse hépatique de TPO par l'IL6 dans les états inflammatoires suggérait que la production de TPO pouvait être inductible (126). De plus, ce modèle n'expliquait pas des taux de TPO discordants en regard de la numération plaquettaire dans certaines situations pathologiques. Ainsi au cours du PTI, les taux de TPO sont normaux ou peu augmentés malgré une thrombopénie souvent profonde (127,128). A l'inverse, au cours de la thrombocytémie essentielle les taux de TPO sont paradoxalement élevés (129,130). Le modèle de régulation de la TPO via l'axe AMR-JAK2/STAT3 actuellement proposé permet d'apporter une explication physiopathologique à ces situations particulières (122).

E) La désialylation plaquettaire au cours du PTI :

1) Rôle clé des auto-anticorps dans la physiopathologie du PTI :

La physiopathologie du PTI est complexe, faisant intervenir une destruction accrue des plaquettes par des auto-anticorps ou des lymphocytes T auto-réactifs, mais également un défaut de production plaquettaire au niveau médullaire (131). Les auto-anticorps anti-plaquettes sont détectés chez un patient sur deux environ avec les techniques d'immunocapture directes (132). Lorsqu'ils sont mis en évidence, ils sont dirigés contre la GPIIb/IIIa dans 70-80% des cas et contre la GPIb/IX dans 20-30% cas. Le rôle pathogène des auto-anticorps anti-plaquettes est clairement démontré chez l'homme comme chez la souris

(1,133). Il est admis que leur fixation à la surface des plaquettes induit leur phagocytose par les macrophages spléniques de façon Fc-dépendante permettant la présentation des antigènes plaquettaires aux cellules B auto-réactives et réalisant un cercle vicieux auto-entretenu (134). Ceci explique le fort taux de réponse des patients à la splénectomie et aux traitements de première ligne comme IgIV. Dans le premier cas cela supprime le principal site de destruction plaquettaire et le site du priming des cellules autoréactives et dans l'autre cas le blocage ou la modification des FcγR macrophagiques permet de bloquer transitoirement la phagocytose plaquettaire splénique. Néanmoins, certains patients demeurent réfractaires à toutes ces thérapeutiques. Actuellement il n'existe pas de facteur pronostique permettant de prédire la réponse thérapeutique. Néanmoins, il a été rapporté que les patients réfractaires à la splénectomie avaient plus fréquemment des auto anticorps positifs (135), et une proportion plus importante d'anti-GPb/IX. De plus, la présence d'anticorps anti GPIb/IX a été associée à une moindre réponse au IgIV chez l'homme comme dans les modèles murins (136–138). De façon similaire, les patients ayant des anti-GPIb/IX ont une moindre réponse à la corticothérapie (139). Ces observations suggèrent que le mécanisme d'action des auto-anticorps pourrait être différent selon leur spécificité antigénique.

2) Activation et destruction des plaquettes de façon Fc-indépendante par les anticorps anti GPIb/IX :

De façon intéressante, Yan *et al* ont pu montrer que les anticorps anti GPIb/IX avaient la capacité d'activer les plaquettes par la voie de signalisation de la GPIb et d'induire leur agrégation *in vitro* (140). *In vivo* chez l'animal, ces anticorps provoquent une thrombopénie et une destruction plaquettaire au niveau hépatique. Les travaux de Li *et al* ont permis de démontrer que les auto-anticorps anti-GPIb/IX participent à la destruction des plaquettes par un mécanisme original Fc-indépendant, à l'inverse des anti-GPIIbIIIa (141). Les anti-GPIb/IX en se fixant sur les plaquettes déclenchent leur activation et leur désialylation via la libération de la sialidase Neu-1 contenu dans les granules plaquettaires. Les deux phénomènes seraient liés par une boucle de rétrocontrôle positive. Les plaquettes désialylées sont détruites au niveau hépatique via leur fixation sur l'AMR, comme en témoigne l'absence de thrombopénie induite par les anti-GPIb/IX chez des souris déficientes

pour l'AMR ou bien après co-injection d'un inhibiteur de l'AMR. A l'inverse, l'absence de FcγR chez des souris déficientes ne prévient pas la thrombopénie induite par les anti-GPIb/IX confirmant le caractère Fc-indépendant. Il est important de noter que ces phénomènes d'activation, désialylation plaquettaire et destruction hépatique via AMR ne sont pas retrouvés avec les anti-GPIIb/IIIa par les auteurs. Ces phénomènes de désialylation induite par les auto-anticorps touchent les plaquettes mais semblent épargner les mégacaryocytes, du moins *in vitro* (142).

L'injection d'oseltamivir, un inhibiteur de sialidase initialement utilisé dans le traitement de la grippe, dans des modèles murins diminue de façon significative la chute des plaquettes. Ces données sont confortées par plusieurs observations rapportant l'efficacité de l'oseltamivir chez l'homme (143,144) avec une remontée des plaquettes chez des patients PTI avec anticorps anti GPIb, suggérant que le blocage de la désialylation plaquettaire pourrait être une stratégie intéressante chez des patients PTI réfractaires aux traitements usuels.

II) Objectifs :

L'objectif de ce travail était d'évaluer l'état de sialylation plaquettaire au cours du PTI. L'objectif principal était de rechercher si l'analyse de la sialylation plaquettaire pouvait être un outil utile en pratique courante afin de distinguer le PTI des autres causes de thrombopénies comme les thrombopénies centrales ou d'origine constitutionnelles. Les objectifs secondaires étaient la recherche d'un lien entre la désialylation plaquettaire et le pronostic ou la réponse thérapeutique au cours du PTI. Nous avons également recherché une corrélation entre l'état de sialylation et la présence des différents anticorps anti-plaquettes.

Enfin, nous avons recherché si l'état d'activation plaquettaire évalué par cytométrie en flux, ou l'IPF (immature platelet fraction) pouvait être des outils diagnostiques complémentaires pour le diagnostic différentiel entre PTI et thrombopénies constitutionnelles.

III) Patients et méthodes :

A) Inclusion des patients :

Trois groupes de patients ont été inclus :

- Un groupe comprenant des patients présentant une thrombopénie liée à un PTI nouvellement diagnostiqué (évolution < 3 mois), persistant (évolution entre 3 et 12 mois) ou chronique (évolution > 12 mois) défini selon les critères internationaux (2) (thrombopénie périphérique acquise <100G/L et isolée, en l'absence de cause évidente ou de cause sous-jacente de thrombopénie). Les formes primitives et secondaires ont été incluses. Le recrutement était réalisé lors des consultations de médecine interne au CHU de Nantes et dans les services d'hospitalisation. Pour ces patients, étaient recueillis les données cliniques telles que le type de PTI, son évolution, les traitements employés et la réponse thérapeutique. La présence d'anticorps anti-plaquettes et leur spécificité était recherchée systématiquement. Après un premier test de dépistage par immunofluorescence, la présence d'anticorps anti-plaquettes était confirmée par MAIPA direct et indirect (kit apDIA).

- Un groupe de patients avec thrombopénie chimio-induite, dans lequel étaient inclus des patients présentant une thrombopénie centrale liée à une chimiothérapie cytotoxique. Le recrutement était réalisé lors des consultations d'hématologie, à partir de l'hospitalisation de jour ou conventionnelle d'hématologie clinique au CHU de Nantes.

- Un groupe de patients présentant une thrombopénie constitutionnelle comprenant :

- Les thrombopénies constitutionnelles avec une mutation génétique documentée et reconnue comme délétère.
- Les thrombopénies familiales définies par une thrombopénie d'origine génétique fortement suspectée mais non documentée, avec présence d'au moins deux antécédents familiaux au premier degré.

Le recrutement de ces patients était réalisé à partir des consultations d'hémostase du centre régional de traitement de l'hémophilie (CRC-MH/CRTH).

Pour tous les patients, une fiche d'information (annexe 1) était remise, ainsi que l'obtention d'un consentement signé (annexe 2) avant tout prélèvement et inclusion dans l'étude.

Ont été exclus de l'étude pour les trois groupes :

- Patient mineur, sous tutelle ou curatelle ;
- Femme enceinte ;
- Participation à une autre étude de recherche clinique ;
- Traitement par corticoïdes ou immunoglobulines polyvalentes datant de moins de 4 semaines ;
- Traitement antiagrégant plaquettaire ou AINS en cours ou datant de moins de 10 jours ;
- Transfusion plaquettaire dans les 14 jours précédents ;
- Carence martiale prouvées (ferritine <15 µg/L et/ou coefficient saturation transferrine <10%) ;
- Thrombopénie immuno-allergique d'origine médicamenteuse.

B) Etude de la sialylation plaquettaire et des paramètres plaquettaires :

1) Obtention des échantillons :

Les prélèvements sanguins étaient réalisés par ponction veineuse et le sang collecté dans des tubes CTAD de 2,9mL de type S- Monovette (STARSTEDT, référence 04.1909.001). Les prélèvements étaient acheminés au laboratoire sans délai et traités dès que possible. Tout prélèvement non traité dans les 4 heures ou bien non accompagné d'un consentement signé n'était pas analysé.

2) Analyse en cytométrie en flux :

Les échantillons étaient centrifugés à 900tours/min pendant 10min à +18°C pour obtenir un plasma riche en plaquettes (PRP). Le PRP était récupéré dans un tube secondaire. Le reste du sang total était centrifugé à 3500g pendant 15min à +18°C pour obtenir un plasma pauvre en plaquettes (PPP), qui était congelé.

Une partie du PRP a été incubée 30 min à l'abri de la lumière en présence de *Ricinus communis agglutinin I* (RCA, Vector Laboratories) marqué au FITC à 12,5 µg/mL, ainsi qu'avec un anticorps monoclonal CD41-PE (BD Biosciences). Dans un autre tube, le reste de PRP a été incubé 30 min à l'abri de la lumière avec les anticorps monoclonaux suivants : anti-CD41-FITC (BD Biosciences), antiCD62P-PE (BD Biosciences). Un volume de 400µL de tampon phosphate (Phosphate-Buffered Saline, PBS) était utilisé pour stopper l'incubation.

L'état de sialylation était étudié en cytométrie en flux (NAVIOS, Beckman Coulter). L'analyse se faisait en vitesse "Low" avec acquisition de 20000 événements. La fluorescence était quantifiée en moyenne d'intensité de fluorescence (mean fluorescence intensity, MFI) et exprimée en unité arbitraire (UA) ou en pourcentage de cellules positives. Les données étaient analysées par le logiciel Kaluza analysis version 2.1.

3) Obtention des paramètres plaquettaires (numération plaquettaire et morphologie plaquettaire) :

Les résultats de l'IPF#, de l'IPF% et du VPM étaient obtenus à partir de l'automate XN9000 (Sysmex) avec numération des plaquettes en mode « fluorescence » et de la lecture du frottis sanguin.

C) Dosage de la P sélectine (CD62P) soluble :

Le dosage du CD62P soluble (sCD62P) a été réalisé par technique ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), selon les recommandations du fournisseur (Human sP-selectin ELISA kit Invitrogen).

D) Analyse statistique :

Les variables quantitatives ont été analysées par un test non paramétrique de Wilcoxon-Mann-Whitney. Les variables qualitatives ont été analysées par un test du Khi2 ou exact de Fischer en cas d'effectifs faibles. Le degré de signification statistique est fixé à 5 % (risque de première espèce).

La précision diagnostique pour distinguer patients avec PTI ou thrombopénie constitutionnelle a été évaluée par la réalisation de courbes ROC (receiver operating characteristics) et l'aire sous la courbe (AUC) a été calculée avec un intervalle de confiance à 95%. Une valeur de $p < 0,05$ était considérée comme significative. Pour chaque variable étudiée, un seuil présentant la meilleure sensibilité et spécificité a été défini. Pour l'analyse statistique, les logiciels Microsoft Excel 2016 (Microsoft, Redmond, WA, USA), GraphPad Prism (version 5.03, GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) et Medcalc Statistical Software version 16.4.3 (MedCalc Software bv, Ostend, Belgium) ont été utilisés.

E) Aspects éthiques :

Ce protocole a reçu l'accord favorable du comité de protection des personnes Sud-Ouest et Outre-Mer 4 (Avis n°CPP17-072a / 2017-A02663-50) le 12 janvier 2018 sous le nom de « protocole SYMPATHIC » (Étude de la Sialylation plaquettaire par cytométrie en flux Pour le diagnostic différentiel des Thrombopénies Immunologiques et Constitutionnelles).

IV) Résultats :

A) Mise au point de la technique d'analyse de la sialylation plaquettaire :

Le premier objectif de ce travail était de valider une technique d'analyse de la sialylation plaquettaire par cytométrie en flux au laboratoire. Dans la majorité des publications, l'étude de la sialylation des plaquettes est réalisée dans des laboratoires de recherche à partir de plaquettes lavées. Cette technique est longue, complexe et semble donc peu transposable à une utilisation en routine. La première étape était donc de démontrer que cette analyse pouvait être réalisée de façon reproductible et fiable à partir d'un plasma riche en plaquettes (PRP) d'un patient sans étape de lavage. Les plaquettes sont classiquement des cellules fragiles avec une durée de vie courte et dont les capacités fonctionnelles s'épuisent rapidement après prélèvement. De plus, l'analyse par cytométrie en flux n'étant pas accessible en continu, il était important de déterminer si les résultats de sialylation plaquettaire de surface étaient stables malgré un délai entre le prélèvement et le moment de l'analyse.

Influence du type de tube de prélèvement utilisé et du délai d'analyse de la sialylation :

Nous avons tout d'abord réalisé une analyse cinétique de la sialylation plaquettaire à différents moments à partir de sang collecté en tube EDTA sur des sujets sains et conservé en sang total à température ambiante (figure 6). L'analyse met en évidence une augmentation significative ($p= 0,012$) du marquage du RCA à H8 par rapport à H1, témoin d'une désialylation (figure 6A). L'analyse à H24 montre une diminution secondaire du marquage RCA.

Nous avons étudié si le type de tube de prélèvement pouvait avoir une influence sur la conservation de l'échantillon. Nous avons renouvelé l'analyse cinétique de la sialylation plaquettaire en comparant les résultats d'échantillons obtenus en tube EDTA, citraté et en tube CTAD. Les tubes CTAD sont des tubes citratés auxquels ont été ajoutés de la

théophylline, de l'adénosine et du dipyridamole. Ces 3 molécules sont des inhibiteurs de l'activation plaquettaire et permettraient de limiter l'activation plaquettaire *in vitro* et donc d'allonger les durées d'acheminement maximales pour certains analyses en hémostase (145,146). La comparaison entre les différents types de tube de prélèvement met en évidence le même profil en fonction du temps, avec une augmentation initiale du marquage RCA à H8 puis une diminution à H24 (figure 6B).

Nous avons ensuite testé l'intérêt de prélever l'échantillon sur tube MONOVETTE (type S-Monovette, STARSTEDT®). Ce tube a l'avantage de comporter un piston permettant de créer une dépression manuelle au moment du prélèvement et d'éviter une activation potentielle *in vitro* des plaquettes. L'analyse cinétique de la sialylation plaquettaire avec les tubes CTAD MONOVETTE montre une stabilité du marquage par le RCA jusqu'à H4. En revanche à partir de H6 le marquage RCA augmente significativement de la même façon que pour les autres types de tube (figure 6C). A H1 du prélèvement nous n'observons pas de différence significative de moyenne d'intensité de fluorescence (mean fluorescence intensity, MFI) du RCA entre les différents tubes de prélèvement employés (figure 6D). La MFI sur tube EDTA est de 81,8 UA ($\pm 43,3$), 41,8 UA ($\pm 12,5$), sur tube citraté, 46,2 UA ($\pm 14,7$) sur tube CTAD et 57,4 ($\pm 39,6$) sur tube MONOVETTE.

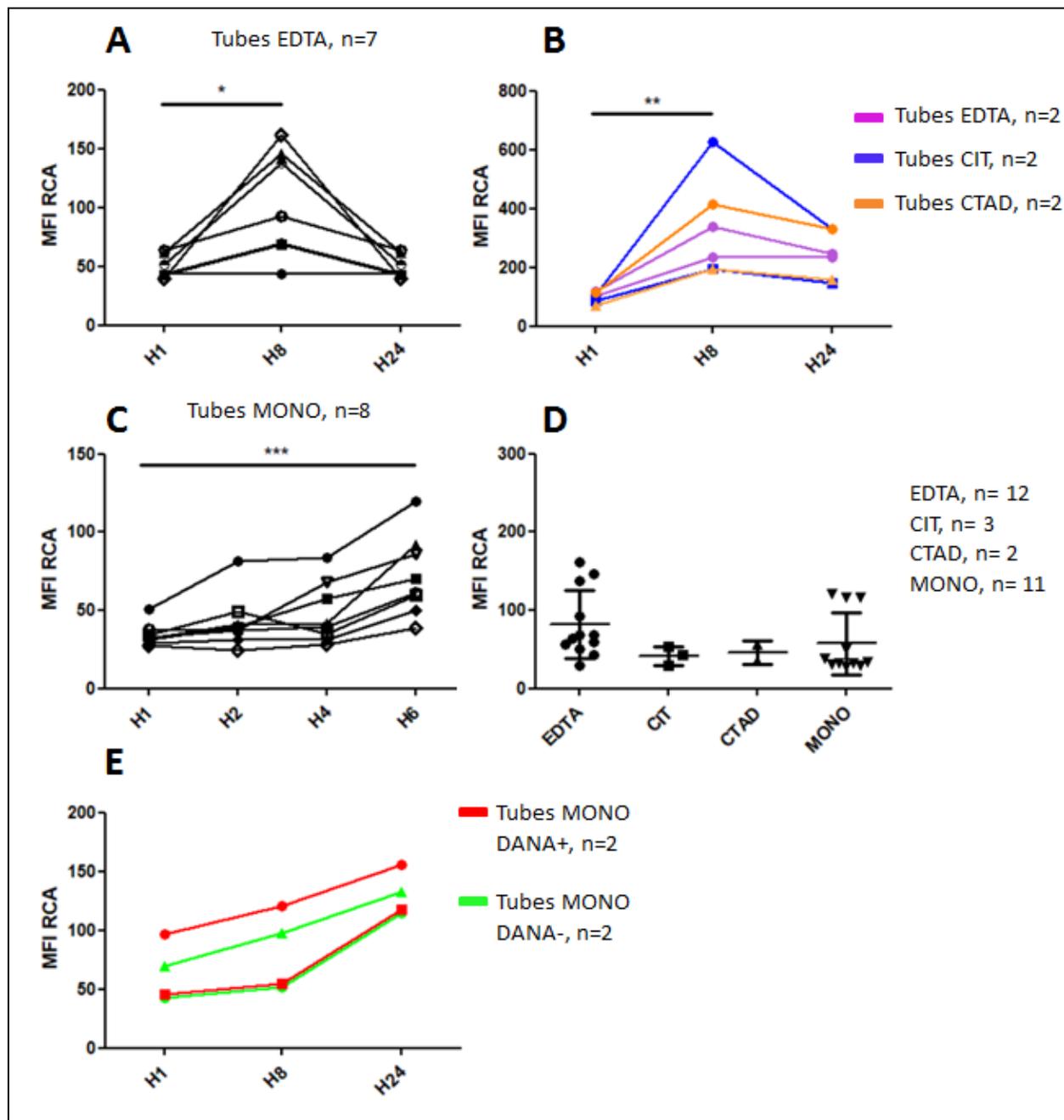


Figure 6 : Mise au point: Analyse cinétique de l'état de sialylation plaquettaire chez des sujets contrôles. **A.** Analyse cinétique à H1, H8 et H24 de la MFI du RCA sur tubes EDTA. **B.** Analyse cinétique à H1, H8 et H24 de la MFI du RCA selon le type de tube de prélèvement. **C.** Analyse cinétique à H1, H2, H4 et H6 de la MFI du RCA sur tubes CTAD MONOVETTE (type S- Monovette, STARSTEDT®). **D.** Comparaison des MFI à H1 du RCA selon le type de tube de prélèvement utilisé. **E.** Analyse cinétique à H1, H8 et H24 de la MFI du RCA sur tubes CTAD MONOVETTE (type S- Monovette, STARSTEDT®) avec ou sans ajout d'un inhibiteur de sialidase (DANA).
 *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$, ****: $p < 0,0001$; EDTA: Éthylène diamine tétra acétique ; CIT: citrate; CTAD: citrate-théophylline-adénosine-dipyridamole; MONO: tube CTAD de type MONOVETTE (STARSTEDT®); RCA: *Ricinus communis agglutinin I* ; DANA: acide N-Acétyle-2,3-déhydro-2-désoxyneuraminique

En faisant l'hypothèse que l'augmentation du marquage RCA observée à H6 et H8 pourrait être due à l'activation et à la désialylation des plaquettes *in vitro*, liée à la durée de conservation prolongée nous avons tenté de limiter ce phénomène. L'acide N-Acétyl-2,3-déhydro-2-désoxyneuraminique (DANA) est un inhibiteur de pan-sialidase humaine et microbienne non sélectif (72) ayant la concentration inhibitrice médiane la plus basse, d'environ 80µM contre la neuraminidase-1 (Neu-1) humaine (147). Le DANA a démontré son activité inhibitrice sur la désialylation des plaquettes *in vitro* lors de leur stockage au froid (115) sous forme de plasma riche en plaquettes (PRP).

Afin de bloquer les phénomènes d'activation et de désialylation *in vitro*, nous avons réalisé une nouvelle analyse cinétique de la sialylation plaquettaire avec les tubes CTAD MONOVETTE (type S- Monovette, STARSTEDT®) dans lesquels était ajouté du DANA à 1mM (Sigma Aldrich). La comparaison des tubes avec ou sans ajout de DANA ne mettait pas en évidence de différence significative au niveau du marquage RCA, avec une augmentation persistante à H8 par rapport à l'analyse à H1 (figure 6E).

Au total, peu importe le type de tube de prélèvement et le type d'anticoagulant utilisé, nous avons observé une augmentation du marquage RCA à partir 6 à 8 heures de conservation des plaquettes en sang total à température ambiante, témoignant d'une désialylation *in vitro*. L'utilisation de CTAD comprenant des inhibiteurs de l'activation plaquettaire et l'ajout de DANA dans les tubes de prélèvement ne permettaient pas de prévenir cette désialylation. Nous démontrons que l'état de sialylation plaquettaire est stable au moins 4 heures *in vitro* avec l'utilisation de tubes MONOVETTE contenant du CTAD comme anticoagulant. Ainsi ce type de tube semble le plus adapté pour cette technique avec une analyse en cytométrie en flux dans les 4 heures suivant le prélèvement. L'ajout de DANA dans les tubes de prélèvement ne semble pas efficace pour améliorer la stabilité de l'échantillon au-delà de 4 heures.

Détection d'une désialylation plaquettaire induite *in vitro* :

La seconde étape consistait à confirmer que notre technique d'analyse pouvait détecter une désialylation plaquettaire. Il est connu que le stockage prolongé des plaquettes au froid déclenche leur activation et leur désialylation *in vitro* lors de leur réchauffement.

Pour réaliser une désialylation induite par le froid *in vitro* nous avons isolé des plaquettes dans un PRP, puis nous les avons stockées au froid à +4°C pendant 2 à 4 heures et de façon plus prolongée pendant 24h. Les plaquettes sont ensuite réchauffées à +37°C pendant 15 min avant marquage et analyse. Lors d'un passage 2 à 4 heures au froid, nous n'avons pas observé d'augmentation significative du marquage du RCA. En revanche, lors du stockage pendant 24 h au froid, nous mettons en évidence une désialylation significative des plaquettes authentifiée par l'augmentation du marquage au RCA avec une MFI 18 fois plus importante que le contrôle (figure 7A).

Afin de confirmer ces données, nous avons réalisé une désialylation *in vitro* en incubant un PRP témoin avec de la Neu-1. L'ajout de Neu-1 a déclenché une forte augmentation du marquage RCA (MFI 11 fois plus élevée que le contrôle), confirmant une désialylation plaquettaire *in vitro* (figure 7B-C). L'ajout de DANA dans le tube MONOVETTE juste avant le prélèvement permettait de limiter l'augmentation de marquage du RCA induit par la Neu-1. La MFI du RCA était 5 fois plus importante que le contrôle en présence de Neu-1 et de DANA, contre une augmentation d'un facteur 19 de la MFI en présence de Neu-1 seule (figure 7D). Nous démontrons ici que notre technique d'analyse de la sialylation plaquettaire est capable de détecter une désialylation significative *in vitro*.

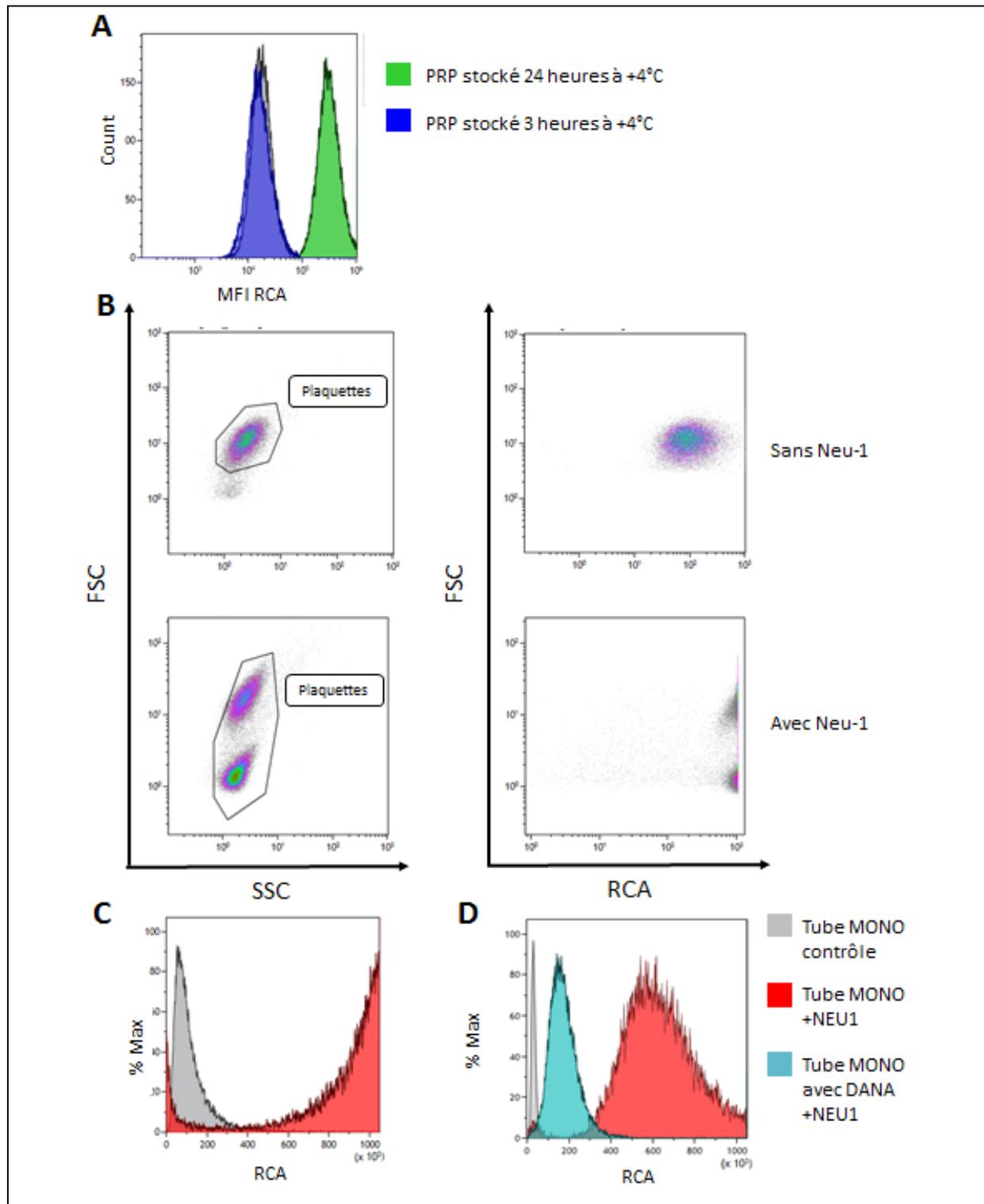


Figure 7: Mises au point: Désialylation plaquettaire induite *in vitro*.

A. Comparaison de la MFI du RCA des plaquettes après stockage au froid en RPR (+4°C) pendant deux durées différentes (2 à 4h et 24h). **B.** Désialylation induite *in vitro* par l'ajout de sialidase (Neu-1). **C.** Histogramme représentant la MFI du RCA des plaquettes en fonction de la présence ou non de Neu-1. **D.** Histogramme comparant la MFI du RCA des plaquettes après désialylation par la Neu-1 en présence ou non de DANA dans le tube de prélèvement.

RCA: *Ricinus communis agglutinin I* ; DANA: acide N-Acétyl-2,3-déhydro-2-désoxyneuraminique; MFI: mena fluorescence intensity; PRP: plasma riche en plaquettes; FSC: forward scatter light; SSC: side scatter light; MONO: tube CTAD de type MONOVETTE (STARSTEDT®)

B) Description des patients inclus :

Au cours de la période de janvier 2018 à novembre 2019, nous avons inclus 13 patients PTI, 12 patients présentant une thrombopénie centrale chimio-induite et 9 patients ayant une thrombopénie constitutionnelle. Le tableau 1 résume les caractéristiques cliniques et biologiques des patients.

| PTI, n=13 | |
|---|-----------------|
| Age au prélèvement, moyenne (écart type) | 60 (19) |
| Sexe ratio (F/H) | 1,6 (8/5) |
| Syndrome hémorragique au prélèvement, n (%) | 3 (23) |
| PTI chronique, n (%) | 11 (85) |
| PTI persistant, n (%) | 1 (8) |
| PTI aigu, n (%) | 2 (15) |
| PTI primaire, n (%) | 12 (92) |
| Recours à un traitements de fond, n (%) | 6 (46) |
| Splénectomie, n (%) | 4 (31) |
| Rituximab, n (%) | 3 (23) |
| TPO-Ra, n (%) | 4 (31) |
| Dapsone, n (%) | 4 (31) |
| Danatrol, n (%) | 2 (15) |
| Immunosuppresseur, n (%) | 2 (15) |
| Examens biologiques | |
| Plaquettes en G/L, médiane (écart interquartile) | 65 (63) |
| Positivité des anticorps anti-plaquettaire (MAIPA), n (%) | 3/13 (23) |
| Anti-GPIb pur, n (%) | 0 (0) |
| Anti-GPIIb/IIIa pur, n (%) | 1 (33) |
| Mixte*, n (%) | 2 (67) |
| Positivité des facteurs anti-nucléaires, n (%) | 6/13 (46) |
| Présence d'une MGUS, n (%) | 0/13 (0) |
| Traitements lors du prélèvement | |
| Corticothérapie < 15 jours, n (%) | 2 (15) |
| IgIV < 1 mois, n (%) | 0 (0) |
| Transfusion plaquettaire < 7 jours, n (%) | 0 (0) |
| RTX < 6 mois, n (%) | 0 (0) |
| TPO-Ra, n (%) | 2 (16) |
| Dapsone < 15 jours, n (%) | 0 (0) |
| Splénectomie, n (%) | 3 (23) |
| Azathioprine, n (%) | 2 (15) |
| Thrombopénie chimio-induite, n=12 | |
| Age au prélèvement, moyenne (écart type) | 58 (11) |
| Sexe ratio (F/H) | 0,7 (5/7) |
| Plaquettes en G/L, médiane (écart interquartile) | 62 (59) |
| Hémopathie maligne sous-jacente, n (%) | 11 (92%) |
| Myélome multiple | 8/11 (73%) |

| | |
|--|------------|
| LAM secondaire | 1/11 (9%) |
| Lymphome cérébral | 1/11 (9%) |
| Lymphome du manteau | 1/11 (9%) |
| Type de chimiothérapie | |
| Melphalan | 8/11 (73%) |
| R-ICE | 1/11 (9%) |
| CPX | 1/11 (9%) |
| R-CHOP | 1/11 (9%) |
| Thrombopénie hors hémopathie (Valganciclovir) | 1 (8%) |
| Thrombopénie constitutionnelle, n=9 | |
| Age au prélèvement, moyenne (écart type) | 32 (9) |
| Sexe ratio (F/H) | 0,8 (4/5) |
| Plaquettes en G/L, médiane (écart interquartile) | 91 (30) |
| Age au diagnostic, moyenne (écart type) | 28 (12) |
| Type de thrombopénie constitutionnelle | |
| syndrome de Bernard Soulier | 2 (22%) |
| mutation ANKRD26 | 2 (22%) |
| mutation GBIBB | 2 (22%) |
| mutation SLFN14 | 1 (11%) |
| mutation non identifiée | 2 (22%) |

Tableau 1 : Caractéristiques cliniques et biologiques des 3 groupes de patients

PTI : thrombopénie immunologique ; TPO-Ra : Agoniste des récepteurs de la thrombopoïétine ; MAIPA : Monoclonal Antibody Immobilization of Platelet Antigens ; LAM : leucémie aiguë myéloblastique ; R-ICE :Rituximab-Ifosfamide-Carboplatine-Etoposide ; CPX : daunorubicine et cytarabine liposomal ;R-CHOP : Rituximab-Cyclophosphamide-Hydroxydaunorubicine-Oncovin(vincristine)-Prednisone ; ANKRD26 : ankyrin repeat domain 26 ; GPIBB : glycoprotein 1b-beta.

1) Patients du groupe PTI :

Parmi les patients PTI, 11 (85%) présentaient une forme chronique, 1 (8%) une forme persistante et 2 (15%) un PTI nouvellement diagnostiqué. La majorité d'entre eux (92%) avaient un PTI primaire. Les patients avaient un âge moyen au prélèvement de 60 ans (± 19), avec un sex ratio F/H à 1,6 (8/5). Trois patients (23%) seulement présentaient un syndrome hémorragique cutané ou muqueux au moment du prélèvement. La durée médiane de suivi était de 56 mois [écart interquartile : 184]. Le taux de plaquettes médian au moment du prélèvement était de 65 G/L [écart interquartile : 65]. Tous les patients ont eu une recherche d'anticorps anti-plaquettes, dont 7 positifs en test de dépistage par recherche d'anticorps associées aux plaquettes (PA-Ig). Trois patients sur 13 (23%) avaient un test MAIPA direct positif. Un patient avait des anticorps anti-GPIIb/IIIa pur et deux autres avaient des anti-

GPIIb/IIIa associés à des anti-GPIb. Quarante-six pourcent (46%) des patients avaient une positivité des facteurs anti-nucléaires à au moins une reprise à un taux $\geq 1/320$, la majorité sans spécificité antigénique hormis 2 patients (anti SSA et anti-ADN natif).

Au niveau thérapeutique, 6 patients (46%) avaient ou ont nécessité, un traitement de fond. Quatre patients (31%) ont eu une splénectomie dont deux échecs, 4 patients ont reçu au moins un TPO-Ra et 3 (23%) ont reçu du rituximab. Enfin 2 patients ont été exposés à un immunosuppresseur (15%, azathioprine et mycophénolate mofétil), 4 (31%) à la dapsone et 2 (15%) au danatrol. Deux patients étaient multi-réfractaires, *i.e.* réfractaire à la splénectomie, au rituximab et aux deux TPO-Ra à dose maximale tolérée.

2) Patients du groupe thrombopénie chimio-induite :

Les 12 patients du groupe thrombopénie centrale présentaient une thrombopénie induite par une chimiothérapie cytotoxique, hormis un patient présentant une thrombopénie toxique induite par le valganciclovir. L'âge moyen au prélèvement était de 58 ans (± 11) et le sex ratio F/H était à 0.7 (5/7). Pour tous les patients traités par chimiothérapie cytotoxique, l'indication était une hémopathie maligne. La grande majorité des patients présentaient une hémopathie lymphoïde (11/12 ; 92%. 8 avec myélome multiple, un avec lymphome cérébral, un avec lymphome du manteau). Un patient présentait une hémopathie myéloïde (leucémie aiguë myéloblastique secondaire). La chimiothérapie la plus fréquemment utilisée était du MELPHALAN en induction avant autogreffe dans le cadre d'un myélome multiple dans 66% des cas (8/12). La numération plaquettaire médiane au moment du prélèvement était de 62 G/L [écart interquartile : 59]. Cinquante-huit pourcent (58%) des patients étaient en aplasie au moment du prélèvement.

3) Patients du groupe thrombopénie constitutionnelle :

Les 9 patients présentant une thrombopénie constitutionnelle étaient plus jeunes au moment du prélèvement que les patients du groupe PTI et du groupe thrombopénie chimio-

induite, avec un âge moyen de 32 ans (± 9) et un sex ratio F/H à 0.8 (4/5). La numération plaquettaire médiane lors du prélèvement était de 91 G/L [écart interquartile : 30].

Parmi les 9 patients, 7 (78%) avaient une mutation génétique identifiée : 2 patients avec un syndrome de Bernard-Soulier, 2 patients avec mutation du gène ANKRD26, 2 avec une mutation hétérozygote du gène GPIBB et un avec une mutation du gène SLNF14. La majorité d'entre eux rapportaient une symptomatologie hémorragique comprenant des ecchymoses (78%), des gingivorragies (89%), des hématomes (44%) ou des épistaxis (22%). Trois patients (33%) ont présenté un syndrome hémorragique post-opératoire et deux patients (22%) ont un antécédent d'hémorragie grave (hématome du quadriceps, hémopéritoine après rupture de kyste ovarien).

C) Analyse de la sialylation et de l'activation plaquettaire en cytométrie en flux

1) Intérêt de l'analyse de la sialylation plaquettaire pour le diagnostic différentiel du PTI et des thrombopénies constitutionnelles

L'analyse en cytométrie en flux a été réalisée à partir du PRP des patients, obtenu après centrifugation du sang total. La figure 8 présente la stratégie de fenêtrage (gating).

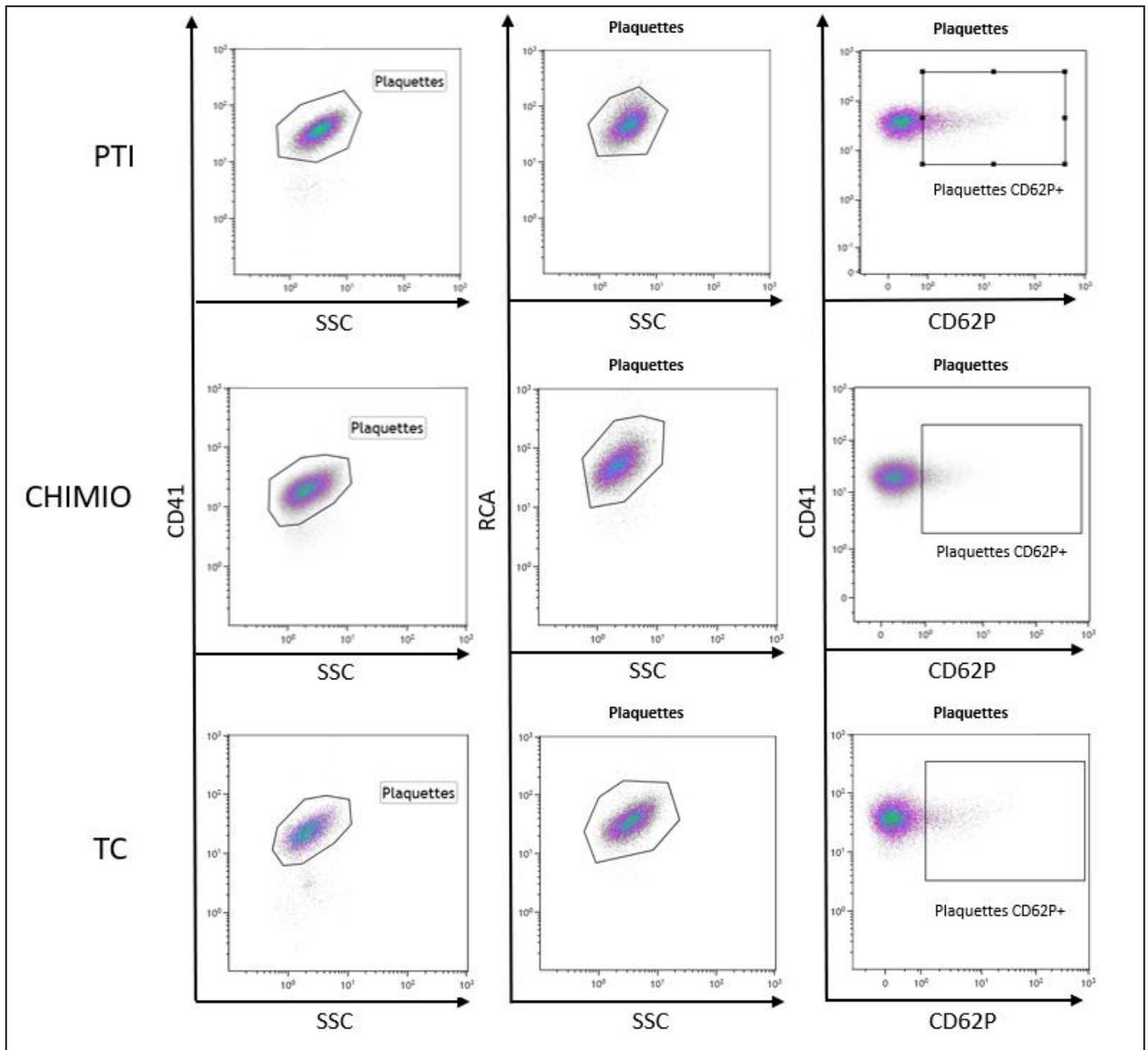


Figure 8 : Analyse des plaquettes en cytométrie en flux : stratégie de fenêtrage (gating) utilisée, avec un exemple significatif de patient par groupe.

PTI : groupe thrombopénie immunologique ; CHIMIO : groupe thrombopénie chimio-induite; TC: groupe thrombopénie constitutionnelle; FSC: forward scatter; SSC: side scatter; RCA: *Ricinus communis agglutinin I*

Concernant les MFI du RCA, nous n’observons pas de différence significative entre les patients PTI (moyenne 61 UA, écart type ± 26), les patients du groupe thrombopénie chimio-induite (55 UA ± 29) et les patients du groupe thrombopénie constitutionnelle (43 UA ± 16) (figure 9A). Les patients du groupe PTI (moyenne 61 UA, ± 26) ont en revanche un marquage RCA significativement plus élevé que les sujets contrôles (moyenne 35 UA, ± 7) ($p=0,015$) (figure 9A).

Il n'y a pas de différence significative sur la MFI du CD41 entre le groupe PTI, le groupe thrombopénie chimio-induite et les patients du groupe thrombopénie constitutionnelle (données non montrées). Afin de s'affranchir de la taille des plaquettes, nous avons réalisé pour chaque patient le ratio MFI RCA/MFI CD41 (121,148). De la même façon, il n'est pas retrouvé de différence significative entre les 3 groupes (PTI : ratio moyen 2 ± 1 ; chimio-induite : ratio moyen 2 ± 1 ; constitutionnel : ratio moyen 1 ± 1) (figure 9B). Les patients du groupe PTI (2 ± 1) ont un ratio MFI RCA/CD41 plus élevé que les sujets contrôles ($0,5\pm 0,2$) ($p < 0,0001$). De la même façon, les patients du groupe thrombopénie chimio-induite (2 ± 1) ont un ratio plus élevé que les sujets contrôles ($0,5\pm 0,2$) ($p = 0,001$).

Au total, nos résultats ne mettent pas en évidence de différence concernant l'état de sialylation plaquettaire entre les 3 groupes, suggérant qu'il ne s'agit pas d'un test diagnostique permettant de distinguer PTI et thrombopénies constitutionnelles.

2) Etude du lien entre sialylation plaquettaire et réponse thérapeutique au cours du PTI

Parmi les 5 patients ayant un ratio MFI RCA/CD41 élevé (> 2), 4 patients sont splénectomisés et 3 sont en échec de splénectomie. Le dernier patient est en réponse partielle après splénectomie. Les patients en échec de splénectomie ont un ratio MFI RCA/CD41 moyen à 3,4 (écart type $\pm 1,3$, IC95% [2,2-4,6]) versus un ratio moyen à 1,3 (écart type $\pm 0,4$, IC95% [1,1-1,6]) chez les autres patients.

Les patients PTI ayant des anticorps anti-plaquettes ont un ratio MFI RCA/CD41 en moyenne à 3,4 (écart type $\pm 1,5$, IC95% [1,7-5,2]), plus élevé que les patients PTI n'ayant pas d'auto-anticorps détectables (moyenne 1,5 écart type $\pm 0,8$, IC95% [1,1-2,0]).

De la même façon, les 3 patients PTI résistants aux corticoïdes et/ou aux IgIV ont un ratio MFI RCA/CD41 en moyenne plus élevé (moyenne : 3,9, écart type $\pm 1,2$, IC95% [2,5-5,2]) que les patients PTI sensibles (moyenne : 1,5, écart type $\pm 0,6$, IC95% [1,1-1,8]).

3) Etude de l'activation plaquettaire par cytométrie en flux

Le pourcentage de plaquettes CD62P positive est significativement plus élevé dans le groupe PTI (médiane : 16% ; écart interquartile (EIQ) : 11%) comparé au groupe

thrombopénie chimio-induite (médiane : 8% ; EIQ : 2%, $p=0,016$) mais également comparé au groupe thrombopénie constitutionnelle (médiane : 7% ; EIQ : 4%, $p=0,008$) (figure 9C). Quatre patients du groupe PTI ont un %CD62P >20%. Il n'est pas noté de similitude clinico-biologique entre ces patients et ces patients n'ont pas d'anticorps anti-plaquettaires détectables en MAIPA. Un patient du groupe thrombopénie constitutionnelle n'a pas pu être analysé sur le marquage CD62P. Le pourcentage de plaquettes CD62P+ n'était pas influencé par la profondeur de la thrombopénie avec un pourcentage moyen à 16% (± 10) en cas de thrombopénie <30 G/L et un pourcentage moyen à 11% (± 6) en cas de thrombopénie >30 G/L ($p=0,19$) (figure 9D).

Afin de mettre en évidence un lien entre activation plaquettaire, via le pourcentage de plaquettes CD62P positive, et désialylation authentifiée par le marquage RCA nous avons recherché une corrélation entre ces deux variables. Sur l'ensemble des patients disponibles ($n=33$) il n'est pas mis en évidence de corrélation entre la valeur du RCA et le pourcentage de plaquettes CD62P positive ($R^2= 0,0009$) (figure 9E). Il n'est pas non plus mis en évidence de corrélation entre le taux de plaquettes et la MFI du RCA (R^2 à 0,06) ou bien avec le %CD62P (R^2 à 0,05) (données non présentées).

Au total, nos résultats montrent que les plaquettes des patients PTI et thrombopénie chimio-induite ont une plus forte désialylation que les sujets contrôles. Cependant les patients PTI multi-réfractaires ayant des anticorps anti GPIb et les patients en échec de splénectomie ont un ratio MFI RCA/CD41 plus élevé mais non significatif compte tenu du faible effectif. En revanche les patients du groupe PTI ont un pourcentage de plaquettes activées plus élevé que les autres patients. Il n'est pas mis en évidence de corrélation entre état de sialylation et activation plaquettaire.

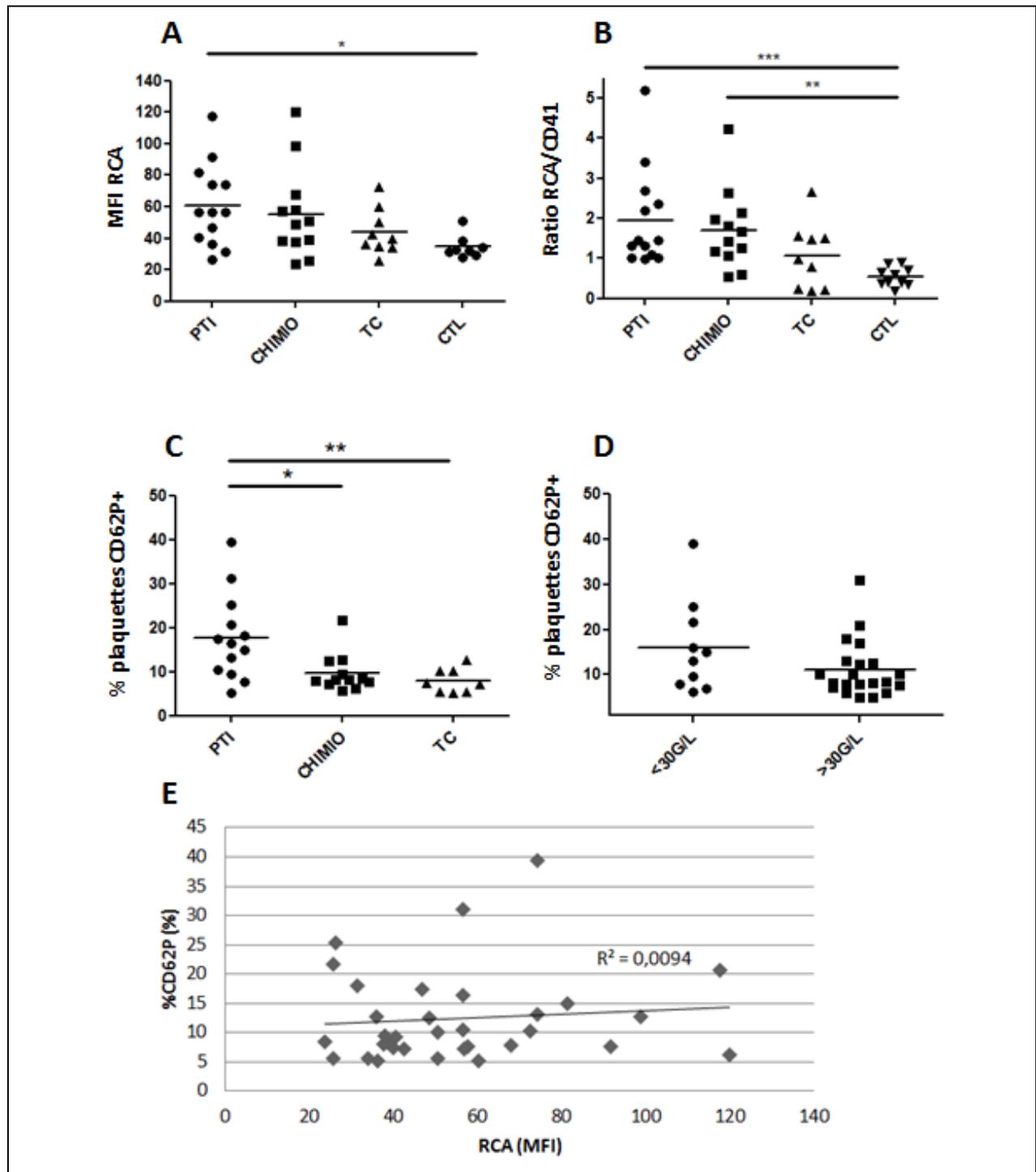


Figure 9: Analyse de l'état de sialylation et de l'activation plaquettaire par cytométrie en flux. **A.** Comparaison de la MFI (mean fluorescence intensity) du RCA entre les 3 groupes de patients (PTI n=13; CHIMIO n=12; TC n=9) et les contrôles (n=8). **B.** Comparaison du ratio MFI RCA/MFI CD41 de chaque patient pour les 3 groupes (PTI n=13; CHIMIO n=12; TC n=9) et les contrôles (n=10). **C.** Comparaison du pourcentage de plaquettes CD62P positives entre les 3 groupes (PTI n=13 ; CHIMIO n=12; TC n=8). **D.** Comparaison du pourcentage de plaquettes CD62P positives en fonction de la profondeur de la thrombopénie (>30G/L n=10; >30G/L n=21). **E.** Corrélation entre la MFI du RCA et le %CD62P sur l'ensemble des patients (n= 33). Les barres horizontales dans les figures A à D correspondent à la moyenne.

*: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$. RCA : *Ricinus communis agglutinin I* ; PTI: groupe thrombopénie immunologique; CHIMIO: groupe thrombopénie chimio-induite; TC: groupe thrombopénie constitutionnelle; CTL: groupe contrôle ; %CD62P: pourcentage de plaquettes CD62P positives

D) Dosage plasmatique de la P sélectine soluble :

Afin de confirmer la différence d'expression du CD62P à la surface des plaquettes constatée entre les différents groupes, nous avons réalisé un dosage du CD62P soluble (sCD62P) par technique ELISA. Comme le taux de sCD62P est dépendant du taux de plaquettes circulantes (149), nous avons également exprimé le taux de sCD62P en fonction de la numération plaquettaire.

Dans le groupe PTI le taux moyen de sCD62P est de 50 ng/mL (écart type ± 13), il est de 32 ng/mL (écart type ± 13) dans le groupe thrombopénie chimio-induite et de 41 ng/mL (écart type ± 16) dans le groupe thrombopénie constitutionnelle sans différence significative (données non montrées).

Le ratio sCD62P/plaquettes est significativement plus élevé dans le groupe PTI (moyenne : 2,6, écart type $\pm 4,3$) comparativement au groupe thrombopénie constitutionnelle (moyenne : 0,5, écart type $\pm 0,2$) ($p= 0,03$). Le ratio sCD62P/plaquettes moyen est de 0,8 (écart type $\pm 0,6$) dans le groupe thrombopénie chimio-induite, sans différence significative avec les deux autres groupes (figure 10A). Le patient PTI ayant le ratio sCD62-plaquettes le plus élevé (15,5) est un patient PTI nouvellement diagnostiqué fortement thrombopénique.

Les 5 patients du groupe PTI ayant les ratios les plus élevés (>1) ont tous un PTI actif avec une thrombopénie $<30G/L$, dont deux patients multi réfractaires. Les deux patients multi réfractaires semblent avoir un taux de sCD62P plus élevé (moyenne 66,8 ng/mL, écart type $\pm 0,9$) que les autres patients PTI (moyenne 46,7 ng/mL, écart type $\pm 11,2$).

Nous n'avons pas retrouvé de corrélation significative entre le pourcentage de plaquettes CD62P+ et le taux de sCD62P pour l'ensemble des patients ($R^2=0,03$) (figure 10B).

Au total, le taux de P sélectine soluble normalisé sur la numération plaquettaire est plus élevé dans le groupe de patients PTI comparé aux deux autres groupes. Dans le groupe de patients PTI, les patients ayant les plus forts ratios ont un PTI multi-réfractaire.

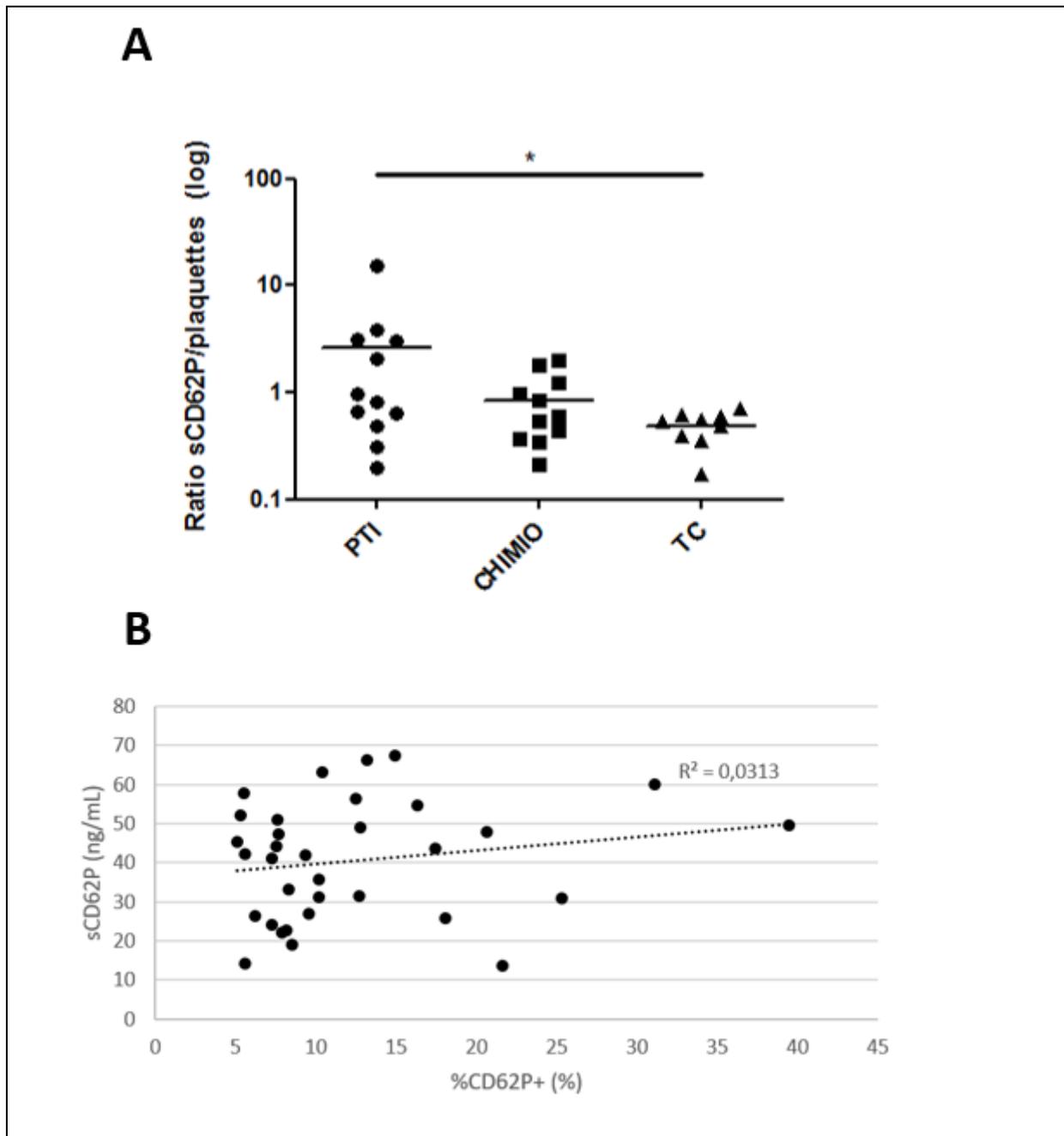


Figure 10 : Dosage de la P sélectine soluble (sCD62P). **A.** Résultats des dosages de P sélectine soluble dans les 3 groupes (PTI n=13, CHIMIO n=12 ; TC n=9). **B.** Corrélation entre le taux de P sélectine soluble et le pourcentage de plaquettes CD62P positives.

*: $p < 0,05$. PTI: groupe thrombopénie immunologique; CHIMIO: groupe thrombopénie chimio-induite; TC: groupe thrombopénie constitutionnelle. sCD62P: P sélectine soluble; %CD62P: pourcentage de plaquettes CD62P positives.

E) Analyse des paramètres plaquettaire avancés (IPF) :

Une numération plaquettaire par fluorocytométrie avec mesure de l'IPF était réalisée au cours du même prélèvement que celui pour le tube employé pour l'analyse en cytométrie en flux, sauf pour un patient du groupe PTI et un patient du groupe thrombopénie chimio-induite.

Il n'y a pas de différence significative entre les 3 groupes concernant le taux de plaquettes (figure 11A) (groupe PTI : médiane 65 G/L [EIQ : 65] ; groupe thrombopénie chimio-induite : médiane 62 G/L [EIQ : 59] ; groupe thrombopénie constitutionnelle : médiane 91 G/L [EIQ : 30]). Les patients PTI présentant un syndrome hémorragique au moment du prélèvement (n=3) ont un chiffre de plaquettes en moyenne plus bas (moyenne : 13 G/L, écart type ± 10 , IC95% [1-24]) que les patients PTI sans hémorragie (moyenne : 80 G/L, écart type ± 45 , IC95% [51-109]).

La mesure du VPM est disponible pour 6 patients du groupe PTI, 10 patients du groupe thrombopénie chimio-induite et 6 patients du groupe thrombopénie constitutionnelle. Le VPM médian est à 11 fL [EIQ : 1] dans le groupe PTI, 10 fL [EIQ : 2] dans le groupe thrombopénie chimio-induite et à 14 fL [EIQ : 1] pour le groupe thrombopénie constitutionnelle (figure 11B). Les patients du groupe PTI ont de façon significative un VPM plus élevé que les patients du groupe thrombopénie chimio-induite ($p=0,021$). Il existait une bonne corrélation entre la valeur du VPM et celle de %IPF ($R^2=0,77$), ainsi qu'avec l'IPF# ($R^2=0,69$) (figure 11E et F).

La mesure de l'IPF par fluorocytométrie est disponible chez 10 patients du groupe PTI et chez 9 patients dans le groupe thrombopénie chimio-induite et constitutionnelle.

L'IPF en valeur absolue (IPF#) du groupe PTI (médiane 6 G/L [EIQ : 6]) est significativement plus élevé que dans le groupe thrombopénie chimio-induite (médiane 1 G/L [EIQ : 1]) ($p=0,003$) (figure 11C). A l'inverse, l'IPF# du groupe PTI (médiane 6 G/L [EIQ : 6]) est plus faible comparé au groupe thrombopénie constitutionnelle (médiane 24 G/L [EIQ : 12]) ($p=0,014$).

Concernant l'IPF exprimé en pourcentage (IPF%), il est significativement plus élevé dans le groupe PTI (médiane 18% [EIQ : 20]) comparé au groupe thrombopénie chimio-induite (médiane 3% [EIQ : 1]) ($p<0,001$) (figure 11D). L'IPF% du groupe thrombopénie

constitutionnelle (médiane 27% [EIQ :17]) est légèrement plus élevé que dans le groupe PTI, mais sans atteindre la significativité statistique. Les 4 patients ayant une macrothrombopénie constitutionnelle (2 patients avec syndrome de Bernard Soulier et deux patients avec mutation hétérozygote du gène GPIIBB) semblent avoir un IPF% en moyenne plus élevé (moyenne 37%, écart type ± 17 , IC95%[20-54]) que les patients avec un PTI (moyenne 22%, écart type ± 16 , IC95%[12-32]).

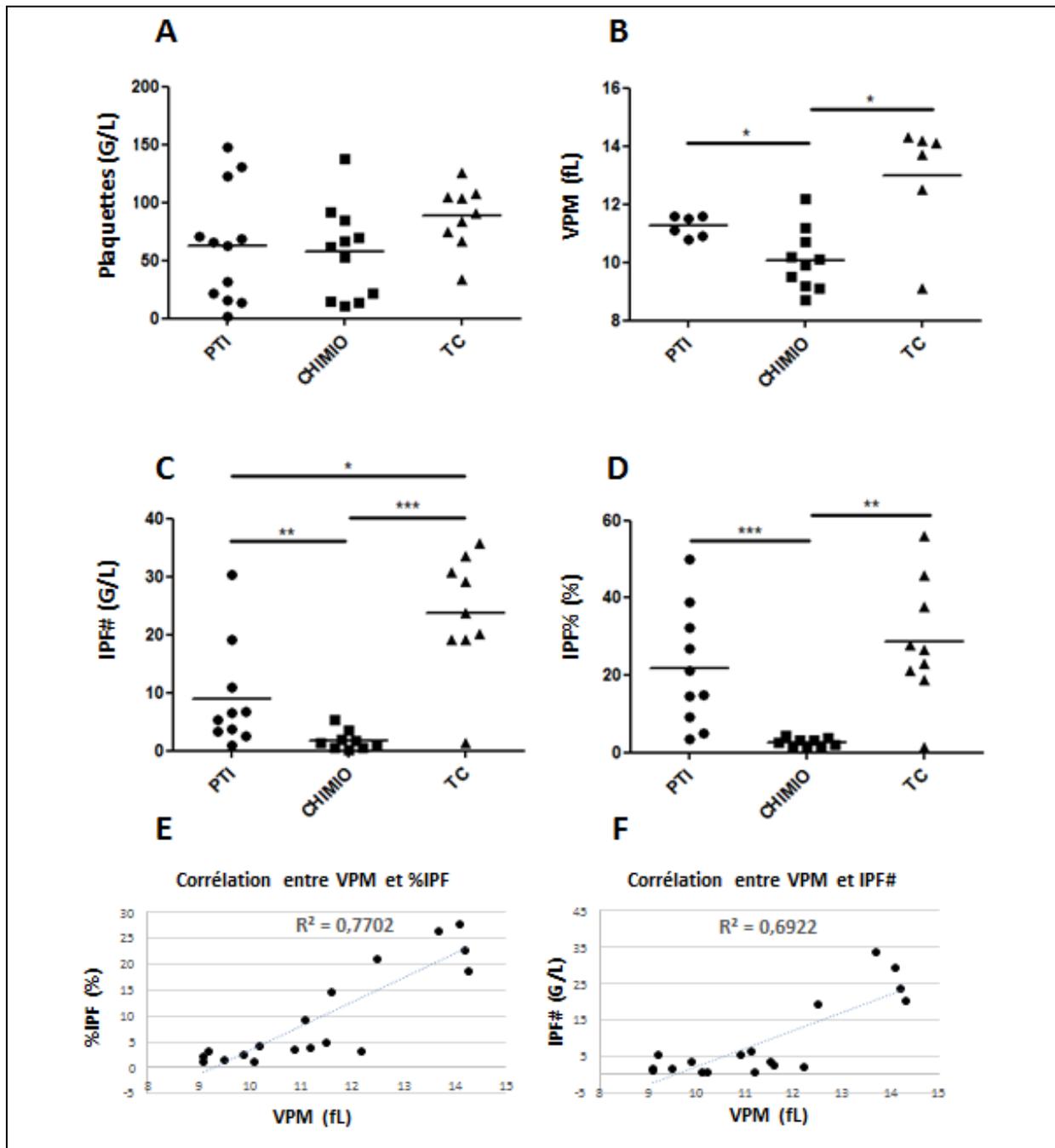


Figure 11 : analyse des paramètres plaquettaires avancés.

A. Comparaison des numérations plaquettaires (G/L) au moment du prélèvement entre les 3 groupes (PTI n=12 ; CHIMIO n=11 ; TC n=9). **B.** Comparaison des VPM (fL) entre les 3 groupes (PTI n=6 ; CHIMIO n=10 ; TC n=6). **C.** Comparaison de l'IPF# (G/L) entre les 3 groupes (PTI n=10 ; CHIMIO n=9 ; TC n=9). **D.** Comparaison de l'IPF% (%) entre les 3 groupes (PTI n=10 ; CHIMIO n=9 ; TC n=9). Les barres horizontales sur chaque figure correspondent à la moyenne. **E.** Corrélation entre la valeur du VPM et de %IPF. (n=18). **F.** Corrélation entre la valeur du VPM et de IPF# (n=18).

*: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$, ****: $p < 0,0001$. PTI: groupe thrombopénie immunologique; CHIMIO: groupe thrombopénie chimio-induite; TC: groupe thrombopénie constitutionnelle. VPM: volume plaquettaire moyen. IPF#: immature platelet fraction en valeur absolue; IPF%: pourcentage d'immature platelet fraction.

Les patients PTI présentant un syndrome hémorragique clinique (n=3) au prélèvement semblent avoir un IPF% en moyenne plus élevé (moyenne : 36,4%, écart type $\pm 12,1$, IC95% [22,7-50,1]) que les patients PTI ne présentant pas de syndrome hémorragique (moyenne : 16.3%, écart type $\pm 14,5$, IC95% [5,6-27,1]).

F) Analyse des courbes ROC pour distinguer PTI et thrombopénies constitutionnelles :

Afin de déterminer la capacité de l'IPF#, du pourcentage de plaquettes CD62P+ et du dosage du sCD62P à distinguer les patients PTI des patients avec thrombopénie constitutionnelles, nous avons analysé la courbe ROC et l'aire sous la courbe (AUC) pour chaque variable.

Pour le pourcentage de plaquettes CD62P+, l'analyse de la courbe ROC montre une AUC à 0,856 (IC 95% : 0,684-1,000) (figure 12A). Avec un seuil fixé à 11%, la sensibilité est de 87,5% et la spécificité de 76,9%, avec des valeurs prédictives positives et négatives respectivement à 63,6% et 90,9%.

Pour la valeur de l'IPF#, l'analyse de la courbe ROC montre une AUC à 0,839 (IC 95% : 0,622-1,000) (Figure 12B). Avec un seuil fixé à 11 G/L, la sensibilité est de 88,9% et la spécificité de 80,0%. La valeur prédictive positive est de 80% et la valeur prédictive négative à 89,9%.

Concernant le dosage de la P sélectine soluble, en prenant le ratio sCD62P/plaquettes l'AUC est à 0,787 (IC 95% 0,575-0,999) (figure 12C). Pour un seuil à 0,62 on obtient une sensibilité de 77,8%, une spécificité de 75% pour le diagnostic de thrombopénie constitutionnelle, avec une VPP à 70% et une VPN de 81,2%.

Nous avons combiné les deux variables IPF# et CD62P% dans un score composite afin d'essayer l'améliorer les performances diagnostiques des biomarqueurs. La formule du score composite est donnée ci-dessous :

$$\text{Calcul du score (CD62P - IPF)} = \frac{\exp(2.51 + CD62P \times (-0.47) + IPF \times 0.13)}{1 + \exp(2.51 + CD62P \times (-0.47) + IPF \times 0.13)}$$

L'AUC du score composite est de 0,937 (0,833-1,000) (figure 12D). Avec un seuil fixé à 0,52, on obtient une sensibilité de 87,5% et une spécificité de 80%, une VPP à 77,8% et une VPN à 88,9%

| | AUC (IC 95%) | Sensibilité | Spécificité | VPP | VPN |
|-----------------------------------|---------------------|-------------|-------------|-------|-------|
| %CD62P+ <11% | 0,856 (0,684-1,000) | 87,5% | 76,9% | 63,6% | 90,9% |
| IPF# > 11G/L | 0,839 (0,622-1,000) | 88,9% | 80,0% | 80,0% | 89,9% |
| Ratio sCD62P/plaquettes <0,62 | 0,787 (0,575-0,999) | 77,8% | 75,0% | 70,0% | 81,2% |
| Score composite IPF#-CD62P% <0,52 | 0,937 (0,833-1,000) | 87,5% | 80,0% | 77,8% | 88,9% |

Tableau 2 : Tableau récapitulatif des valeurs d'AUC, de sensibilité, spécificité, VPP et VPN des différents paramètres plaquettaires pour le diagnostic des thrombopénies constitutionnelles. Les seuils ont été définis pour chaque variable à partir de l'analyse de la courbe ROC, permettant de déterminer le seuil avec la meilleur sensibilité et spécificité.

IPF# : immature platelet fraction valeur absolue ; %CD62P+ : pourcentage de plaquettes CD62P positives; ROC: receiver-operating characteristic. AUC : area under curve; VPP : valeur prédictive positive ; VPN : valeur prédictive négative.

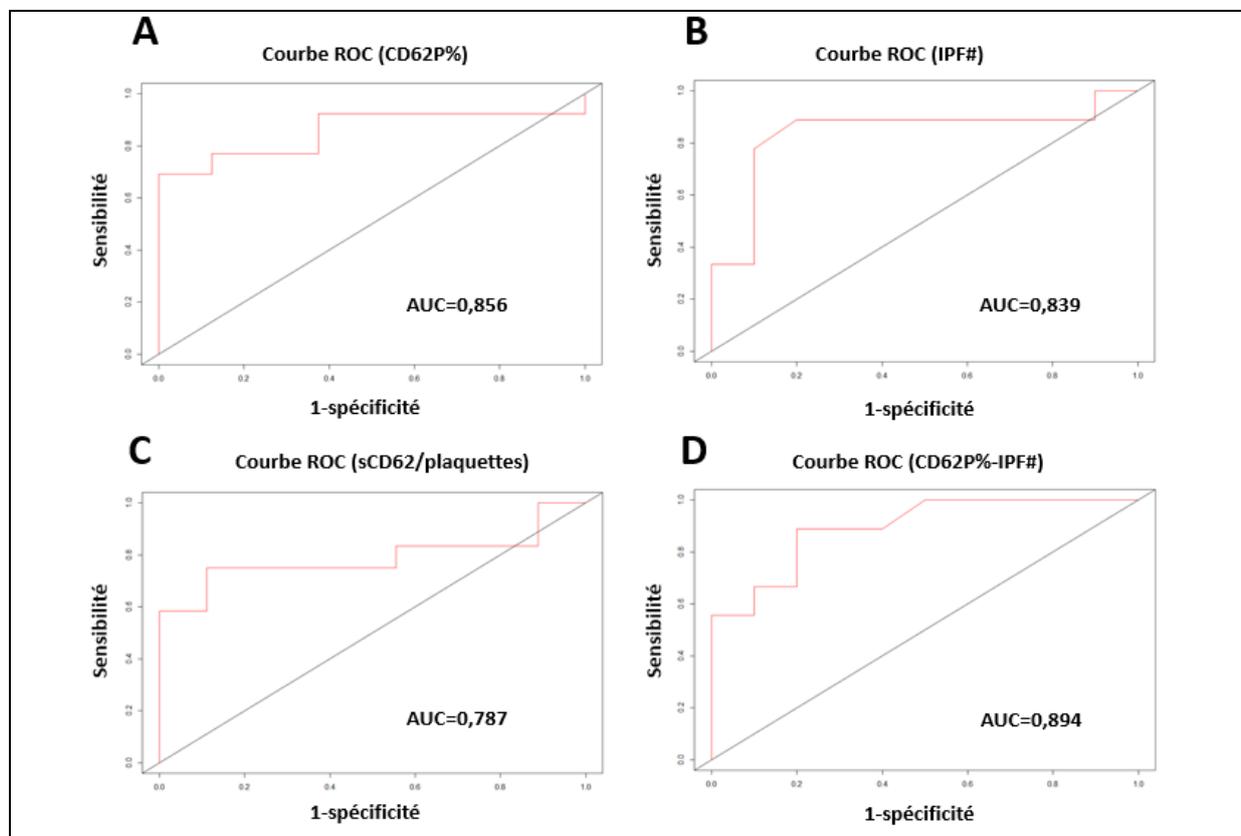


Figure 12 : Analyse des courbes ROC pour discriminer PTI et thrombopénie constitutionnelle.

A. Courbe ROC analysant le pourcentage de plaquettes CD62P+ (CD62P%). **B.** Courbe ROC analysant l'IPF# (G/L). **C.** Courbe ROC analysant le taux de P sélectine soluble normalisé sur la numération plaquettaire (sCD62P/plaquettes). **D.** Courbe ROC analysant le score composite comprenant l'IPF# et le CD62P%.

IPF# : immature platelet fraction en valeur absolue ; %CD62P : pourcentage de plaquettes CD62P+; ROC: receiver-operating characteristic. AUC : area under curve

V) Discussion :

Mises au point de la technique d'analyse de la sialylation et de l'activation plaquettaire

La première partie de notre projet était de mettre en place une technique d'étude de la sialylation plaquettaire aisément réalisable en pratique courante. Nous avons fait le choix de travailler en plasma riche en plaquettes (PRP) afin de s'affranchir de l'étape de lavage plaquettaire. La technique de lavage des plaquettes, permettant d'éliminer le plasma du patient, est une technique complexe et chronophage. Les multiples centrifugations à haute cinétique sont à risque d'activation plaquettaire *in vitro*, nécessitant l'ajout dans les solutions tampons de prostaglandine E1 qui est un inhibiteur de l'activation et de l'agrégation plaquettaire (150). Pour réaliser les prélèvements sanguins, nous avons privilégié des tubes de type S- Monovette (STARSTEDT) contenant du CTAD. Les tubes Monovette employés n'ont pas de pression négative avant le prélèvement permettant un écoulement lent et continu du sang dans le tube limitant l'activation plaquettaire au moment du prélèvement (151). Le CTAD est un anticoagulant comprenant du citrate et 3 inhibiteurs de l'activation plaquettaire. Nous avons conversé ce type de tube et d'anticoagulant afin de prévenir une activation plaquettaire *in vitro*.

Les analyses séquentielles réalisées sur tubes de type S- Monovette (STARSTEDT) CTAD ont permis de déterminer avec précision le délai maximal acceptable entre le prélèvement et l'analyse en cytométrie en flux. Nous démontrons ici une absence de différence significative du marquage du RCA jusqu'à 4 heures après prélèvement. A partir de H6, le marquage RCA commence à augmenter chez la plupart des témoins sains. Une désialylation significative des plaquettes *in vitro* chez les volontaires sains est observée au-delà de ce délai, quelque que soit le type de tube utilisé. Ceci pourrait être expliqué par l'activation *in vitro* des plaquettes et le relargage de Neu-1 stockée dans leurs granules (115). A 24 heures du prélèvement, on observe paradoxalement une baisse du marquage RCA. Les prélèvements étant stockés en sang total, on peut supposer que la mort des leucocytes et globules rouges pourrait entraîner le relargage dans le plasma des résidus galactose, non éliminés en l'absence de lavage des plaquettes, pouvant potentiellement fixer le RCA. On peut également supposer

que les sialidases libérées *in vitro* pourraient désialyler les protéines plasmatiques fortement glycosylées et pourraient interférer avec le marquage au RCA.

Nos résultats montrent qu'il n'y a pas d'intérêt à rajouter du DANA dans les tubes de prélèvement afin d'allonger le délai entre le prélèvement et l'analyse. Ceci pourrait être expliqué par une quantité insuffisante de DANA. Nous avons en effet utilisé le DANA à une concentration rapportée comme inhibitrice de la désialylation plaquettaire *in vitro* (115,141) dans une solution de plaquettes lavées ou du PRP alors que dans notre travail, le DANA a été ajouté dans le tube de prélèvement rempli avec du sang total. Or, il est rapporté que Neu-1 est exprimé par les monocytes, les macrophages et les lymphocytes T (152,153). Le stockage du sang total pendant 24 heures pourrait donc relarguer de grandes quantités de Neu-1 à partir des plaquettes mais aussi à partir des leucocytes, dépassant ainsi les capacités inhibitrices du DANA. L'hypothèse alternative est que le DANA pourrait ne pas être stable en solution dans le CTAD et à température ambiante.

Nos résultats démontrent également que notre technique est capable de détecter une désialylation plaquettaire *in vitro*, induite par l'ajout de Neu-1 ou bien par un stockage prolongé des plaquettes au froid. Concernant la différence de marquage au RCA en fonction de la durée de stockage à +4°C, nos données sont cohérentes avec Rumjantseva *et al* (119) qui démontrent *in vitro* et chez la souris que le stockage au froid court (<4h) induit une exposition de résidus GlcNAc et une destruction essentiellement macrophagique, alors qu'un stockage au froid prolongé (48h) induit l'exposition de résidus galactose et une phagocytose essentiellement hépatocytaire AMR-dépendante.

Au total, nous avons fait le choix d'utiliser un type de tube de prélèvement et d'anticoagulant limitant autant que possible l'activation plaquettaire. Nous validons que notre technique est capable de détecter une désialylation plaquettaire. Les avantages de notre technique sont qu'elle est réalisable rapidement au laboratoire et ne nécessite pas d'expertise spécifique du fait de l'absence de lavage des plaquettes. En revanche, la principale contrainte réside dans le délai maximal de 4 heures à respecter entre le prélèvement et l'analyse en cytométrie en flux.

L'analyse de la sialylation plaquettaire ne permet pas de distinguer les patients ayant un PTI et ceux ayant une thrombopénie constitutionnelle.

Nos résultats ne permettent pas de mettre en évidence de différence significative concernant la sialylation des plaquettes entre les 3 groupes de patients. Nous démontrons cependant que les plaquettes des patients PTI et des patients avec thrombopénie chimio-induite ont une désialylation plus importante que les sujets contrôles. La présence d'anticorps anti-plaquettes semble associée à une plus forte désialylation plaquettaire : parmi les 5 patients ayant un ratio MFI RCA/CD41 élevé (>2), 3 ont des anticorps anti-plaquettes détectables. Ceci est en accord avec les résultats de Grodzielski *et al* (142) et de Tao *et al* (154). Les auteurs retrouvent une plus forte désialylation plaquettaire en présence de plasma de PTI versus des plasmas contrôle, et une tendance à une plus forte désialylation en cas de positivité des anticorps anti-plaquettes. Les deux équipes observent une tendance à une plus forte désialylation chez les patients avec anti-GPIIb, mais aucune différence statistique de sialylation entre la présence d'anti-GPIIb ou d'anti-GPIIbIIIa n'est confirmée.

Ces données suggèrent que la présence d'auto-anticorps est associée à une plus forte désialylation, peu importe leur cible antigénique contrairement à ce qui avait été rapporté chez la souris. Dans la publication de Li *et al* (141), les auteurs observent que certains anti-GPIIbIIIa seraient capables d'activer et de désialyler faiblement les plaquettes et que certains anti-GPIIb en sont en revanche incapables. De plus, Quach *et al* (155) démontrent que seulement certains anticorps anti-GPIIb sont capables d'activer et de désialyler les plaquettes *in vitro*. Cette propriété est liée à la force de dissociation nécessaire pour détacher l'anticorps de son épitope. Ainsi, lorsque l'anticorps présente une forte affinité pour la GPIIb il ne se dissocie pas des plaquettes, mais exerce par effet de traction un changement de conformation d'un domaine de la GPIIb, qui présente une fonction de mécanorécepteur. Ce changement de conformation déclenche un signal d'activation intracellulaire conduisant à l'activation et à la désialylation plaquettaire (104,155).

Au total, la présence d'auto-anticorps anti-plaquettes est associée à une désialylation plaquettaire plus importante, indépendamment de leur cible antigénique.

A notre connaissance, il n'y a pas d'étude rapportant l'analyse de la sialylation plaquettaire au cours des thrombopénies constitutionnelles. Lorsque l'on compare le marquage RCA des

patients avec thrombopénie constitutionnelle aux sujets sains, il n'est pas observé de différence significative. Cependant notre cohorte ne comprend que 9 patients ne présentant que 4 étiologies différentes de thrombopénie constitutionnelles. L'apport de cette étude de la sialylation dans le cadre des thrombopénies constitutionnelles pourrait toutefois s'avérer utile dans de rares cas. En effet, il a été rapporté de rares cas de thrombopénies constitutionnelles associées à des anomalies de glycosylation des plaquettes, avec pour certaines d'entre elles une désialylation plaquettaire anormale et une clairance accélérée. Plusieurs cas de macrothrombopénies dans des familles consanguines ont été associées à des mutations homozygotes d'une gène codant pour une enzyme clé dans la synthèse de l'acide sialique (148,156), ou bien codant pour un transporteur spécifique du CMP-acide sialique vers l'appareil de Golgi essentiel dans la biosynthèse des protéines sialylées (157).

Au total, l'étude de la sialylation plaquettaire seule ne semble pas un outil fiable pour distinguer PTI et thrombopénie constitutionnelle. En effet, contrairement aux premiers travaux rapportés, seulement certains patients PTI ont une désialylation plaquettaire significative, indépendamment du type d'auto-anticorps. A l'inverse, il a été décrit, certes de façon exceptionnelle, des thrombopénies constitutionnelles liées à des anomalies de la glycosylation plaquettaire, avec des plaquettes fortement désialylées.

L'analyse de la sialylation pourrait avoir un intérêt pronostique au cours du PTI

Au niveau pronostique, l'analyse de la désialylation plaquettaire pourrait être un outil prédictif de la réponse thérapeutique aux différents traitements de fond du PTI. Dans notre cohorte, on peut noter que les 3 patients ayant le ratio MFI RCA/CD41 le plus élevé sont tous en échec de splénectomie et que deux d'entre eux sont multi-réfractaires avec des anticorps anti-GPIIb. L'association entre la présence d'anti-GPIIb et le taux de réponse aux traitements de fond comme la splénectomie est débattu. Il a été rapporté que les patients en échec de splénectomie (135) et les patients multi-réfractaires (158) ont plus fréquemment des anti-GPIIb. A l'inverse, pour Rogier *et al* la présence d'anti-GPIIb n'était pas associée à un risque plus élevé d'échec de splénectomie (159). Concernant les TPO-Ra, dans une étude rétrospective récente aucune relation entre la présence autoanticorps anti-plaquettes et la réponse aux TPO-Ra n'a été mise en évidence (160). Nos données semblent aller également dans le sens des résultats de Revilla *et al* (158) qui mettent en évidence que les patients PTI

multi-réfractaires ont un marquage RCA significativement plus élevé que les autres patients PTI. Ceci reste bien entendu à démontrer sur un effectif de patients plus important, avec une analyse standardisée de la sialylation plaquettaire.

Concernant la réponse aux traitements de première ligne, les 3 patients PTI résistants à la corticothérapie et/ou aux IgIV dans notre cohorte ont également un ratio MFI RCA/CD41 plus élevé que les patients sensibles et deux d'entre eux. Nos résultats sont cohérents avec la littérature, dans laquelle la résistance aux traitements de première ligne et la désialylation plaquettaire a déjà été rapportée au cours du PTI (154,161,162). Les patients non-répondeurs ont des plaquettes plus fortement désialylées. Dans notre cohorte, 2 des 3 patients résistants aux traitements de première ligne ont des anti-GPIIb détectables, associée à des anti-GPIIbIIIa. Il a été également rapporté que la présence d'anticorps anti-GPIIb était associée à une moindre réponse à la corticothérapie (139) mais surtout aux IgIV (136–138). Ces observations sont cohérentes avec l'hypothèse selon laquelle il existe deux principaux mécanismes de destruction plaquettaire médiés par les auto-anticorps au cours du PTI : l'un médié par les anticorps anti-GPIIbIIIa et sensible aux IgIV car étant Fc-dépendant, conduisant à la phagocytose des plaquettes par les macrophages spléniques après fixation du fragment Fc sur les récepteurs FcγR. L'autre liée à une activation et une désialylation plaquettaire médiée par les anti-GPIIb, conduisant à leur phagocytose par les hépatocytes après avoir été reconnues par l'AMR (163,164). Cependant, il semble que la dichotomie entre ces deux mécanismes décrits dans les modèles murins ne semble pas si claire chez l'homme car plusieurs travaux récents ne retrouvent pas l'association entre la présence d'anti-GPIIb et la résistance aux IgIV initialement décrite (159,160). Ces deux mécanismes de destruction coexistent sûrement au sein d'un même patient, comme cela a pu être montré dans un travail récent étudiant différents mécanismes pathogéniques en parallèle, dont la sialylation plaquettaire (142).

La spécificité des auto-anticorps anti-plaquettes ne semble donc pas être un bon marqueur prédictif de la réponse thérapeutique. Dans notre travail, nous analysons directement des conséquences des auto-anticorps sur la sialylation des plaquettes et une forte désialylation semble associée à une moindre réponse aux traitements de première ligne, voire à la splénectomie. L'analyse de la sialylation plaquettaire pourrait identifier un sous-groupe de patients réfractaires, pouvant tirer bénéfice d'un traitement ciblant les mécanismes de

désialylation pathologique et donc avoir un intérêt thérapeutique. L'utilisation d'inhibiteur de sialidase combiné à d'autres traitements ont déjà été rapportés dans quelques cas cliniques chez des patients PTI réfractaires (143,144,165,166). Ces données préliminaires doivent cependant être interprétées avec précaution et l'association entre désialylation et réponse thérapeutique tout comme l'efficacité des inhibiteurs de sialidase devront être confirmés sur un effectif plus important de façon prospective.

L'étude de l'état d'activation plaquettaire pourrait permettre le diagnostic différentiel entre PTI et thrombopénie constitutionnelle

Nos résultats montrent que la proportion de plaquettes activées, mise en évidence par le pourcentage de plaquettes CD62P positives, est plus élevée dans le groupe PTI comparé aux deux autres groupes de patients et particulièrement celui des thrombopénies constitutionnelles. Ce marqueur pourrait constituer une aide au diagnostic différentiel entre PTI et thrombopénie constitutionnelle. En choisissant un seuil de CD62P% à 11%, la sensibilité et la spécificité sont respectivement à 87,5% et 76,9%, avec une bonne valeur prédictive négative estimée à 91%. Ainsi, une valeur de CD62P% supérieure à 11% permet d'écarter le diagnostic différentiel de thrombopénie constitutionnelle dans plus de 90% des cas.

La P sélectine (CD62P) est une molécule d'adhésion exprimée dans les granules α plaquettaire et dans les corps de Weibel-Palade des cellules endothéliales (167,168). Son expression membranaire est fortement augmentée en cas d'activation de ces deux cellules (169,170). Il s'agit d'un des principaux marqueurs membranaires d'activation plaquettaire.

Nos résultats sont concordants avec les résultats de plusieurs équipes (141,171–177) qui retrouvent une expression plus importante de P-sélectine chez les patients PTI. Ce pourcentage élevé de plaquettes CD62P+ chez les patients PTI pourrait être due à l'activation non spécifique des plaquettes par les auto-anticorps. Li *et al* (141) retrouvent une augmentation d'expression de la P-sélectine à la surface de plaquettes témoins en présence de plasma de patients PTI contenant un anti-GPIIb/IIIa, et de façon plus importante en présence d'anticorps anti-GPIb *in vitro*. Il a été montré que l'immunoabsorption essayée au cours du PTI multi réfractaire permettait de réduire le pourcentage de plaquettes CD62P

positives, renforçant l'hypothèse d'un mécanisme d'activation plaquettaire médié par les anticorps (176).

L'expression de la P sélectine plaquettaire au cours des thrombopénies constitutionnelles a été peu étudiée. Ignatova *et al* (175) ont évalué l'expression en MFI du CD62P plaquettaire de patients atteints de thrombopénies constitutionnelles. Ils retrouvent une forte expression de CD62P au cours des macrothrombopénies et au contraire, faible au cours des microthrombocytopenies. Le niveau d'expression de CD62P est fortement corrélé à la taille des plaquettes, ce qui justifie de le normaliser à la valeur des MFI des glycoprotéines plaquettaires ou au FSC afin de prendre en compte leur taille.

Nous retrouvons une augmentation de la P Sélectine chez les PTI comparativement aux patients avec thrombopénie chimio-induite. Concernant les thrombopénies centrales, Psaila *et al* (65) ne retrouvent pas de différence significative d'expression de la P sélectine entre les patients PTI et les patients présentant une leucémie aiguë myéloblastique ou un syndrome myélodysplasique. Il faut noter qu'aucun des patients du groupe leucémie/myélodysplasie n'avait reçu de chimiothérapie cytotoxique avant analyse, ce qui pourrait expliquer la discordance avec nos résultats.

Nous ne mettons pas en évidence de corrélation entre l'état de sialylation et le niveau d'activation plaquettaire. Les 4 patients PTI de notre cohorte ayant les pourcentages de plaquettes CD62P+ les plus élevés n'ont pas la désialylation la plus forte et n'ont pas d'anticorps anti- plaquettes détectables en MAIPA. Nos résultats sont cohérents avec Grodzielski *et al* (142), qui ne retrouvent pas de corrélation entre désialylation et activation plaquettaire sur des plaquettes témoins incubées avec du plasma de patient PTI. A l'inverse de Li *et al* (141) qui ont démontré *in vitro* et *in vivo* chez la souris qu'il existe un lien fort entre désialylation et activation plaquettaire, avec la présence d'une boucle de rétrocontrôle positive entre les deux phénomènes. Cependant ces derniers résultats ont été obtenus avec des anticorps anti-GPIIb et anti-GPIIbIIIa de souris et non issus du plasma de patients PTI positifs pour ces deux auto-anticorps.

Dans notre travail, il ne semble pas y avoir non plus de corrélation entre phénotype hémorragique et expression de P sélectine plaquettaire. Cependant au vu du faible effectif de patients ayant un syndrome hémorragique, il est difficile de pouvoir conclure sur cette

question. La corrélation entre activation plaquettaire *in vivo* et syndrome hémorragique clinique est débattue au cours du PTI. Deux travaux récents suggèrent qu'une forte expression de P-sélectine plaquettaire est associée à un score hémorragique élevé (70,172). A l'inverse, Panzer *et al* (171) ne retrouvent pas cette association entre phénotype hémorragique et expression de P sélectine. Ces résultats doivent être interprétés avec précaution, car les patients PTI étudiés sont hétérogènes (PTI actif, ou en rémission, fortement thrombopénique ou pas, traité ou sans traitement), de même que les protocoles de prélèvement ou d'analyse en cytométrie en flux.

Nos résultats montrent enfin que le taux de sCD62P normalisé sur le taux de plaquettes est plus élevé dans le groupe PTI comparativement au groupe thrombopénie constitutionnelle, ce qui est cohérent avec nos observations sur le CD62P membranaire en cytométrie en flux. Les performances diagnostiques de la P sélectine soluble pour distinguer PTI et thrombopénie constitutionnelle sont en revanche un peu moins bonnes que celles du CD62P% en cytométrie en flux.

La principale source de P-sélectine soluble provient des plaquettes (170), principalement par clivage de sa forme membranaire (178). Son taux plasmatique est corrélé à la numération plaquettaire (149,167,168). Panzer *et al* (149) ont dosé la P-sélectine dans différentes situations de thrombopénies et de thrombocytose et ont normalisé le résultat des dosages sur le compte plaquettaire. Ces derniers retrouvent alors une augmentation significative de la P-sélectine soluble au cours du PTI comparativement aux contrôles et aux patients avec une thrombopénie centrale.

A notre connaissance, il n'existe pas de travaux ayant évalué le dosage de la P sélectine soluble au cours des thrombopénies constitutionnelles. Notre travail est le premier à l'avoir comparé à une population de patients PTI et à avoir montré une différence statistique.

Les principales limites de notre travail sont le faible effectif de patients, particulièrement dans le groupe PTI. Dans notre cohorte, seulement 2 patients PTI ont des anticorps anti-GPIIb détectable en MAIPA. Ainsi, il est difficile de comparer l'état de sialylation et les caractéristiques cliniques des patients anti-GPIIb positifs avec les patients PTI sans ces anticorps. De plus, seulement 6 patients PTI sur 13 ont déjà reçu au moins un traitement de fond et 3 seulement ont eu une splénectomie. De ce fait, il est également difficile de corrélér

l'état de sialylation plaquettaire avec la réponse thérapeutique ou bien avec le pronostic. Par ailleurs, les valeurs de l'IPF n'étaient pas disponibles pour tous les patients malgré le design prospectif.

Nous avons étudié l'état de sialylation plaquettaire en utilisant uniquement le RCA, une lectine spécifique des résidus galactose. D'autres résidus glucidiques sont recouverts d'acide sialique comme le GalNAc ou le GlcNAc et peuvent être reconnus par d'autres molécules appartenant également à la famille des lectines. Ainsi, l'utilisation d'un seul marqueur ne permet pas d'étudier de façon exhaustive l'état de sialylation à la surface des plaquettes, pouvant être potentiellement différent selon les patients. L'utilisation de panels de cytométrie multiparamétriques apporterait plus d'information sur les phénomènes de désialylation plaquettaire.

L'IPF peut être un outil pour distinguer PTI et thrombopénie constitutionnelle dans les cas complexes

Nous démontrons que l'IPF est capable de distinguer les thrombopénies centrales d'origine chimio-induite des thrombopénies périphériques comme le PTI. Nos résultats sont cohérents avec la littérature, car l'IPF% et l'IPF# sont des tests ayant démontré leur capacité à distinguer les thrombopénies d'origine centrale et périphérique (43–48). Nos résultats confirment également que l'IPF# et l'IPF% présentent une bonne corrélation avec le VPM. Cette corrélation a déjà été décrite dans la littérature (54,55).

De façon intéressante, l'IPF en valeur absolue est plus élevé de façon significative dans le groupe thrombopénie constitutionnelle comparé aux patients avec un PTI et pourrait donc avoir un intérêt dans le diagnostic différentiel entre ces deux entités. L'analyse de la courbe ROC montre que pour un seuil fixé à 11 G/L, l'IPF# présente une bonne sensibilité et une bonne spécificité, respectivement à 88,9% et 80% pour le diagnostic de thrombopénie constitutionnelle. L'IPF# présente également une bonne valeur prédictive négative, car une valeur d'IPF# <11 G/L permet d'exclure une thrombopénie constitutionnelle dans presque 90% des cas.

Deux études ont comparé la valeur de l'IPF chez des patients PTI et des patients ayant des thrombopénies constitutionnelles (32,54). Une seule d'entre elle a comparé l'IPF en valeur absolue et retrouve également une augmentation significative de l'IPF# dans le groupe

thrombopénie constitutionnelle. L'IPF# est un bon reflet de la production plaquettaire médullaire (38). Au cours du PTI il est rapporté un défaut de production médullaire due à une réponse immunitaire contre les mégacaryocytes, associée à défaut de formation et de libération des pro-plaquettes (131), ce qui explique que l'IPF# est plus bas chez les patients PTI comparativement aux sujets sains (179). Dans les thrombopénies constitutionnelles, il existe également des anomalies génétiques conduisant la plupart du temps à un défaut dans la mégacaryopoïèse (28) conduisant à la thrombopénie. La majorité de nos patients ayant des thrombopénies constitutionnelles ont des mutations dans des gènes impliqués dans la maturation mégacaryocytaire pouvant expliquer le nombre plus important de plaquettes immatures en circulation comparativement aux patients PTI. Il faut noter que deux patients PTI ayant les valeurs d'IPF# élevées étaient traités par TPO-Ra. Il est rapporté que les patients répondeurs sous TPO-Ra ont un IPF# augmenté (177).

Nos résultats ne retrouvent en revanche pas de différence significative concernant l'IPF% entre les patients avec PTI et thrombopénie constitutionnelle. Les 3 patients de notre groupe de patients PTI ayant une maladie active avec thrombopénie <30G/L ont des IPF% parmi les plus élevés. Il a été montré que l'IPF% est augmenté chez les patients PTI comparé à une population contrôle et particulièrement en cas de maladie active avec une corrélation entre la valeur de l'IPF% et la numération plaquettaire (44,45,49). Dans notre groupe thrombopénie constitutionnelle, les patients ayant les IPF% les plus élevés sont ceux ayant une macrothrombopénie à savoir les deux patients ayant un syndrome de Bernard Soulier et dans une moindre mesure les deux patients ayant une mutation hétérozygote de la GPIIB. Ces résultats sont cohérents avec la littérature, où il est décrit que les patients avec une macrothrombopénie constitutionnelle ont un IPF% particulièrement élevé (32,54). Notre cohorte de patients avec thrombopénie constitutionnelle est hétérogène, avec des macrothrombopénies et thrombopénies avec plaquettes de taille normale pouvant expliquer l'absence de différence significative concernant l'IPF%. Dans le groupe de patients PTI, deux patients ont un IPF% >35% dont l'un sous traitement par TPO-Ra. Les TPO-Ra en stimulant la mégacaryopoïèse pourraient potentiellement augmenter la valeur de l'IPF% en augmentant la proportion de plaquettes immatures circulantes. Cependant à notre connaissance dans les études rapportant la mesure de l'IPF% au cours du PTI, aucune n'a rapportée de patients sous TPO-Ra. Dans notre travail, un IPF élevé >35% est fortement évocateur de

macrothrombopénie constitutionnelle. Ferreira *et al* (32) ont comparé l'IPF% de patients PTI à celui de patients avec macrothrombopénies constitutionnelles. Les auteurs mettent évidence que les patients avec macrothrombopénie constitutionnelle ont un IPF% significativement plus élevé que les patients PTI. L'intérêt de l'IPF% semble donc être limité au diagnostic différentiel entre les patients PTI et ceux avec une macrothrombopénie constitutionnelle.

Etant donné l'hétérogénéité clinique des patients atteints de PTI et de thrombopénie constitutionnelle, il semble illusoire de pouvoir distinguer ces deux entités avec un seul biomarqueur. En revanche, la combinaison de plusieurs biomarqueurs intégré dans un score pourrait permettre de mieux les séparer. Nous avons combiné des valeurs de l'IPF# et du CD62P% dans un score composite. Ce score présente une bonne sensibilité et spécificité en soi, mais n'apporte pas de meilleures performances diagnostiques comparativement aux deux variables séparément. Du fait des faibles effectifs de patients, la prise en compte de plus de deux variables dans un score n'a pas pu être réalisée.

Au total, nos résultats suggèrent que l'IPF# pourrait être un outil intéressant pour distinguer les patients avec un PTI de ceux ayant une thrombopénie constitutionnelle. Ce paramètre peut orienter le diagnostic dans les cas complexes. L'IPF% pourrait également être utile, mais il présente des limites car il semble beaucoup moins performant pour distinguer PTI et thrombopénie constitutionnelle avec des plaquettes de taille normale ou diminuée.

VI) Conclusion:

Notre travail a permis de mettre au point une technique d'analyse de la sialylation plaquettaire par cytométrie en flux en pratique courante.

Nos résultats obtenus sur les patients mettent en évidence que l'analyse de la sialylation plaquettaire n'est pas un outil fiable pour le diagnostic différentiel entre PTI et thrombopénie constitutionnelle. En revanche, elle pourrait avoir un intérêt pronostique chez les patients atteints de PTI, car une désialylation importante semble être associée à des patients réfractaires aux traitements de première ligne et à la splénectomie, indépendamment de la cible antigénique des auto-anticorps. De plus, l'analyse de la sialylation pourrait identifier un sous-groupe de patients chez qui l'utilisation d'un inhibiteur de sialidase pourrait être pertinente.

Chez les patients PTI, le pourcentage de plaquettes activées est plus élevé que chez les patients ayant une thrombopénie constitutionnelle. A l'inverse, les patients PTI ont un taux plus faible de plaquettes immatures circulantes. L'état activation plaquettaire, et la numération des plaquettes immatures sont des biomarqueurs intéressants pour distinguer les patients ayant un PTI et ceux ayant une thrombopénie constitutionnelle dans les cas complexes. L'association de de ces 2 biomarqueurs dans un score composite n'apporte pas de bénéfice diagnostique supplémentaire

VII) Références bibliographiques :

1. Harrington WJ, Minnich V, Hollingsworth JW, Moore CV. Demonstration of a thrombocytopenic factor in the blood of patients with thrombocytopenic purpura. *J Lab Clin Med.* juill 1951;38(1):1-10.
2. Rodeghiero F, Stasi R, Gernsheimer T, Michel M, Provan D, Arnold DM, et al. Standardization of terminology, definitions and outcome criteria in immune thrombocytopenic purpura of adults and children: report from an international working group. *Blood.* 12 mars 2009;113(11):2386-93.
3. Piel-Julian M-L, Mahévas M, Germain J, Languille L, Comont T, Lapeyre-Mestre M, et al. Risk factors for bleeding, including platelet count threshold, in newly diagnosed immune thrombocytopenia adults. *Journal of Thrombosis and Haemostasis.* sept 2018;16(9):1830-42.
4. Ekstrand C, Linder M, Baricault B, Lafaurie M, Sailler L, Lapeyre-Mestre M, et al. Impact of risk factors on the occurrence of arterial thrombosis and venous thromboembolism in adults with primary immune thrombocytopenia – Results from two nationwide cohorts. *Thrombosis Research.* juin 2019;178:124-31.
5. McMillan R, Bussel JB, George JN, Lalla D, Nichol JL. Self-reported health-related quality of life in adults with chronic immune thrombocytopenic purpura. *American Journal of Hematology.* févr 2008;83(2):150-4.
6. Frederiksen H, Maegbaek ML, Nørgaard M. Twenty-year mortality of adult patients with primary immune thrombocytopenia: a Danish population-based cohort study. *British Journal of Haematology.* 1 juill 2014;166(2):260-7.
7. Moulis G, Palmaro A, Montastruc J-L, Godeau B, Lapeyre-Mestre M, Sailler L. Epidemiology of incident immune thrombocytopenia: a nationwide population-based study in France. *Blood.* 20 nov 2014;124(22):3308-15.
8. Provan D, Arnold DM, Bussel JB, Chong BH, Cooper N, Gernsheimer T, et al. Updated international consensus report on the investigation and management of primary immune thrombocytopenia. *Blood Adv.* 26 nov 2019;3(22):3780-817.
9. Godeau B. Aladjidi N, filière MaRIH. Protocole National de Diagnostic et de Soins (PNDS)- Purpura thrombopénique immunologique de l'enfant et de l'adulte [Internet]. Disponible sur :[https://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2017-03/dir3/pnds 25 - purpura thrombopenique immunologique de l'enfant et de l'adulte -2017](https://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2017-03/dir3/pnds_25_purpura_thrombopenique_immunologique_de_l'enfant_et_de_l'adulte_-2017).
10. Miltiados O, Hou M, Bussel JB. Identifying and treating refractory ITP: difficulty in diagnosis and role of combination treatment. *Blood.* 13 févr 2020;135(7):472-90.
11. Espitia O, Ternisien C, Agard C, Boisseau P, Denis CV, Fouassier M. Use of a thrombopoietin receptor agonist in von Willebrand disease type 2B (p.V1316M) with severe thrombocytopenia and intracranial hemorrhage. *Platelets.* 4 juill 2017;28(5):518-20.

12. Sadler JE, Budde U, Eikenboom JCJ, Favaloro EJ, Hill FGH, Holmberg L, et al. Update on the pathophysiology and classification of von Willebrand disease: a report of the Subcommittee on von Willebrand Factor. *J Thromb Haemost.* oct 2006;4(10):2103-14.
13. Casari C, Du V, Wu Y-P, Kauskot A, de Groot PG, Christophe OD, et al. Accelerated uptake of VWF/platelet complexes in macrophages contributes to VWD type 2B-associated thrombocytopenia. *Blood.* 17 oct 2013;122(16):2893-902.
14. Jackson SC, Sinclair GD, Cloutier S, Duan Z, Rand ML, Poon M-C. The Montreal platelet syndrome kindred has type 2B von Willebrand disease with the VWF V1316M mutation. *Blood.* 2 avr 2009;113(14):3348-51.
15. Nurden AT, Federici AB, Nurden P. Altered megakaryocytopoiesis in von Willebrand type 2B disease. *J Thromb Haemost.* juill 2009;7 Suppl 1:277-81.
16. Johnson B, Fletcher SJ, Morgan NV. Inherited thrombocytopenia: novel insights into megakaryocyte maturation, proplatelet formation and platelet lifespan. *Platelets.* 17 août 2016;27(6):519-25.
17. Toriello HV. Thrombocytopenia-absent radius syndrome. *Semin Thromb Hemost.* sept 2011;37(6):707-12.
18. Germeshausen M, Ancliff P, Estrada J, Metzler M, Ponstingl E, Rüttschle H, et al. MECOM-associated syndrome: a heterogeneous inherited bone marrow failure syndrome with amegakaryocytic thrombocytopenia. *Blood Adv.* 27 2018;2(6):586-96.
19. Paradisi I, Arias S. IVIC syndrome is caused by a c.2607delA mutation in the SALL4 locus. *Am J Med Genet A.* 15 févr 2007;143(4):326-32.
20. Baccini V, Alessi MC. Les thrombopénies constitutionnelles : démarche diagnostique. *La Revue de Médecine Interne.* 1 févr 2016;37(2):117-26.
21. Almazni I, Stapley R, Morgan NV. Inherited Thrombocytopenia: Update on Genes and Genetic Variants Which may be Associated With Bleeding. *Frontiers in Cardiovascular Medicine-2019*
22. Liew E, Owen C. Familial myelodysplastic syndromes: a review of the literature. *Haematologica.* oct 2011;96(10):1536-42.
23. Di Paola J, Porter CC. ETV6-related thrombocytopenia and leukemia predisposition. *Blood.* 22 août 2019;134(8):663-7.
24. Noris P, Favier R, Alessi M-C, Geddis AE, Kunishima S, Heller PG, et al. ANKRD26-related thrombocytopenia and myeloid malignancies. *Blood.* 12 sept 2013;122(11):1987-9.
25. Waisbren J, Dinner S, Altman J, Frankfurt O, Helenowski I, Gao J, et al. Disease characteristics and prognosis of myelodysplastic syndrome presenting with isolated thrombocytopenia. *Int J Hematol.* janv 2017;105(1):44-51.

26. Qian J, Xue Y, Pan J, Cen J, Wang W, Chen Z. Refractory thrombocytopenia, an unusual myelodysplastic syndrome with an initial presentation mimicking idiopathic thrombocytopenic purpura. *Int J Hematol.* févr 2005;81(2):142-7.
27. Font P, Loscertales J, Soto C, Ricard P, Novas CM-, Martín-Clavero E, et al. Interobserver variance in myelodysplastic syndromes with less than 5 % bone marrow blasts: unilineage vs. multilineage dysplasia and reproducibility of the threshold of 2 % blasts. *Ann Hematol.* avr 2015;94(4):565-73.
28. Nurden AT, Nurden P. Inherited thrombocytopenias: history, advances and perspectives. *Haematologica.* août 2020;105(8):2004-19.
29. Noris P, Klersy C, Zecca M, Arcaini L, Pecci A, Melazzini F, et al. Platelet size distinguishes between inherited macrothrombocytopenias and immune thrombocytopenia. *Journal of Thrombosis and Haemostasis.* 2009;7(12):2131-6.
30. Fiore M, Pillois X, Lorrain S, Bernard M-A, Moore N, Sié P, et al. A diagnostic approach that may help to discriminate inherited thrombocytopenia from chronic immune thrombocytopenia in adult patients. *Platelets.* 17 août 2016;27(6):555-62.
31. Savoia A, De Rocco D, Panza E, Bozzi V, Scandellari R, Loffredo G, et al. Heavy chain myosin 9-related disease (MYH9 -RD): neutrophil inclusions of myosin-9 as a pathognomonic sign of the disorder. *Thromb Haemost.* avr 2010;103(4):826-32.
32. Ferreira FLB, Colella MP, Medina SS, Costa-Lima C, Fiusa MML, Costa LNG, et al. Evaluation of the immature platelet fraction contribute to the differential diagnosis of hereditary, immune and other acquired thrombocytopenias. *Scientific Reports.* 13 juin 2017;7(1):3355.
33. Harrison P, Goodall AH. "Message in the Platelet" – more than just vestigial mRNA! *Platelets.* 1 janv 2008;19(6):395-404.
34. Robinson, Mackie, Khair, Liesner, Goodall, Savidge, et al. Flow cytometric analysis of reticulated platelets: evidence for a large proportion of non-specific labelling of dense granules by fluorescent dyes. *British Journal of Haematology.* 25 déc 2001;100(2):351-7.
35. Kienast J, Schmitz G. Flow cytometric analysis of thiazole orange uptake by platelets: a diagnostic aid in the evaluation of thrombocytopenic disorders. *Blood.* 1 janv 1990;75(1):116-21.
36. Richards EM, Baglin TP. Quantitation of reticulated platelets: methodology and clinical application. *Br J Haematol.* oct 1995;91(2):445-51.
37. Ingram M, Coopersmith A. Reticulated Platelets following Acute Blood Loss. *British Journal of Haematology.* 17(3):225-9.
38. Benlachgar N, Doghmi K, Masrar A, Mahtat EM, Harmouche H, Tazi Mezalek Z. Immature platelets: a review of the available evidence. *Thrombosis Research.* 1 nov 2020;195:43-50.

39. Jung H, Jeon H-K, Kim H-J, Kim S-H. Immature Platelet Fraction: Establishment of a Reference Interval and Diagnostic Measure for Thrombocytopenia. *The Korean Journal of Laboratory Medicine*. 1 oct 2010;30(5):451-9.
40. Ko YJ, Hur M, Kim H, Choi SG, Moon H-W, Yun Y-M. Reference interval for immature platelet fraction on Sysmex XN hematology analyzer: a comparison study with Sysmex XE-2100. *Clin Chem Lab Med*. juin 2015;53(7):1091-7.
41. Joergensen MK, Bathum L. Reference intervals for mean platelet volume and immature platelet fraction determined on a sysmex XE5000 hematology analyzer. *Scand J Clin Lab Invest*. 2016;76(2):172-6.
42. Ali U, Knight G, Gibbs R, Tsitsikas DA. Reference intervals for absolute and percentage immature platelet fraction using the Sysmex XN-10 automated haematology analyser in a UK population. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*. 17 nov 2017;77(8):658-64.
43. Li J, Li Y, Ouyang J, Zhang F, Liang C, Ye Z, et al. Immature platelet fraction related parameters in the differential diagnosis of thrombocytopenia. *Platelets*. 17 août 2020;31(6):771-6.
44. Abe Y, Wada H, Tomatsu H, Sakaguchi A, Nishioka J, Yabu Y, et al. A simple technique to determine thrombopoiesis level using immature platelet fraction (IPF). *Thrombosis Research*. 1 janv 2006;118(4):463-9.
45. Briggs C, Kunka S, Hart D, Oguni S, Machin SJ. Assessment of an immature platelet fraction (IPF) in peripheral thrombocytopenia. *British Journal of Haematology*. 126(1):93-9.
46. Sakuragi M, Hayashi S, Maruyama M, Kabutomori O, Kiyokawa T, Nagamine K, et al. Clinical significance of IPF% or RP% measurement in distinguishing primary immune thrombocytopenia from aplastic thrombocytopenic disorders. *Int J Hematol*. 1 avr 2015;101(4):369-75.
47. Cybulska A, Meintker L, Ringwald J, Krause SW. Measurements of immature platelets with haematology analysers are of limited value to separate immune thrombocytopenia from bone marrow failure. *British Journal of Haematology*. 177(4):612-9.
48. Van De Wyngaert Z, Fournier E, Bera E, Carrette M, Soenen V, Gauthier J, et al. Immature platelet fraction (IPF): A reliable tool to predict peripheral thrombocytopenia. *Current Research in Translational Medicine*. 1 janv 2020;68(1):37-42.
49. Adly AAM, Ragab IA, Ismail EAR, Farahat MM. Evaluation of the immature platelet fraction in the diagnosis and prognosis of childhood immune thrombocytopenia. *Platelets*. 3 oct 2015;26(7):645-50.
50. McDonnell A, Bride KL, Lim D, Paessler M, Witmer CM, Lambert MP. Utility of the immature platelet fraction in pediatric immune thrombocytopenia: Differentiating from bone marrow failure and predicting bleeding risk. *Pediatric Blood & Cancer*. 65(2):e26812.
51. Strauß G, Vollert C, Stackelberg A von, Weimann A, Gaedicke G, Schulze H. Immature platelet count: A simple parameter for distinguishing thrombocytopenia in pediatric acute lymphocytic leukemia from immune thrombocytopenia. *Pediatric Blood & Cancer*. 1 oct 2011;57(4):641-7.

52. van der Linden N, Klinkenberg LJJ, Meex SJR, Beckers EAM, de Wit NCJ, Prinzen L. Immature platelet fraction measured on the Sysmex XN hemocytometer predicts thrombopoietic recovery after autologous stem cell transplantation. *Eur J Haematol.* août 2014;93(2):150-6.
53. Latger-Cannard V, Hoarau M, Salignac S, Baumgart D, Nurden P, Lecompte T. Mean platelet volume: comparison of three analysers towards standardization of platelet morphological phenotype. *International Journal of Laboratory Hematology.* 2012;34(3):300-10.
54. Miyazaki K, Koike Y, Kunishima S, Ishii R, Danbara M, Horie R, et al. Immature platelet fraction measurement is influenced by platelet size and is a useful parameter for discrimination of macrothrombocytopenia. *Hematology.* 1 déc 2015;20(10):587-92.
55. Cesari F, Marcucci R, Caporale R, Panicia R, Romano E, Gensini GF, et al. Relationship between high platelet turnover and platelet function in high-risk patients with coronary artery disease on dual antiplatelet therapy. *Thromb Haemost.* 2008;99(11):930-5.
56. Bhat R, Pai S. Immature platelet fraction: a significant platelet parameter in asymptomatic constitutional macrothrombocytopenia. *International Journal of Laboratory Hematology.* 2016;38(3):e45-7.
57. Neunert C, Noroozi N, Norman G, Buchanan GR, Goy J, Nazi I, et al. Severe bleeding events in adults and children with primary immune thrombocytopenia: a systematic review. *Journal of Thrombosis and Haemostasis.* 1 mars 2015;13(3):457-64.
58. Zhou H, Fu R, Wang H, Zhou F, Li H, Zhou Z, et al. Immune thrombocytopenia in the elderly: clinical course in 525 patients from a single center in China. *Ann Hematol.* 1 janv 2013;92(1):79-87.
59. Cortelazzo S, Finazzi G, Buelli M, Molteni A, Viero P, Barbui T. High risk of severe bleeding in aged patients with chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. *Blood.* 1991;77(1):31–33.
60. Greene LA, Chen S, Seery C, Imahiyerobo AM, Bussel JB. Beyond the platelet count: immature platelet fraction and thromboelastometry correlate with bleeding in patients with immune thrombocytopenia. *British Journal of Haematology.* 166(4):592-600.
61. Pansy J, Minkov M, Dengg R, Quehenberger F, Lackner H, Nebl A, et al. Evaluating bleeding severity in children with newly diagnosed immune thrombocytopenia: a pilot study. *Klin Padiatr.* nov 2010;222(6):374-7.
62. Melboucy-Belkhir S, Khellaf M, Augier A, Boubaya M, Levy V, Guenno GL, et al. Risk factors associated with intracranial hemorrhage in adults with immune thrombocytopenia: A study of 27 cases. *American Journal of Hematology.* 1 déc 2016;91(12):E499-501.
63. Psaila B, Petrovic A, Page LK, Menell J, Schonholz M, Bussel JB. Intracranial hemorrhage (ICH) in children with immune thrombocytopenia (ITP): study of 40 cases. *Blood.* 26 nov 2009;114(23):4777-83.
64. Guthikonda S, Alviar CL, Vaduganathan M, Arikan M, Tellez A, DeLao T, et al. Role of Reticulated Platelets and Platelet Size Heterogeneity on Platelet Activity After Dual Antiplatelet Therapy

With Aspirin and Clopidogrel in Patients With Stable Coronary Artery Disease. *Journal of the American College of Cardiology*. 26 août 2008;52(9):743-9.

65. Psaila B, Bussel JB, Frelinger AL, Babula B, Linden MD, Li Y, et al. Differences in platelet function in patients with acute myeloid leukemia and myelodysplasia compared to equally thrombocytopenic patients with immune thrombocytopenia. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 1 nov 2011;9(11):2302-10.
66. Peng J, Friese P, Heilmann E, George JN, Burstein SA, Dale GL. Aged platelets have an impaired response to thrombin as quantitated by P-selectin expression. *Blood*. 1 janv 1994;83(1):161-6.
67. Castellan RM, Steiner M. Effect of platelet age on adhesiveness to collagen and platelet surface charge. *Thromb Haemost*. 30 nov 1976;36(2):392-400.
68. Karpatkin S. Heterogeneity of human platelets. II. Functional evidence suggestive of young and old platelets. *J Clin Invest*. juin 1969;48(6):1083-7.
69. Estcourt LJ, Stanworth SJ, Harrison P, Powter G, McClure M, Murphy MF, et al. Prospective observational cohort study of the association between thromboelastometry, coagulation and platelet parameters and bleeding in patients with haematological malignancies- The ATHENA study. *British Journal of Haematology*. 1 août 2014;166(4):581-91.
70. Frelinger AL, Grace RF, Gerrits AJ, Berny-Lang MA, Brown T, Carmichael SL, et al. Platelet function tests, independent of platelet count, are associated with bleeding severity in ITP. *Blood*. 13 août 2015;126(7):873-9.
71. Lundblad A. Gunnar Blix and his discovery of sialic acids. Fascinating molecules in glycobiology. *Uppsala Journal of Medical Sciences*. 28 avr 2015;1-9.
72. Smutova V, Albohy A, Pan X, Korchagina E, Miyagi T, Bovin N, et al. Structural Basis for Substrate Specificity of Mammalian Neuraminidases. *PLOS ONE*. 15 sept 2014;9(9):e106320.
73. Miyagi T, Yamaguchi K. Mammalian sialidases: Physiological and pathological roles in cellular functions. *Glycobiology*. 1 juill 2012;22(7):880-96.
74. Varki A. Uniquely human evolution of sialic acid genetics and biology. *PNAS*. 2010;107(Supplement 2):8939-46.
75. Varki A. Biological roles of glycans. *Glycobiology*. janv 2017;27(1):3-49.
76. Mahajan VS, Pillai S. Sialic acids and autoimmune disease. *Immunological Reviews*. janv 2016;269(1):145-61.
77. Schauer R, Kamerling JP. Exploration of the Sialic Acid World. *Adv Carbohydr Chem Biochem*. 2018;75:1-213.
78. Clark EA, Giltiy NV. CD22: A Regulator of Innate and Adaptive B Cell Responses and Autoimmunity. *Front Immunol* -2018

79. Lanoue A, Batista FD, Stewart M, Neuberger MS. Interaction of CD22 with α 2,6-linked sialoglycoconjugates: innate recognition of self to dampen B cell autoreactivity? *European Journal of Immunology*. 2002;32(2):348-55.
80. Macauley MS, Crocker PR, Paulson JC. Siglec-mediated regulation of immune cell function in disease. *Nature Reviews Immunology*. oct 2014;14(10):653-66.
81. Varki A. Since there are PAMPs and DAMPs, there must be SAMPs? Glycan “self-associated molecular patterns” dampen innate immunity, but pathogens can mimic them. *Glycobiology*. 1 sept 2011;21(9):1121-4.
82. Chang Y-C, Olson J, Beasley FC, Tung C, Zhang J, Crocker PR, et al. Group B Streptococcus Engages an Inhibitory Siglec through Sialic Acid Mimicry to Blunt Innate Immune and Inflammatory Responses In Vivo. *PLOS Pathogens*. 2 janv 2014;10(1):e1003846.
83. Dobó J, Kocsis A, Gál P. Be on Target: Strategies of Targeting Alternative and Lectin Pathway Components in Complement-Mediated Diseases. *Front Immunol* -2018
84. Kajander T, Lehtinen MJ, Hyvärinen S, Bhattacharjee A, Leung E, Isenman DE, et al. Dual interaction of factor H with C3d and glycosaminoglycans in host–nonhost discrimination by complement. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 15 févr 2011;108(7):2897-902.
85. Alon R, Rosen S. Rolling on N-linked glycans: a new way to present L-selectin binding sites. *Nature Immunology*. avr 2007;8(4):339-41.
86. Pang P-C, Chiu PCN, Lee C-L, Chang L-Y, Panico M, Morris HR, et al. Human Sperm Binding Is Mediated by the Sialyl-Lewisx Oligosaccharide on the Zona Pellucida. *Science*. 23 sept 2011;333(6050):1761-4.
87. Ashwell G, Morell AG. The role of surface carbohydrates in the hepatic recognition and transport of circulating glycoproteins. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol*. 1974;41(0):99-128.
88. Grewal PK. The Ashwell-Morell receptor. *Meth Enzymol*. 2010;479:223-41.
89. Li Y, Fu J, Ling Y, Yago T, McDaniel JM, Song J, et al. Sialylation on O-glycans protects platelets from clearance by liver Kupffer cells. *PNAS*. 2017;114(31):8360-5.
90. Lutz HU, Fehr J. Total sialic acid content of glycophorins during senescence of human red blood cells. *J Biol Chem*. 25 nov 1979;254(22):11177-80.
91. Vaysse J, Gattegno L, Bladier D, Aminoff D. Adhesion and erythrophagocytosis of human senescent erythrocytes by autologous monocytes and their inhibition by beta-galactosyl derivatives. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1986;83(5):1339-43.
92. Bratosin D, Mazurier J, Tissier JP, Estaquier J, Huart JJ, Ameisen JC, et al. Cellular and molecular mechanisms of senescent erythrocyte phagocytosis by macrophages. A review. *Biochimie*.1998;80(2):173-95.

93. Huang Y-X, Wu Z-J, Mehrishi J, Huang B-T, Chen X-Y, Zheng X-J, et al. Human red blood cell aging: correlative changes in surface charge and cell properties. *J Cell Mol Med.* déc 2011;15(12):2634-42.
94. Piagnerelli M, Boudjeltia KZ, Brohee D, Piro P, Carlier E, Vincent J-L, et al. Alterations of red blood cell shape and sialic acid membrane content in septic patients. *Crit Care Med.* août 2003;31(8):2156-62.
95. Hadengue AL, Del-Pino M, Simon A, Levenson J. Erythrocyte disaggregation shear stress, sialic acid, and cell aging in humans. *Hypertension.* août 1998;32(2):324-30.
96. Aminoff D, Bruegge WF, Bell WC, Sarpolis K, Williams R. Role of sialic acid in survival of erythrocytes in the circulation: interaction of neuraminidase-treated and untreated erythrocytes with spleen and liver at the cellular level. *Proc Natl Acad Sci USA.* avr 1977;74(4):1521-4.
97. Lutz HU, Bogdanova A. Mechanisms tagging senescent red blood cells for clearance in healthy humans. *Front Physiol [Internet].* 25 déc 2013 [cité 17 avr 2020];4.
98. Bilyy RO, Shkandina T, Tomin A, Muñoz LE, Franz S, Antonyuk V, et al. Macrophages Discriminate Glycosylation Patterns of Apoptotic Cell-derived Microparticles. *J Biol Chem.* 1 févr 2012;287(1):496-503.
99. Shkandina T, Herrmann M, Bilyy R. Sweet kiss of dying cell: Sialidase activity on apoptotic cell is able to act toward its neighbors. *Autoimmunity.* 1 déc 2012;45(8):574-8.
100. Meesmann HM, Fehr E-M, Kierschke S, Herrmann M, Bilyy R, Heyder P, et al. Decrease of sialic acid residues as an eat-me signal on the surface of apoptotic lymphocytes. *J Cell Sci.* 1 oct 2010;123(19):3347-56.
101. Solum NO, Hagen I, Filion-Myklebust C, Stabaek T. Platelet glycoprotein Ib-IX-V. Its membrane association and solubilization in aqueous media. *Biochim Biophys Acta.* 10 avr 1980;597(2):235-46.
102. Grøttum KA, Solum NO. Congenital thrombocytopenia with giant platelets: a defect in the platelet membrane. *Br J Haematol.* mars 1969;16(3):277-90.
103. Du X. Signaling and regulation of the platelet glycoprotein Ib-IX-V complex: Current Opinion in Hematology. *Hematology.* mai 2007;14(3):262-9.
104. Deng W, Xu Y, Chen W, Paul DS, Syed AK, Dragovich MA, et al. Platelet clearance via shear-induced unfolding of a membrane mechanoreceptor. *Nature Communications.* 27 sept 2016;7(1):12863.
105. Quach ME, Li R. Structure-function of platelet glycoprotein Ib-IX. *Journal of Thrombosis and Haemostasis-2020*
106. Wang Y, Chen W, Zhang W, Lee-Sundlov MM, Casari C, Berndt MC, et al. Desialylation of O-glycans on glycoprotein Ib α drives receptor signaling and platelet clearance. *Haematologica.* 23 janv 2020;

107. Greenberg J, Packham MA, Cazenave JP, Reimers HJ, Mustard JF. Effects on platelet function of removal of platelet sialic acid by neuraminidase. *Lab Invest.* avr 1975;32(4):476-84.
108. Soslau G, Giles J. The loss of sialic acid and its prevention in stored human platelets. *Thrombosis Research.* 15 juin 1982;26(6):443-55.
109. Crook M. Sialic Acid: Its Importance to Platelet Function in Health and Disease. *Platelets.* 1 janv 1991;2(1):1-10.
110. Murphy S, Gardner FH. Effect of storage temperature on maintenance of platelet viability-- deleterious effect of refrigerated storage. *N Engl J Med.* 15 mai 1969;280(20):1094-8.
111. Hoffmeister KM, Felbinger TW, Falet H, Denis CV, Bergmeier W, Mayadas TN, et al. The clearance mechanism of chilled blood platelets. *Cell.* 2003;112(1):87-97.
112. Michelson AD, Barnard MR, Hechtman HB, MacGregor H, Connolly RJ, Loscalzo J, et al. In vivo tracking of platelets: circulating degranulated platelets rapidly lose surface P-selectin but continue to circulate and function. *Proc Natl Acad Sci USA.* 15 oct 1996;93(21):11877-82.
113. Wal DEVD, Du VX, Lo KSL, Rasmussen JT, Verhoef S, Akkerman JWN. Platelet apoptosis by cold-induced glycoprotein Ib α clustering. *Journal of Thrombosis and Haemostasis.* 2010;8(11):2554-62.
114. Josefsson EC, Gebhard HH, Stossel TP, Hartwig JH, Hoffmeister KM. The Macrophage α M β 2 Integrin α M Lectin Domain Mediates the Phagocytosis of Chilled Platelets. *J Biol Chem.* 5 juin 2005;280(18):18025-32.
115. Jansen AJG, Josefsson EC, Rumjantseva V, Liu QP, Falet H, Bergmeier W, et al. Desialylation accelerates platelet clearance after refrigeration and initiates GPIb α metalloproteinase-mediated cleavage in mice. *Blood.* 2 févr 2012;119(5):1263-73.
116. Hoffmeister KM, Josefsson EC, Isaac NA, Clausen H, Hartwig JH, Stossel TP. Glycosylation Restores Survival of Chilled Blood Platelets. *Science.* 12 sept 2003;301(5639):1531-4.
117. Wandall HH, Hoffmeister KM, Sørensen AL, Rumjantseva V, Clausen H, Hartwig JH, et al. Galactosylation does not prevent the rapid clearance of long-term, 4 degrees C-stored platelets. *Blood.* 15 mars 2008;111(6):3249-56.
118. Sorensen AL, Rumjantseva V, Nayeb-Hashemi S, Clausen H, Hartwig JH, Wandall HH, et al. Role of sialic acid for platelet life span: exposure of -galactose results in the rapid clearance of platelets from the circulation by asialoglycoprotein receptor-expressing liver macrophages and hepatocytes. *Blood.* 20 août 2009;114(8):1645-54.
119. Rumjantseva V, Grewal PK, Wandall HH, Josefsson EC, Sørensen AL, Larson G, et al. Dual roles for hepatic lectin receptors in the clearance of chilled platelets. *Nat Med.* nov 2009;15(11):1273-80.
120. Grewal PK, Uchiyama S, Ditto D, Varki N, Le DT, Nizet V, et al. The Ashwell receptor mitigates the lethal coagulopathy of sepsis. *Nat Med.* juin 2008;14(6):648-55.

121. Dupont A, Soukaseum C, Cheptou M, Adam F, Nipoti T, Lourenco-Rodrigues M-D, et al. Relevance of platelet desialylation and thrombocytopenia in type 2B von Willebrand disease: preclinical and clinical evidence. *Haematologica*. 1 déc 2019;104(12):2493-500.
122. Grozovsky R, Begonja AJ, Liu K, Visner G, Hartwig JH, Falet H, et al. The Ashwell-Morell receptor regulates hepatic thrombopoietin production via JAK2-STAT3 signaling. *Nat Med*. janv 2015;21(1):47-54.
123. Fielder PJ, Gurney AL, Stefanich E, Marian M, Moore MW, Carver-Moore K, et al. Regulation of thrombopoietin levels by c-mpl-mediated binding to platelets. *Blood*. 1996;87(6):2154–2161.
124. Hitchcock IS, Chen MM, King JR, Kaushansky K. YRRL motifs in the cytoplasmic domain of the thrombopoietin receptor regulate receptor internalization and degradation. *Blood*. 15 sept 2008;112(6):2222-31.
125. Shinjo K, Takeshita A, Nakamura S, Naitoh K, Yanagi M, Tobita T, et al. Serum thrombopoietin levels in patients correlate inversely with platelet counts during chemotherapy-induced thrombocytopenia. *Leukemia*. 1998;12(3):295.
126. Kaser A, Brandacher G, Steurer W, Kaser S, Offner FA, Zoller H, et al. Interleukin-6 stimulates thrombopoiesis through thrombopoietin: role in inflammatory thrombocytosis. *Blood*. 1 nov 2001;98(9):2720-5.
127. Ichikawa N, Ishida F, Shimodaira S, Tahara T, Kato T, Kitano K. Regulation of serum thrombopoietin levels by platelets and megakaryocytes in patients with aplastic anaemia and idiopathic thrombocytopenic purpura. *Thromb Haemost*. août 1996;76(2):156-60.
128. Kosugi S, Kurata Y, Tomiyama Y, Tahara T, Kato T, Tadokoro S, et al. Circulating thrombopoietin level in chronic immune thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol*. juin 1996;93(3):704-6.
129. Griesshammer M, Hornkohl A, Nichol JL, Hecht T, Raghavachar A, Heimpel H, et al. High levels of thrombopoietin in sera of patients with essential thrombocythemia: cause or consequence of abnormal platelet production? *Ann Hematol*. nov 1998;77(5):211-5.
130. Wang JC, Chen C, Novetsky AD, Lichter SM, Ahmed F, Friedberg NM. Blood thrombopoietin levels in clonal thrombocytosis and reactive thrombocytosis. *Am J Med*. mai 1998;104(5):451-5.
131. Audia S, Mahévas M, Samson M, Godeau B, Bonnotte B. Pathogenesis of immune thrombocytopenia. *Autoimmunity Reviews*. juin 2017;16(6):620-32.
132. Vrbensky JR, Moore JE, Arnold DM, Smith JW, Kelton JG, Nazy I. The sensitivity and specificity of platelet autoantibody testing in immune thrombocytopenia: a systematic review and meta-analysis of a diagnostic test. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. mai 2019;17(5):787-94.
133. Crow AR, Song S, Semple JW, Freedman J, Lazarus AH. IVIg inhibits reticuloendothelial system function and ameliorates murine passive-immune thrombocytopenia independent of anti-idiotypic reactivity. *Br J Haematol*. déc 2001;115(3):679-86.

147. Zhang Y, Albohy A, Zou Y, Smutova V, Pshezhetsky AV, Cairo CW. Identification of Selective Inhibitors for Human Neuraminidase Isoenzymes Using C4,C7-Modified 2-Deoxy-2,3-didehydro-N-acetylneuraminic Acid (DANA) Analogues. *J Med Chem*. 11 avr 2013;56(7):2948-58.
148. Futterer J, Dalby A, Lowe GC, Johnson B, Simpson MA, Motwani J, et al. Mutation in GNE is associated with severe congenital thrombocytopenia. *Blood*. 25 oct 2018;132(17):1855-8.
149. Panzer S, Rosales S, Gisslinger H, Jungbauer L, Kaider A, Knöbl P, et al. Plasma levels of P-selectin are determined by platelet turn-over and the P-selectin Thr715Pro polymorphism. *Thrombosis Research*. janv 2008;121(4):573-9.
150. Fox SC, Behan MWH, Heptinstall S. Inhibition of ADP-induced intracellular Ca²⁺ responses and platelet aggregation by the P2Y₁₂ receptor antagonists AR-C69931MX and clopidogrel is enhanced by prostaglandin E₁. *Cell Calcium*. 1 janv 2004;35(1):39-46.
151. Busuttil-Crellin X, McCafferty C, Helm SVD, Yaw HP, Monagle P, Linden M, et al. Guidelines for panel design, optimization, and performance of whole blood multi-color flow cytometry of platelet surface markers. *Platelets*. 2 oct 2020;31(7):845-52.
152. Stamatou NM, Liang F, Nan X, Landry K, Cross AS, Wang L-X, et al. Differential expression of endogenous sialidases of human monocytes during cellular differentiation into macrophages. *The FEBS Journal*. 2005;272(10):2545-56.
153. Nan X, Carubelli I, Stamatou NM. Sialidase expression in activated human T lymphocytes influences production of IFN- γ . *J Leukoc Biol*. 1 janv 2007;81(1):284-96.
154. Tao L, Zeng Q, Li J, Xu M, Wang J, Pan Y, et al. Platelet desialylation correlates with efficacy of first-line therapies for immune thrombocytopenia. *Journal of Hematology & Oncology* [Internet]. déc 2017 [cité 3 avr 2020];10(1). Disponible sur: <http://jhonline.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13045-017-0413-3>
155. Quach ME, Dragovich MA, Chen W, Syed AK, Cao W, Liang X, et al. Fc-independent immune thrombocytopenia via mechanomolecular signaling in platelets. *Blood*. 15 2018;131(7):787-96.
156. Revel-Vilk S, Shai E, Turro E, Jahshan N, Hi-Am E, Spectre G, et al. GNE variants causing autosomal recessive macrothrombocytopenia without associated muscle wasting. *Blood*. 25 oct 2018;132(17):1851-4.
157. Kauskot A, Pascreau T, Adam F, Bruneel A, Reperant C, Lourenco-Rodrigues M-D, et al. A mutation in the gene coding for the sialic acid transporter SLC35A1 is required for platelet life span but not proplatelet formation. *Haematologica*. 1 déc 2018;103(12):e613-7.
158. Revilla N, Corral J, Miñano A, Mingot-Castellano ME, Campos RM, Velasco F, et al. Multirefractory primary immune thrombocytopenia; targeting the decreased sialic acid content. *Platelets*. 18 août 2019;30(6):743-51.
159. Rogier T, Samson M, Mourey G, Falvo N, Magy-Bertrand N, Ouandji S, et al. Antiplatelet Antibodies Do Not Predict the Response to Intravenous Immunoglobulins during Immune Thrombocytopenia. *J Clin Med*-2020

160. Al-Samkari H, Rosovsky RP, Karp Leaf RS, Smith DB, Goodarzi K, Fogerty AE, et al. A modern reassessment of glycoprotein-specific direct platelet autoantibody testing in immune thrombocytopenia. *Blood Advances*. 14 janv 2020;4(1):9-18.
161. Tao L-L, Wang J-J, Pan Y, Wang H-P, Tao Q-S, Zeng Q-S, et al. Correlation of the Desialylation of Platelets with Efficacy of the First-line Therapy for ITP. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*. avr 2015;23(2):460-4.
162. Monzón Manzano E, Álvarez Román MT, Justo Sanz R, Fernández Bello I, Hernández D, Martín Salces M, et al. Platelet and immune characteristics of immune thrombocytopaenia patients non-responsive to therapy reveal severe immune dysregulation. *British Journal of Haematology*. juin 2020;189(5):943-53.
163. Schwab I, Nimmerjahn F. Intravenous immunoglobulin therapy: how does IgG modulate the immune system? *Nature Reviews Immunology*. mars 2013;13(3):176-89.
164. Nagelkerke SQ, Dekkers G, Kustiawan I, van de Bovenkamp FS, Geissler J, Plomp R, et al. Inhibition of FcγR-mediated phagocytosis by IVIg is independent of IgG-Fc sialylation and FcγRIIb in human macrophages. *Blood*. 11 déc 2014;124(25):3709-18.
165. Álvarez-Román MT, Rivas Pollmar MI, Bernardino JI, Lozano ML, Martín-Salces M, Fernández-Bello I, et al. Thrombopoietin receptor agonists in conjunction with oseltamivir for immune thrombocytopenia: AIDS. avr 2016;30(7):1141-2.
166. Bigot P, Auffret M, Gautier S, Weinborn M, Ettahar N-K, Coupé P. Unexpected platelets elevation in a patient with idiopathic thrombocytopenia treated with oseltamivir for influenza infection. *Fundamental & Clinical Pharmacology*. oct 2016;30(5):483-5.
167. Fijnheer R, Frijns CJ, Korteweg J, Rommes H, Peters JH, Sixma JJ, et al. The origin of P-selectin as a circulating plasma protein. *Thromb Haemost*. juin 1997;77(6):1081-5.
168. Semenov AV, Romanov YA, Loktionova SA, Tikhomirov OY, Khachikian MV, Vasil'ev SA, et al. Production of soluble P-selectin by platelets and endothelial cells. *Biochemistry Mosc*. nov 1999;64(11):1326-35.
169. Stenberg PE, McEver RP, Shuman MA, Jacques YV, Bainton DF. A platelet alpha-granule membrane protein (GMP-140) is expressed on the plasma membrane after activation. *J Cell Biol*. sept 1985;101(3):880-6.
170. Jilma B, Eichler H-G, Vondrovec B, Breiteneder H, Kyrle PA, Kitzweger E, et al. Effects of desmopressin on circulating P-selectin. *British Journal of Haematology*. 1996;93(2):432-6.
171. Panzer S, Rieger M, Vormittag R, Eichelberger B, Dunkler D, Pabinger I. Platelet function to estimate the bleeding risk in autoimmune thrombocytopenia. *European Journal of Clinical Investigation*. 2007;37(10):814-9.
172. Ignatova AA, Demina IA, Ptushkin VV, Khaspekova SG, Shustova ON, Pankrashkina MM, et al. Evolution of platelet function in adult patients with chronic immune thrombocytopenia on romiplostim treatment. *British Journal of Haematology*. 2019;187(2):e38-42.

173. Panzer S, Höcker L, Vormittag R, Rieger M, Koren D, Dunkler D, et al. Flow cytometric evaluation of platelet activation in chronic autoimmune thrombocytopenia. *Pediatric Blood & Cancer*. 2006;47(S5):694-6.
174. Lozano ML, Garabet L, Fernandez-Perez MP, Reyes-García AMDL, Diaz-Lozano P, Garcia-Barbera N, et al. Platelet activation and neutrophil extracellular trap (NET) formation in immune thrombocytopenia: is there an association? *Platelets*. 2 oct 2020;31(7):906-12.
175. Ignatova AA, Ponomarenko EA, Polokhov DM, Suntsova EV, Zharkov PA, Fedorova DV, et al. Flow cytometry for pediatric platelets. *Platelets*. 19 mai 2019;30(4):428-37.
176. Cahill, Macey, Cavenagh, Newland. Protein A immunoabsorption in chronic refractory ITP reverses increased platelet activation but fails to achieve sustained clinical benefit. *British Journal of Haematology*. 1998;100(2):358-64.
177. Psaila B, Bussel JB, Linden MD, Babula B, Li Y, Barnard MR, et al. In vivo effects of eltrombopag on platelet function in immune thrombocytopenia: no evidence of platelet activation. *Blood*. 26 avr 2012;119(17):4066-72.
178. Au AE, Josefsson EC. Regulation of platelet membrane protein shedding in health and disease. *Platelets*. 19 mai 2017;28(4):342-53.
179. Barsam SJ, Psaila B, Forestier M, Page LK, Sloane PA, Geyer JT, et al. Platelet production and platelet destruction: assessing mechanisms of treatment effect in immune thrombocytopenia. *Blood*. 26 mai 2011;117(21):5723-32.

Annexes:

A) ANNEXE 1 : note d'information à l'attention des patients

« Etude de la sialylation plaquettaire par cytométrie en flux pour le diagnostic différentiel des thrombopénies immunologiques et constitutionnelles : évaluation de l'intérêt diagnostique et pronostique »

(Etude SYMPATHIC)

Madame, Monsieur,

Vous êtes actuellement pris en charge dans le cadre d'une thrombopénie (baisse du nombre de plaquettes) liée à un purpura thrombopénique immunologique (PTI) ou bien liée à une autre cause (thrombopénie constitutionnelle, myélodysplasie, liée à une chimiothérapie etc...)

Le laboratoire d'hématologie-hémostase du CHU de Nantes est actuellement promoteur d'une étude observationnelle, visant à étudier l'état de sialylation des plaquettes, c'est-à-dire l'abondance de certains sucres particuliers à la surface des plaquettes, des patients thrombopéniques. C'est dans ce cadre que nous vous proposons de participer à cette étude.

L'objectif principal de cette étude est de valider cette technique de biologie au laboratoire, et d'évaluer son intérêt pour améliorer le diagnostic biologique chez les patients présentant une thrombopénie. En améliorant le diagnostic biologique, cette technique pourrait potentiellement permettre d'améliorer la prise en charge des patients, et d'éviter certains gestes diagnostiques invasifs, comme le myélogramme (ponction de moelle osseuse) par exemple.

La participation à l'étude nécessite le prélèvement chez vous d'un tube de sang particulier, fourni par le laboratoire. Si votre baisse de plaquettes est liée purpura thrombopénique immunologique (PTI), 1 à 3 tubes de sangs supplémentaires peuvent être nécessaires pour rechercher chez vous des anticorps dirigés contre vos plaquettes, sauf si cela a déjà été réalisé chez vous.

Aucune prise de sang supplémentaire ne sera nécessaire pour cela. Le tube de sang sera prélevé au cours d'une prise de sang systématique réalisée chez dans le cadre du soin (pour vérifier le taux de plaquette par exemple). Ce(s) tube(s) supplémentaire ne peut (peuvent) être prélevé(s) qu'au CHU de Nantes. Aucune autre analyse, y compris génétique, ne sera réalisée sur ce prélèvement.

La mesure de l'état de sialylation des plaquettes n'est actuellement pas une technique de laboratoire validée. Le résultat ne sera pas communiqué aux médecins vous prenant en charge. Il n'aura donc aucune influence sur votre prise en charge ou bien votre suivi.

Les données issues de ce prélèvement seront anonymisées, afin de respecter la confidentialité et l'anonymat nécessaire à toute étude de recherche clinique.

Conformément à la loi n° 2004-806 du 9 août 2004 relative à la politique de santé publique, cette recherche a reçu un avis favorable du Comité Protection des Personnes (CPP) Ouest en date du

Conformément à la loi n° 2012-300 du 5 mars 2012 relative aux recherches impliquant la personne humaine (loi Jardé), la participation à cette étude nécessite un consentement signé.

Vous êtes libre de refuser de participer à tout moment à cette étude, pour cela il suffit de la signaler au médecin vous prenant actuellement en charge.

B) ANNEXE 2 : formulaire de consentement

Formulaire de consentement éclairé

De M., Mme, Mlle Né le

Le Docteur m'a proposé de participer à une étude intitulée :

« Etude de la sialylation plaquettaire par cytométrie en flux pour le diagnostic différentiel des thrombopénies immunologiques et constitutionnelles : évaluation de l'intérêt diagnostique et pronostique » (Etude SYMPATHIC), dont le CHU de Nantes est promoteur.

Le Docteur m'a clairement expliqué le protocole, m'indiquant que je suis libre d'accepter ou de refuser de participer à cette étude. Il m'a remis une notice d'information précisant les modalités de déroulement de cette étude et décrivant le but de la recherche, la méthodologie, la durée, les bénéfices attendus, les contraintes et les risques prévisibles.

J'ai pu poser toutes les questions nécessaires, afin d'avoir une compréhension réelle de l'information transmise. J'ai obtenu des réponses claires et adaptées afin que je puisse me faire mon propre jugement. Ma participation est totalement volontaire et je peux si le désire interrompre ma participation à la recherche à tout moment sans avoir à en préciser les raisons et sans compromettre la qualité des soins qui me sont dispensés.

Mon consentement ne décharge pas les organisateurs de la recherche de leurs responsabilités et je conserve tous mes droits garantis par la loi.

Conformément à la loi n° 2004-806 du 9 août 2004 relative à la politique de santé publique, cette recherche a reçu un avis favorable du Comité Protection des Personnes (CPP) Ouest en date du

Je bénéficie à tout moment d'un droit d'accès et de rectification des données informatisées me concernant dans le cadre de cette étude, conformément aux dispositions légales en vigueur. En ce qui concerne des données de santé à caractère personnel, ce droit pourra être directement exercé par moi ou par l'intermédiaire du médecin de mon choix. (loi n° 2004-801 du 6 août 2004 modifiant la loi n° 78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés)

Les résultats globaux de la recherche me seront communiqués, sur demande écrite de ma part à l'investigateur, à la fin de l'étude.

Ayant disposé d'un temps de réflexion suffisant avant de prendre ma décision, et compte tenu de l'ensemble de ces éléments, j'accepte librement et volontairement de participer à cette recherche dans les conditions établies par la loi et telles précisées dans la notice d'information qui m'a été remise.

J'atteste ne pas être sous sauvegarde de justice, sous tutelle ou sous curatelle.

Fait à

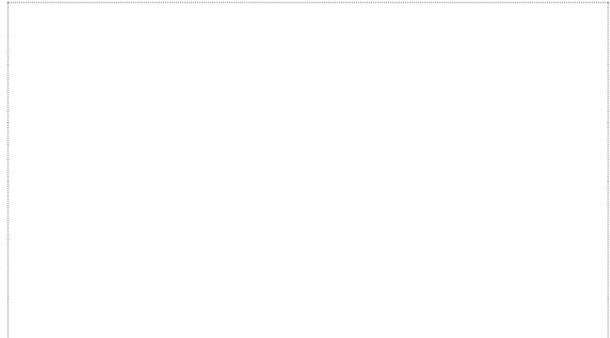
Le / /

Signature du patient

Le / /

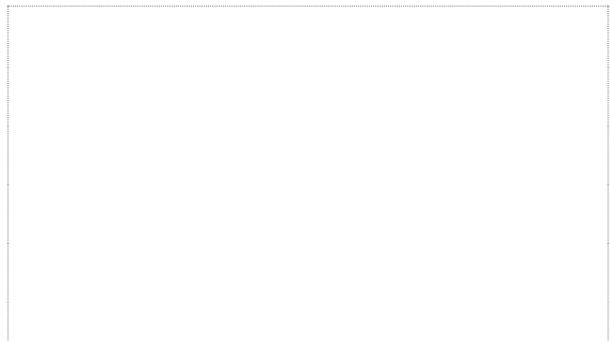
Signature de l'investigateur

Vu, le Président du Jury,



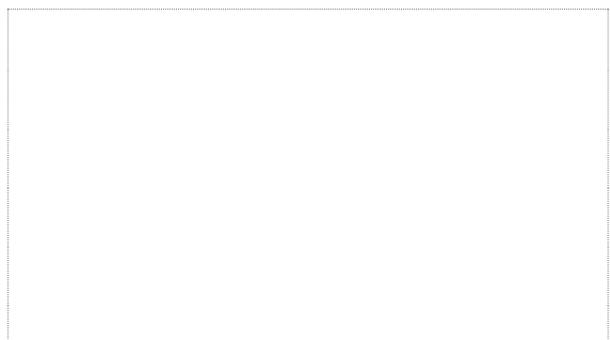
Monsieur le Professeur Mohamed Hamidou

Vu, le Directeur de Thèse,



Monsieur le Docteur Marc Fouassier

Vu, le Doyen de la Faculté,



Professeur Pascale JOLLIET

NOM : BONNARD

PRENOM : Guillaume

Titre de Thèse : Étude de la sialylation plaquettaire par cytométrie en flux pour le diagnostic différentiel des thrombopénies immunologiques et constitutionnelles : évaluation de l'intérêt diagnostique et pronostique

RESUME

Notre travail met en évidence que l'analyse de la sialylation plaquettaire par cytométrie en flux n'est pas un outil fiable pour le diagnostic différentiel entre PTI et thrombopénie constitutionnelle. En revanche, elle pourrait avoir un intérêt pronostique chez les patients atteints de PTI, car une désialylation importante semble être associée à des patients réfractaires aux traitements de première ligne et à la splénectomie. De plus, l'analyse de la sialylation pourrait identifier un sous-groupe de patients chez qui l'utilisation d'un inhibiteur de sialidase pourrait être pertinente. L'état activation plaquettaire, évalué par l'expression de la P sélectine plaquettaire, et l'IPF en valeur absolue sont des biomarqueurs intéressants pour distinguer les patients avec un PTI et ceux avec une thrombopénie constitutionnelle.

MOTS-CLES

Thrombopénie immunologique, thrombopénie constitutionnelle, acide sialique, cytométrie en flux, IPF, activation plaquettaire