

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
République Algérienne Démocratique et Populaire  
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



جامعة الإخوة منتوري قسنطينة I  
Frères Mentouri Constantine I University  
Université Frères Mentouri Constantine I

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

كلية علوم الطبيعة والحياة

Département de Biologie animale

قسم بيولوجية الحيوان

**Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de Master**

**Domaine :** Sciences de la Nature et de la Vie

**Filière :** Sciences biologiques

**Spécialité :** *Immunologie Moléculaire et Cellulaire*

N° d'ordre :

N° de série :

Intitulé :

---

**Applications de la cytométrie en flux dans le diagnostic des thrombopénies immunologiques**

---

**Présenté par :** LARABA Yasmine

**Le 28 /06/2022**

MALEK Nesrine

RIGHI Abir

**Jury d'évaluation :**

**Encadreur :** ZOUITENE Raouf -MA- Faculté de médecine, Constantine 3.

**Co encadreur :** HADDAD Souad -MA-A- Université des Frères Mentouri, Constantine 1.

**Examineur 1:** LOUAR Ibtissem -Prof- Université des Frères Mentouri, Constantine 1.

**Examineur 2 :** CHETTOUM Aziez -Prof- Université Frères Mentouri, Constantine 1.

**Année universitaire  
2021-2022**

## Résumé

Le purpura thrombopénique immunologique (PTI) est la cytopénie auto-immune la plus fréquente de l'adulte. Il est défini par une thrombopénie isolée inférieure à 100 G/l, en l'absence de toute autre cause identifiée et/ou de maladie associée.

Notre objectif était de décrire les caractéristiques épidémiologiques et biologiques du PTI dans le Constantinois et d'évaluer l'utilisation de la cytométrie en flux en routine dans le diagnostic du PTI. Nous avons mené une étude transversale ainsi qu'une étude rétrospective au laboratoire d'hémiobiologie de l'Hôpital Militaire Régional de Constantine pendant une durée de trois mois. La population d'étude est composée de 48 patients PTI connus, 50 témoins sains (normaux) et 50 témoins thrombopéniques.

Les résultats montrent que l'âge moyen de nos patients était de 27 ans avec des extrémités allant de 1 an jusqu'à 62 ans. La répartition de la population selon l'âge montre un pic à l'âge adulte (18 à 50 ans) représentant 73% de la population. La répartition selon le sexe montre une prédominance féminine, le sexe ratio femme/homme était 1.9.

L'étude par cytométrie en flux a permis d'identifier les plaquettes associées aux immunoglobulines PAIg. Plusieurs optimisations ont été introduites afin d'améliorer les résultats du test. La sensibilité et la spécificité pour l'association IgG-IgM que nous avons eu étaient respectivement de 81,3% et 93% avec un bon rapport de vraisemblance  $LR+ = 12$ . L'amélioration des performances du test dépend du bon choix de la valeur seuil de la courbe ROC.

Ce cadre d'étude montre que la cytométrie en flux est indispensable pour une identification plus précise du purpura thrombopénique immunologique permettant un bon diagnostic et une meilleure prise en charge.

**Mots clefs :** PTI, thrombopénie, PAIg, Cytométrie en flux, Immunoglobulines (IgG, IgM).

## **Abstract**

Immunologic thrombocytopenic purpura (ITP) is the most common autoimmune cytopenia in adults. It is defined as isolated thrombocytopenia below 100 G/L, in the absence of any other identified cause and/or associated disease.

Our objective was to describe the epidemiological and biological characteristics of ITP in Constantine citizen and to evaluate the use of flow cytometry in the routine diagnosis of ITP. We conducted a cross-sectional study as well as a retrospective study in the hemobiology laboratory of the Regional Military Hospital of Constantine for a period of three months. The study population consisted of 48 known ITP patients, 50 healthy (normal) controls and 50 thrombocytopenic controls.

The results show that the mean age of our patients was 27 years with extremes ranging from 1 year to 62 years. The age distribution of the population shows a peak in adulthood (18 to 50 years) representing 73% of the population. The gender distribution shows a predominance of females, the female/male sex ratio was 1.9.

The flow cytometry study allowed the identification of platelets associated with PAIg immunoglobulins. Several optimizations were introduced to improve the results of the test. The sensitivity and specificity for the IgG-IgM association we had were 81.3% and 93% respectively with a good likelihood ratio  $LR+ = 12$ . The improvement of the test performance depends on the correct choice of the cut-off value of the ROC curve.

This study framework shows that flow cytometry is essential for a more accurate identification of immunological thrombocytopenic purpura allowing a good diagnosis and a better management

**Key words :** Thrombocytopenia, ITP, PAIg, Flow cytometry, Immunoglobulins (IgG,IgM), antibodies anti-GPIIbIIIa, GPIbIX

## ملخص

نقص الصفيحات المناعية (ITP) هي أكثر أنواع فقر الدم المناعية الذاتية شيوعا لدى البالغين. يتم تعريفه على أنه نقص الصفيحات المعزول الذي يقل عن 100 جم / لتر ، في حالة عدم وجود أي سبب آخر محدد و / أو مرض مرتبط به.

كان هدفنا هو وصف الخصائص الوبائية والبيولوجية ل ITP في قسنطينة وتقييم استخدام قياس التدفق الخلوي في تشخيص ITP. أجرينا دراسة مقطعية بالإضافة إلى دراسة استعادية في مختبر بيولوجيا الدم في المستشفى العسكري الإقليمي في قسنطينة لمدة ثلاثة أشهر. يتكون مجتمع الدراسة من 48 مريضا معروفا ب ITP ، و 50 شاهد صحيا (طبيعا) و 50 شاهد في نقص الصفيحات.

تظهر النتائج أن متوسط عمر مرضانا كان 27 عاما مع أطراف تتراوح من 1 سنة إلى 62 سنة. يظهر توزيع السكان حسب العمر ذروة في مرحلة البلوغ (18 إلى 50 سنة) تمثل 73% من السكان. ويظهر التوزيع بين الجنسين غلبة للإناث، وكانت نسبة الإناث إلى الذكور 1.9.

حددت دراسة قياس التدفق الخلوي الصفائح الدموية المرتبطة بالغلوبيولين المناعي PAIg. تم إدخال العديد من التحسينات لتحسين نتائج الاختبار. كانت حساسية وخصوصية تركيبة IgG-IgM التي كانت لدينا 81.3% و 93% على التوالي مع نسبة احتمال جيدة  $LR+ = 12$ . يعتمد تحسين أداء الاختبار على الاختيار الصحيح لقيمة العتبة لمنحنى ROC.

يظهر إطار الدراسة هذا أن قياس التدفق الخلوي ضروري لتحديد أكثر دقة لنقص الصفيحات المناعية من أجل التشخيص الجيد وعناية أفضل.

## الكلمات المفتاحية

نقص الصفيحات, ITP, لتدفق الخلوي, الأجسام المضادة, (IgG, IgM), الغلوبولين المناعي GPIIbIIIa, GPIbIX

## *Dédicace*

Ce mémoire de fin d'étude est dédié à nos chers parents, pour tous leurs sacrifices et leurs prières tout au long de nos études, nos proches pour leurs soutiens, encouragements et leurs amours, sans oublier nos chers enseignants qui nous ont accompagnés durant toutes ces longues, belles années.

# *Remerciements*

Nous remercions Dieu le Tout-Puissant de nous avoir donné la volonté, la patience et le courage de faire ce travail.

Nous tenons à exprimer nos vifs remerciements à nos parents et à notre Professeur Mme Souad Haddad, pour son attention attentive, ses précieux conseils, et surtout ses qualités humaines et scientifiques. Toujours humble, sa passion pour son travail et la confiance qu'elle nous a accordée tout au long du processus.

Mme Louaar et Mr Chettoum nous ont honorés de faire partie du membre du jury ; Sans oublié notre cher docteur Raouf Zouitene pour sa gentillesse, sa bonté et son professionnalisme, son aide précieuse durant cette magnifique expérience pour la réalisation de ce modeste travail.

Ainsi que tout le personnel du service (C.T.S)

En dernier nous remercions aussi tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail, milles mercis.

## Sommaire

### Liste des figures

### Liste des tableaux

### Liste des abréviations

Introduction.....	2
-------------------	---

## I- Rappels bibliographiques

<b>Première partie : les plaquettes sanguines.....</b>	<b>5</b>
--	----------

I.1. Définition des plaquettes.....	5
-------------------------------------	---

I.2. La mégacaryopoïese.....	5
------------------------------	---

I.3. Formation des thrombocytes.....	6
--------------------------------------	---

I.4. La morphologie des thrombocytes.....	7
---	---

I.5. La physiologie des plaquettes.....	8
---	---

<b>Deuxième partie : le Purpura thrombopénique immunologique.....</b>	<b>9</b>
---	----------

I.6. Définition du Purpura thrombopénique immunologique (PTI).....	9
--	---

I.7. Épidémiologie du PTI .....	9
---------------------------------	---

I.8. Physiopathologie du PTI .....	10
------------------------------------	----

I.9. Signes cliniques du PTI.....	12
-----------------------------------	----

I.10. Diagnostic.....	12
-----------------------	----

I.11. Traitement du PTI.....	13
------------------------------	----

I.11.1. Traitements de première ligne thrombopénique immunologique (ou traitements d'urgence du PTI).....	13
---	----

I.11.2. Traitement de seconde ligne (ou traitements de fond du purpura thrombopénique immunologique).....	13
---	----

I.11.3. La splénectomie.....	14
------------------------------	----

I.11.4. Nouvelles voies de traitement du purpura thrombopénique immunologique.....	15
I.12. Les maladies associées au PTI.....	15
I.12.1. Thrombopénie et grossesse.....	15
I.12.2. Infection par le virus de l'hépatite C.....	16
I.12.3. Infection par « Helicobacter pylori ».....	16
I.12.4. Lupus.....	17
I.12.5. Syndrome des antiphospholipides.....	17
I.12.6. Infection par le virus de l'immunodéficience humaine.....	18
<b>Troisième partie : Nouvelles techniques de dépistages.....</b>	<b>20</b>
I.13. La technique MAIPA monoclonal (anti body immobilization of platelet antigens).....	20
I.14. Immuno-Fluorescence.....	20
I.14. La radio-immunologie.....	21
I.16. Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA).....	21
I.17. FCIA (flow cytometric immunobead assay).....	23
I.18. la cytométrie en flux.....	23

## **II. Patients et méthodes**

II.1. Type de l'étude .....	26
II.2. Lieu et durée de l'étude .....	26
II.3. Patients.....	26
II.3.1. Patients PTI.....	26
II.3.2. Patients thrombopéniques.....	27
II.3.3. Témoins sains.....	27
II.4. Matériels.....	27
II.4.1. Cytomètre 'ATTUNE NxT' .....	27



II.4.2. Caractéristiques du cytomètre ATTUNE NxT.....	27
II.4.3. Réactifs et consommables.....	28
II.5. Méthodes.....	29
II.5.1. Interrogatoire.....	29
II.5.2. Prélèvement.....	30
II.5.3. Numération Formule Sanguine (FNS).....	30
II.5.4. Frottis sanguin.....	30
II.5.5. Préparation des échantillons pour la CMF.....	31
II.5.6. Choix des anticorps et marquage des plaquettes .....	32
II.6. Mise en marche du Cytomètre (Annexe I) .....	33
II.7. Interprétation de l'analyse.....	34
II.7.1. Calibration de la taille plaquettaire.....	37
II.8. Méthode statistique .....	40
II.9. Evaluation des performances du test.....	40

### **III. Résultats et discussion**

III.1. Données épidémiologiques.....	43
III.1.1. Répartition des patients selon l'âge.....	43
III.1.2. Répartition des patients selon le sexe.....	43
III.1.3. Répartition des patients selon la présence de syndrome hémorragique.....	44
III.1.4. Répartition des témoins thrombopéniques selon la cause de la thrombopénie.....	45
III.1.5. Répartition des patients selon le type traitement.....	45

III.2. Répartition des patients selon le taux des plaquettes.....	46
III.3. Répartition des patients selon la sévérité de la thrombopénie.....	46
III.4. Répartition des patients selon le taux des vraies plaquettes.....	47
III.5. Comparaison de la taille (MFI-FSC) des plaquettes.....	48
III.6. Comparaison de la moyenne de l'intensité de fluorescence des IgG, IgM.....	49
III.7. Comparaison du Coefficient de Variation.....	50
III.8. Modes d'interprétation.....	51
III.9. Evaluation des performances du test PAIg.....	53
III.9.1. Courbe ROC.....	53
III.9.2. Sensibilité et Spécificité du test.....	54
III.9.3. Répartition des patients selon l'expression des IgG ou des IgM.....	55
III.9.4. Fréquence des cas faux négatifs selon le type du PTI (nouveau/chronique).....	56
III.9.5. Rapport de vraisemblance.....	56
III.10. Suivi des patients PTI.....	58
III.11. Estimation du cout et du temps nécessaires a la réalisation de la technique PAIg par CMF.....	59
<b>Conclusion.....</b>	<b>60</b>
<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>62</b>

## **Annexes**

## Liste des figures

<b>Figure 1:</b> Processus de mégacaryopoïèse.....	5
<b>Figure 2:</b> Formation des plaquettes dans la moelle-osseuse.....	7
<b>Figure 3:</b> Physiologie des plaquettes.....	8
<b>Figure 4:</b> Physiopathologie des thrombopénies immunologiques.....	11
<b>Figure 5:</b> Le cytomètre ATTUNE NxT.....	28
<b>Figure 6:</b> Microcytose sous microscope.....	31
<b>Figure 7:</b> L'anneau plaquettaire.....	31
<b>Figure 8:</b> Histogrammes qui représentent la population générale selon la taille et la structure.....	34
<b>Figure 9:</b> Histogrammes qui représentent la population générale selon l'expression de CD42b.....	35
<b>Figure 10:</b> Histogrammes qui représentent la taille "FSC, SSC".....	36
<b>Figure 11:</b> Plaquettes géantes sous microscope.....	37
<b>Figure 12:</b> La courbe de la MFI-FSC (taille des plaquettes).....	37
<b>Figure 13:</b> Les billes de calibration.....	38
<b>Figure 14:</b> Histogramme qui représente les cellules doublets.....	38
<b>Figure 15:</b> Histogrammes qui représentent la MFI de l'IgG.....	39
<b>Figure 16:</b> Répartition des patients selon l'âge.....	43
<b>Figure 17:</b> Répartition des patients selon le sexe.....	43
<b>Figure 18:</b> Répartition des patients selon le syndrome hémorragique.....	44
<b>Figure 19:</b> Répartition des témoins thrombopéniques selon la cause de la thrombopénie.....	45
<b>Figure 20:</b> Répartition des patients selon le type de traitement.....	45
<b>Figure 21:</b> Patient faiblement positif.....	51

**Figure 22:** Patient fortement positif.....42

**Figure 23:** La courbe ROC.....53

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1:</b> Anticorps utilisés dans le diagnostic des PTI.....	29
<b>Tableau 2 :</b> Conversion de la MFI en $\mu\text{m}$ .....	37
<b>Tableau 3 :</b> Le taux des plaquettes.....	46
<b>Tableau 4:</b> La sévérité de la thrombopénie.....	46
<b>Tableau 5:</b> Pourcentage des vraies plaquettes.....	47
<b>Tableau 6:</b> La moyenne MFI (taille-FSC) des plaquettes.....	48
<b>Tableau 7:</b> La moyenne de l'intensité de la fluorescence.....	49
<b>Tableau 8:</b> La moyenne du coefficient de variation.....	50
<b>Tableau 9:</b> l'évaluation des aires sous la courbe.....	54
<b>Tableau 10:</b> La sensibilité et la spécificité.....	54
<b>Tableau 11:</b> L'expression des Ig « IgG,IgM ».....	55
<b>Tableau 12:</b> Les types de la thrombopénie.....	56
<b>Tableau 13:</b> Rapport de vraisemblance IgG.....	56
<b>Tableau 14:</b> Rapport de vraisemblance « IgM ».....	57
<b>Tableau 15:</b> Rapport de vraisemblance « IgM + IgG ».....	57
<b>Tableau 16:</b> Le cout de la réalisation d'une recherche directe des anticorps antiplaquettaires par cytométrie en flux.....	59

## Liste des abréviations

**Ac** Anticorps

**ACE** Antigène Carcino-Embryonnaire

**ADCC** Cytotoxicité à Médiation Cellulaire Dépendante des Anticorps

**AHAI** L'anémie Hémolytique Auto-Immune

**AITP** Auto-Immune Thrombocytopenic Purpura

**AMM** Autorisation de Mise sur le Marché

**ASH** The American Society of Hematology

**BL1** Bleu Laser1

**CDC** Cytotoxicité Dépendante du Complément

**CIVD** Coagulation Intravasculaire Disséminée

**CMF** Cytométrie en Flux

**C-mpl** C-Monosylation du récepteur de la thrombopoïétine

**CSH** Cellules Souches Hématopoïétiques

**CV** Coefficient de Variation

**DTS** Système Tubulaire Dense

**EDTA** Ethylène Diamine Tétra Acétique

**ELISA** Enzyme Linked Immunosorbent Assay

**ET** Ecartype

**FACS** Fluorescent Activated Cell Sorter

**FCIA** Flow Cytometric Immunobead Assay

**FcR** Récepteur Fc

**FN** Faux négatif

**FP** Faux positif

**FSC** Forward Scatter

**FSC-A** Forward Scatter Area

**FSC-H** Forward Scatter Height

**GAH** Goat Anti-Human

**GP** Glycoprotéine Plaquettaire

**GR** Globules Rouges

**GMCSF** Facteur Stimulant la Formation de Colonies de Granulocytes et de Monocytes - Macrophages.

**HCV** Virus de l'Hépatite C

**HIV** Virus de l'Immunodéficience Humaine

**HELLP** Hemolysis Elevated Liver enzymes Low Platelet count

**IBM** International Business Machines

**IC** Interval de Confiance

**IgG** Immunoglobuline G

**IgM** Immunoglobuline M

**IVIg** Immunoglobuline Intraveineuse .

**Log-MFI** Logarithme Median Fluorescence Intensity

**LB** Lymphocyte B

**LR** Likelihood Ratio

**LT** Lymphocyte T

**MACE** Modified antigen capture ELISA

**MAIPA** Monoclonal antibody immobilization platelet antigen

**MFI** Median Fluorescence intensity

**MGG** May-Grunwald Giemsa

**MK** Megacaryocyte

**NFS** Numération de la Formule Sanguine

**OCS** Système caniculaire ouvert

**OMS** Organisation Mondiale de la Santé

**PAIG** Platelet-associated Immunoglobulin

**PBS** Phosphate-Buffered Saline

**PE** Phycoérythrine

**PLA1** Phospholipase A1

**PMT** Photomultiplier Tubes

**PTAI** Purpura Thrombopénique Auto-Immune

**PTI** Purpura Thrombopénique Immunologique

**PTT** Purpura Thrombocytopénique Thrombotique

**PRP** Plasma Riche en Plaquettes

**ROC** Receiver Operating Characteristic

**RV** Rapport de Vraisemblance

**SAG-M** Sodium chloride, Adenine, Glucose monohydrate, Mannitol

**SAPL** Syndrome des Antiphospholipides

**SHU** Syndrome Hémolytique et Urémique

**SIG** Signification

**SPSS** Statistical Package for the Social Sciences

**SSC** Side Scatter

**SYK** Spleen Associated Tyrosine Kinase

**TGF** Transforming Growth Factor

**TH1** T Helper 1



**Treg** T régulateur

**TPO** Thrombopoïétine

**VN** Vrai négatif

**VP** Vrai positif

# **Introduction**

Le purpura thrombopénique immunologique (PTI), appelé aussi le purpura thrombopénique idiopathique ou encore purpura thrombopénique auto-immun, est une maladie auto-immune caractérisée par une destruction périphérique des plaquettes qui a longtemps été considérée comme une pathologie dépendante uniquement du lymphocyte B **(Godeau, 2009)**.

Le PTI peut se présenter sous une forme isolée (PTI primaire) ou associée à d'autres pathologies (PTI secondaire). Ces causes secondaires incluent, les désordres auto-immuns (particulièrement le syndrome des anti-phospholipides), les infections virales (HCV, HIV) et certaines prises médicamenteuses **(Moulis et al., 2017)**.

Le PTI primaire est défini par un taux de plaquettes inférieur à 100 G/L, en absence de toutes autres causes d'une thrombopénie. Sa physiopathologie est comparable à celle de l'anémie hémolytique auto-immune AHAI, où les cellules sensibilisées par des anticorps à leurs surfaces, vont être détruites dans le système réticuloendothéliale **(Provan, 2009)**. Outre la destruction périphérique des plaquettes, la synthèse médullaire peut être aussi insuffisante ou inadéquate, responsable d'une aggravation de la chute de la numération plaquettaire **(Provan, 2009)**. La physiopathologie du PTI est en effet beaucoup plus complexe, faisant intervenir la réponse immunitaire humorale et cellulaire, ainsi qu'un défaut de production médullaire **(Godeau, 2009)**. Les auto-anticorps antiplaquettaires sont souvent des IgG dirigés contre le complexe glycoprotéique (GP) GPIIb/IIIa, et/ou le complexe GPIb/IX **(Provan, 2009)** ; **(Nielsen et al., 2016)**.

En raison de la non disponibilité d'un test biologique qui confirme le diagnostic du PTI, ce dernier se pose par élimination de toutes les autres causes secondaires d'une thrombopénie **(Neunert et al., 2011)** ; **(George et al., 1996)**. Il est basé sur l'historique de la pathologie **(George et al., 1996)**, l'examen clinique ainsi que l'examen de l'héмограмme et du frottis sanguin.

L'optimisation d'un test biologique explorant le PTI, a fait l'objet de nombreuses études où les auteurs ont cherché une éventuelle relation entre le PTI et les anticorps antiphospholipides et anti-nucléaires, le dosage de thrombopoïétine ou bien les paramètres plaquettaires mesurés par les analyseurs d'hématologie. Cependant tous ces tests sont considérés comme insuffisants par l'association américaine de l'hématologie (ASH) pour la mise en routine dans le diagnostic du PTI selon les dernières directives de 2011 **(Neunert et al., 2011)**.

La cytométrie en flux utilisant la fluorescence, a permis la détection des immunoglobulines associées aux membranes plaquettaires appelées PAIg. La recherche des PAIg représente une technique très prometteuse qui peut être appliquée pour le dépistage du PTI selon les nombreuses études réalisées dans ce sujet (**Zouitene et Brahimi., 2021**).

Notre étude a pour objectif de:

- Décrire les caractéristiques épidémiologiques et biologiques du PTI dans notre région.
- Evaluer l'utilisation de la cytométrie en flux en routine dans le diagnostic du PTI vu qu'il n'existe pas encore un examen de référence qui permet de poser un diagnostic de certitude.

# **Rappels**

## **bibliographiques**

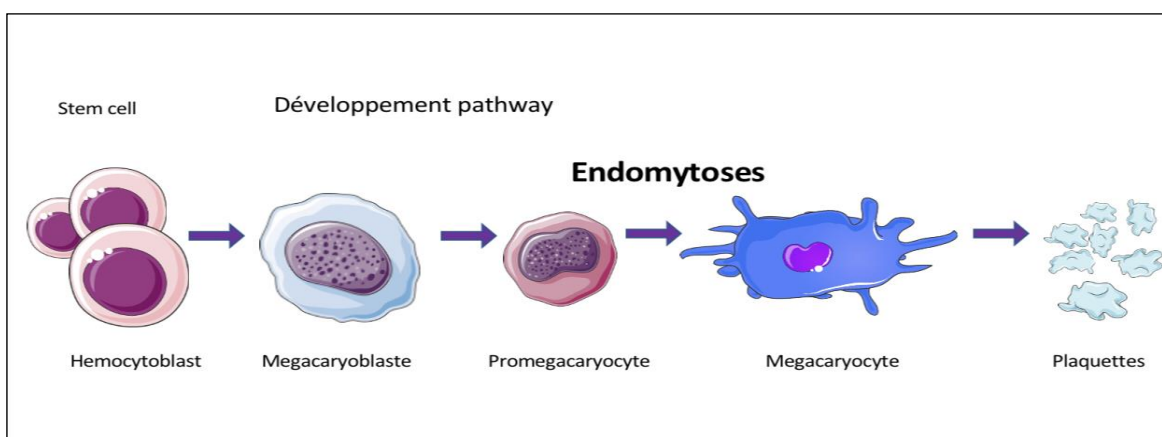
## Première partie : les plaquettes sanguines

### I.1. Définition des plaquettes

Les plaquettes sont de petites cellules anucléées des éléments figurées du sang, qui circulent librement dans le système vasculaire. Lors de l'hémostase, elles s'adhèrent rapidement, s'activent, se répandent et recouvrent le système vasculaire endommagé. Les plaquettes activées deviennent cohésives et libèrent leur corps dense et le contenu de leurs granules alpha, ce qui favorise le recrutement d'autres plaquettes et la formation d'un agrégat de plaquettes ou thrombus blanc qui est stabilisé par l'activation de la coagulation et le dépôt de fibrine dépendant de la thrombine. (Gresele et al., 2017)

### I.2. La mégacaryocytopoïèse

Les plaquettes sont produites en grand nombre à partir des mégacaryocytes (MK), une grande cellule multinucléée formée à partir des cellules souches hématopoïétiques (CSH) (**figure1**), dans un processus en plusieurs étapes régulé par la thrombopoïétine (TPO) dans la moelle osseuse. Après une prolifération initiale de cellules mononucléées, les MK subissent une polyplôidie ; une fois matures, elles migrent vers la barrière endothéliale du sinus vasculaire et étendent de longs processus appelés proplaquettes dans la circulation sanguine. Soit les plaquettes bourgeonnent directement, soit les proplaquettes sont libérées sous forme de gros fragments qui se brisent dans la circulation, notamment dans les poumons. (Anitua et al., 2018).



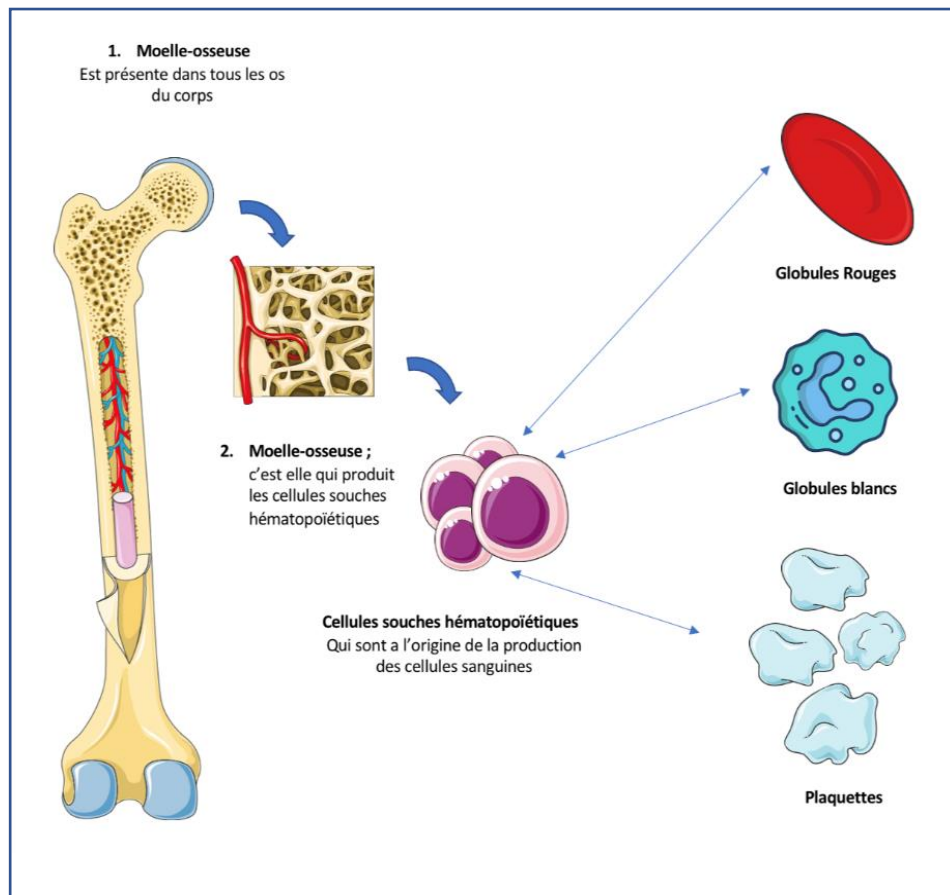
**Figure 1** : Processus de mégacaryopoïèse (1iw)

### **I.3. Formation des thrombocytes**

Les Plaquettes sont produites dans la moelle osseuse (**Figure 2**) par un processus nommé thrombopoïèse. (**Fenaux, 2014**). En 1906, Wright a confirmé que les plaquettes sanguines proviennent du cytoplasme de mégacaryocytes matures (MK) contenues dans la moelle osseuse. Cette proposition a été largement acceptée par nombreux chercheurs, car de nombreuses études utilisant la microscopie optique ont été publiées à l'appui de cette proposition. (**Kosaki & Kambayashi, 2011**). La formation des plaquettes peut être arbitrairement divisée en deux phases :

- La première phase prend plusieurs jours et nécessite des facteurs de croissance spécifiques aux mégacaryocytes, comme la thrombopoïétine. Une prolifération nucléaire massive jusqu'à  $16-32 \times N$  et un élargissement du cytoplasme des mégacaryocytes se produisent alors que la plaquette est remplie de protéines du cytosquelette, de granules spécifiques aux plaquettes et d'une membrane abondante pour achever le processus d'assemblage des plaquettes.

- La deuxième phase est relativement rapide et peut être achevée en quelques heures. Au cours de cette étape, les mégacaryocytes produisent des plaquettes sanguines en réorganisant leur cytoplasme en pro-plaquettes, puis en pré-plaquettes, qui subissent une fragmentation pour donner naissance aux plaquettes individuelles. Cent milliards de plaquettes doivent être générées quotidiennement à partir des mégacaryocytes pour que le nombre moyen de plaquettes soit de  $2 \text{ à } 3 \times 10^8/\text{ml}$ . (**Schulze & Italiano, 2016**).



**Figure 2 :** Formation des plaquettes dans la moelle-osseuse (2iw)

#### **I.4. La morphologie des thrombocytes**

Les plaquettes sont de petites cellules (2-3  $\mu\text{m}$ ), anucléées, dont les deux tiers sont présents dans la circulation générale, le tiers restant étant séquestré de manière réversible dans la rate.

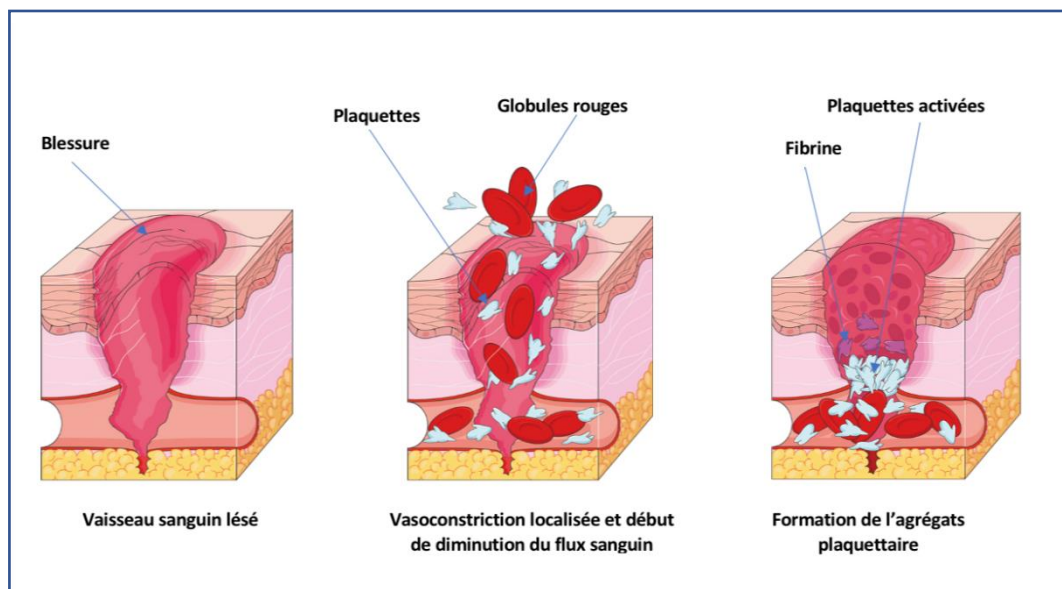
- Les plaquettes contiennent un certain nombre d'éléments structurels distincts, notamment:
  - une membrane plasmique composée d'une bicouche phospholipidique dans laquelle sont enchâssés du cholestérol, des glycolipides et des glycoprotéines.
  - des invaginations de la membrane de surface qui forment le système canaliculaire ouvert (OCS).
  - un réseau de canaux fermés de réticulum endoplasmique résiduel qui forme le système tubulaire dense (DTS).



- un squelette membranaire à base de spectrine.
- un réseau cytosquelettique à base d'actine.
- une bande périphérique de microtubules.
- et de nombreux organites, notamment des granules  $\alpha$ , des granules denses, des peroxyosomes, des lysosomes et des mitochondries. (Thon & Italiano, 2012).

## I.5. La physiologie des plaquettes

Leur fonction majeure est d'assurer l'hémostase (**Figure3**), elles sont les premiers éléments à intervenir pour arrêter le saignement dû à une lésion vasculaire, limiter les pertes sanguines et permettre la cicatrisation. Après que les plaquettes aient formé une première barrière limitant le saignement, le caillot est consolidé par la formation d'un réseau de fibrine organisé autour d'agrégats plaquettaire (**Jandrot-Perrus & Nurden, 2010**). Cependant les études récentes montrent que la fonction des plaquettes ne se limite pas à ce « clou plaquettaire », car elles interviennent dans l'angiogenèse, l'inflammation et la réaction immunitaire innée. Elles sont en effet impliquées dans le développement de l'athérosclérose, du processus métastatique, et de maladies infectieuses virales. (**Debili & Vainchenker, 2008**).



**Figure 3** : Physiologie des plaquettes (3iw)

## **Deuxième partie : le purpura thrombopénique immunologique**

### **I.6. Définition de Purpura thrombopénique immunologique (PTI)**

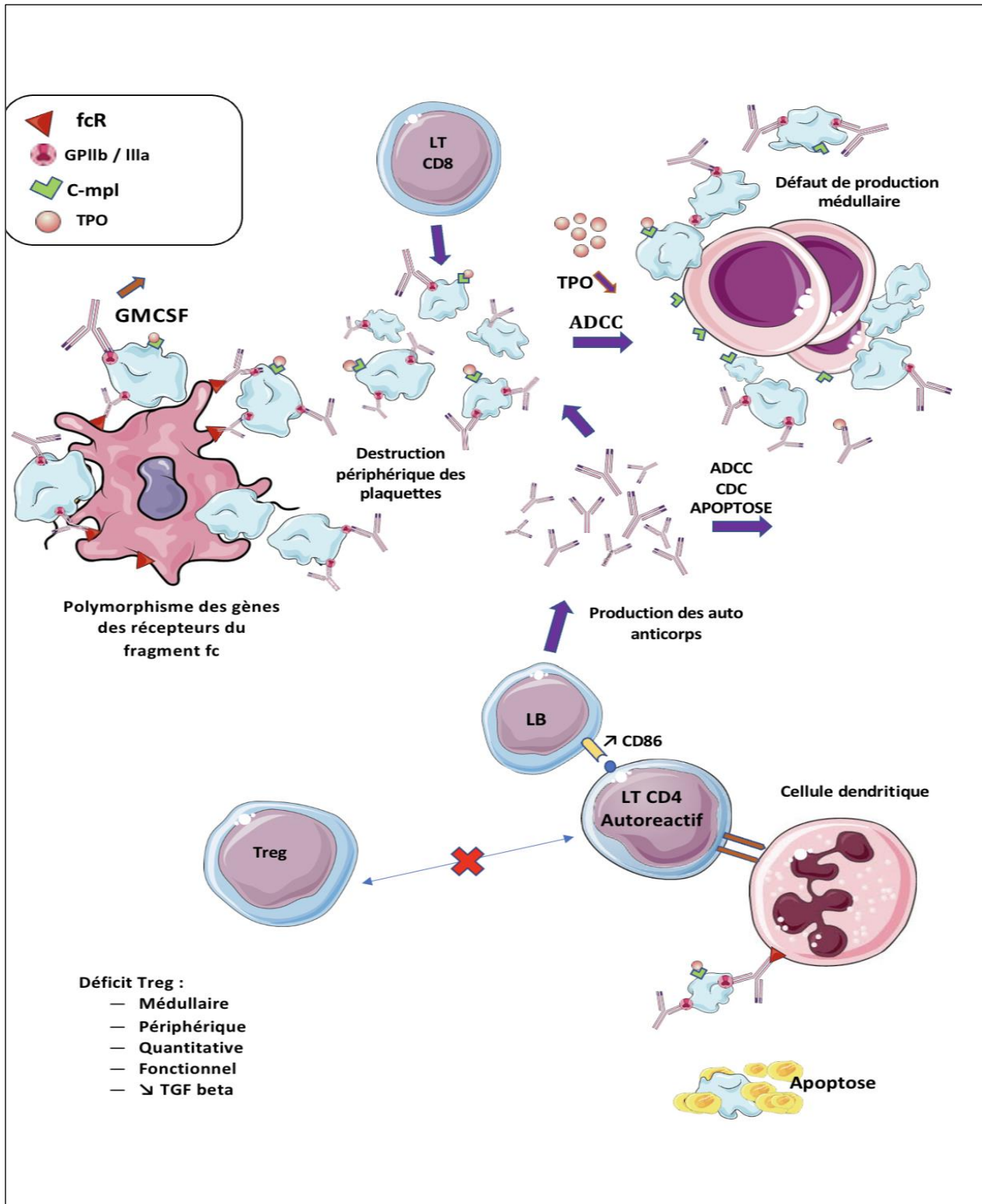
Le purpura thrombopénique immunologique (PTI) est la cause la plus fréquente des thrombopénies périphériques immunologiques; caractérisée par une destruction accélérée des plaquettes revêtues d'auto-anticorps par le système monocytomacrophagique, en particulier dans le foie et la rate; il est cependant établi qu'une diminution moins relative de la production des plaquettes s'associe à leur destruction accélérée. **(Godeau, 2008).**

### **I.7. Épidémiologie du PTI**

Le PTI est un trouble hémorragique acquis relativement fréquent; en ce qui concerne le PTI infantile, des études européennes ont rapporté une incidence de 5,8 cas/10<sup>4</sup> enfants et une prévalence de 4,6/10<sup>4</sup>. La prévalence rapportée en Amérique du Nord est légèrement plus élevée, soit 7,2/10<sup>4</sup> enfants âgés de 1 à 14 ans. Chez les adultes, l'incidence annuelle est d'environ 1,6/10<sup>4</sup>, plus élevée à l'âge moyen où l'on observe une prédominance féminine, contrairement à la répartition égale des sexes parmi les cas de PTI infantile (rapport des taux de prévalence de 1,9 pour les femmes et les hommes) et chez les personnes âgées. L'examen des demandes de remboursement de soins de santé de tous les résidents du Maryland assurés par le secteur privé en 2002 a révélé une prévalence du PTI chez l'adulte de 9,5/10<sup>4</sup>. Une mise en garde importante à propos de ces statistiques est que les études épidémiologiques du PTI varient dans leur définition et leurs critères d'inclusion ; si des cas accidentels et asymptomatiques (ceux dont le nombre de plaquettes est plus élevé) sont inclus, le taux d'incidence réel est probablement plus élevé. **(Psaila & Bussel, 2007).**

## I.8. Physiopathologie du PTI

Le PTI est caractérisé par une destruction des plaquettes d'origine immunologique. Il a été longtemps considéré que la thrombopénie était uniquement due à un excès de destruction des plaquettes lié à la présence d'auto-anticorps (Ac) dirigés contre des épitopes présents sur les glycoprotéines plaquettaires (GP), principalement la GPIIb/IIIa. Les Ac sont souvent polyspécifiques et sont produits par des clones lymphocytaires B (LB) auto-réactifs ayant subi une mutation somatique, ce qui traduit le rôle important des lymphocytes T (LT) dans leur genèse, notamment via l'interaction CD40–CD154 au sein des organes lymphoïdes. Le PTI est associé à un déséquilibre des populations LT avec un profil de réponse de type Th1. La fixation des auto-Ac sur le Fc  $\gamma$  récepteur de type activateurs des macrophages spléniques entraînant la destruction des plaquettes. Il est maintenant bien démontré que ce mécanisme n'explique pas la totalité de la physiopathologie du PTI et qu'il existe également une production médullaire inadaptée chez environ 2/3 des patients. Le défaut de production médullaire répond probablement à plusieurs mécanismes. Il est en partie lié à une destruction des mégacaryocytes par des Ac antiplaquettes reconnaissant des épitopes exprimés précocement au cours de la thrombopoïèse. Ce défaut de production médullaire pourrait également être dû à une apoptose accrue et anormale des mégacaryocytes et à un mécanisme de cytotoxicité directe vis-à-vis des mégacaryocytes exercé par des LT cytotoxiques. L'hypothèse d'une production médullaire insuffisante a été magistralement confirmée *in vivo* par les résultats remarquables obtenus avec l'utilisation d'agonistes du récepteur de la thrombopoïétine (TPO). (Godeau, 2013).



**Figure 4 : Physiopathologie des thrombopénies immunologiques (4iw)**

## **I.9. Signes cliniques du PTI**

Une première suspicion du PTI et une classification de sa gravité peuvent être établies en examinant la peau et les muqueuses d'un patient et en l'interrogeant sur sa tendance à saigner ou à avoir des bleus avec un traumatisme minime. Les saignements cutanéomuqueux sont la conséquence d'un défaut d'hémostase primaire, par opposition à un défaut d'hémostase secondaire et à des saignements d'organes plus profonds qui surviennent plus fréquemment dans d'autres coagulopathies. Les manifestations cliniques comprennent des pétéchies, un purpura et des ecchymoses qui se produisent principalement dans les extrémités supérieures et inférieures. Les pétéchies peuvent également se produire sur les muqueuses, notamment le palais dur, la cloison nasale ou les gencives, entraînant des saignements du nez et de gencives. Des ménorragies peuvent être observées chez les femmes. Une numération plaquettaire  $<10\,000$  G/L peut être associée à des hématomes généralisés spontanés. Les complications fatales, notamment l'hémorragie intracérébrale ou les saignements gastro-intestinaux manifestes, sont moins fréquentes. (Zainal et al., 2019).

## **I.10. Diagnostic**

Après avoir identifié une thrombocytopénie sur un hémogramme complet, l'exclusion d'autres causes de thrombocytopénie fait partie intégrante du diagnostic du PTI.

Les trois principaux critères de diagnostic du PTI sont les suivants :

1. Une thrombocytopénie isolée avec un hémogramme et un frottis du sang périphérique normaux.
2. Une absence d'hépatosplénomégalie et de lymphadénopathie à l'examen physique.
3. Une réponse plaquettaire au traitement classique du PTI (généralement immunoglobuline intraveineuse [IVIg], anti-D IV et éventuellement stéroïdes). (Psaila & Bussel, 2007).

## **I.11. Traitement du PTI**

### **I.11.1. Traitements de première ligne thrombopénique immunologique (ou traitements d'urgence du PTI)**

Le choix thérapeutique se fait entre trois options :

- la prednisone a la dose de (1 mg/kg) par jour pendant trois semaines à deux mois maximum
- les bolus de méthylprednisolone (15 mg/kg/pendant 03j) par jour puis prednisone (1 mg/kg) par jour pendant trois semaines lorsque les saignements sont plus importants.
- les immunoglobulines polyvalentes par voie Intra-veineuse (IgIV) à la dose de (1g/kg) par jour (en se basant sur les symptômes hémorragiques) avec ensuite un relais par la prednisone, (1 mg/kg) par jour pendant trois semaines.

-En cas de thrombopénies profondes et symptomatiques résistantes à l'association corticoïdes et IgIV, deux à trois injections de vinblastine 5 mg/m<sup>2</sup> sans dépasser 8 mg, à dix jours d'intervalle permettent parfois d'obtenir une réponse qui n'est malheureusement souvent que transitoire.

-Enfin, l'utilisation d'anti-D était une option très utilisée aux États-Unis mais la description de cas mortels d'hémolyse intra-vasculaire a beaucoup freiné le développement du produit qui n'a pas d'Autorisation de mise sur la marché (AMM) en Europe. Ce traitement n'est indiqué qu'en cas d'impasses thérapeutiques chez des patients non splénectomisés, rhésus positifs ayant un test de Coombs érythrocytaire négatif (risque d'hémolyse intense, voire d'hémolyse intravasculaire). (Khellaf, 2010).

### **I.11.2. Traitement de seconde ligne (ou traitements de fond du purpura thrombopénique immunologique)**

Ces traitements correspondent aux traitements de fond du PTI; Ils sont indiqués lorsque le patient a des plaquettes régulièrement en dessous de 30 G/L ou inférieures à 50 G/L en cas de facteur de risque de saignement surajouté (traitements anticoagulants concomitants, sujet âgé, comorbidité). Durant la phase de PTI nouvellement diagnostiqué (moins de trois mois), en cas de rechute précoce après administration des traitements de première ligne, le traitement est mal codifié. Une abstention thérapeutique peut être envisagée si la thrombopénie est isolée, sans manifestation hémorragique et en l'absence de comorbidité. Le danazol (deux gélules par jour) ou la disulone (100mg par jour) ou

encore l'hydroxychloroquine, (400 mg × 2 par jour) si la recherche d'anticorps antinucléaires s'avère positive même en l'absence d'authentique connectivite déclarée, peuvent être utilisés. Durant la phase de PTI persistant (trois mois à un an), en cas d'échec des traitements précédents, le rituximab est largement utilisé avant la splénectomie d'autant que plusieurs essais contrôlés contre placebo ont montré son efficacité à court et moyen termes dans cette situation. La posologie le plus souvent utilisée au cours du PTI est celle employée au cours du lymphome (quatre injections hebdomadaires de 375mg/m<sup>2</sup>). Il est probable que des posologies moindres ont une efficacité similaire. L'efficacité et la tolérance du traitement sur le long terme restent mal connues. (**Khellaf, 2010**).

### **I.11.3. La splénectomie**

À ce jour, la splénectomie reste le meilleur traitement curateur du PTI avec un taux de succès de 60 à 70 %. Il existe un risque d'environ 10 à 15% de rechute essentiellement dans la première année postsplénectomie. Même si les agonistes du récepteur de la thrombopoïétine (TPO) sont aujourd'hui un concurrent sérieux à la splénectomie en raison de leur efficacité remarquable avec près de 70 % de réponse initiale, cette classe thérapeutique n'a qu'un effet suspensif sur la thrombopénie et il persiste des interrogations sur les risques d'une administration prolongée avec notamment la possibilité de dépôts réticuliniques médullaires dont la signification pathologique restent à préciser. Cela explique pourquoi les agents thrombopoïétiques n'ont pas obtenu d'AMM en Europe avant la splénectomie, sauf en cas de contre-indication de cette dernière ; Aussi, la stratégie dans de nombreux pays européens dont la France est de continuer à proposer une splénectomie au cours du PTI chronique, en particulier chez les sujets jeunes. En revanche, les agents thrombopoïétiques pourraient trouver leur place chez les sujets âgés ou lorsqu'il existe une comorbidité compliquant la réalisation d'une splénectomie. Les résultats d'une scintigraphie aux plaquettes marquées à l'indium-111 peuvent également être pris en compte dans les indications thérapeutiques. Lorsqu'ils montrent une destruction exclusive des plaquettes au niveau de la rate, la probabilité de succès de la splénectomie est alors très élevée (proche de 90 %) ce qui peut pousser à la chirurgie.

Certains traitements qui étaient inefficaces avant la splénectomie doivent être ici tentés comme les corticoïdes ou le danazol. En revanche, il n'y a pas d'intérêt à réessayer la disulone (mécanisme d'action médié par la rate). À ce stade, les traitements les plus efficaces sont les agonistes de la TPO (romiplostim Nplate® et eltrombopag Revolade®) ;

Ces deux produits ont fait la preuve de leur efficacité dans des essais prospectifs randomisés contre placebo et ont respectivement obtenu une AMM en France chez les patients en échec de splénectomie en mai 2009 et mai 2010. Ces traitements ont diminué les indications de traitements immunosuppresseurs que recevaient il y a encore quelques années les patients ayant un PTI réfractaire sévère. **(Khellaf, 2010).**

#### **I.11.4. Nouvelles voies de traitement du purpura thrombopénique immunologique**

La meilleure compréhension de la physiopathologie du PTI peut faire espérer de nouvelles stratégies de traitements; Nous ne ferons que citer l'utilisation des inhibiteurs de la phagocytose des macrophages par:

- les inhibiteurs de SYK
- nouveaux anti-CD-20 comme l'ofatumumab ou le GA101. **(Khellaf, 2010).**

### **I.12. Les maladies associées au PTI**

#### **I.12.1. Thrombopénie et grossesse**

L'évolution d'un PTAI stable jusqu'alors est imprévisible en cas de grossesse et un PTAI peut se révéler au décours d'une grossesse. Le nouveau-né d'une mère atteinte de PTAI peut présenter une thrombopénie néonatale qui nécessite des mesures thérapeutiques spécifiques qui seront décrites plus loin. La découverte d'une thrombopénie chez une femme enceinte impose d'en faire le diagnostic, selon une démarche voisine de celle adoptée en dehors de la grossesse. Avant de retenir le diagnostic de PTAI, il est nécessaire d'éliminer une thrombopénie « idiopathique » gestationnelle, présente chez plus de 1 % des femmes enceintes, il s'agit d'une thrombopénie toujours modérée (en règle supérieure à  $70 \times 10^9 /l$ ), qui n'est jamais compliquée et qui s'aggrave au cours de la grossesse. Il n'y a en règle pour ces taux de plaquettes aucun risque, ni pour la mère, ni pour l'enfant, et l'accouchement ne nécessite pas de précaution particulière. Le diagnostic repose sur les éléments suivants :

1. thrombopénie isolée modérée non compliquée d'hémorragie
2. absence d'anticorps antiplaquettes
3. absence d'argument pour une autre cause et en particulier un SHU ou un HELPP syndrome
4. nombre de plaquettes normal avant et après la grossesse. **(Godeau, 2008).**



### **I.12.2. Infection par le virus de l'hépatite C**

Les liens éventuels entre l'infection par le VHC et la survenue d'un PTAI sont discutés dans des études menées principalement dans des populations hispano-américaines ou asiatiques, la prévalence de l'infection par le VHC serait plus élevée chez les patients atteints de PTAI que celle observée dans la population générale. Ces résultats ne sont pas retrouvés dans les séries européennes. Ces différences pourraient être liées au fait qu'il est difficile, devant une thrombopénie associée à une infection par le VHC, de faire la part de ce qui pourrait être lié à un éventuel mécanisme immunologique auto-immun ou à un déficit de production médullaire par défaut de synthèse de thrombopoïétine, à l'importance de la fibrose hépatique ou à une séquestration splénique des plaquettes secondaire à l'hypertension portale. (Godeau, 2008).

### **I.12.3. Infection par « Helicobacter pylori »**

*Helicobacter pylori* est une bactérie à Gram-négatif qui colonise la muqueuse gastrique. De nombreuses manifestations extradigestives ont été rapportées à l'infection par *Helicobacter*, parmi lesquelles le PTAI. Une équipe italienne a aussi décrit il y a une dizaine d'années la correction de la thrombopénie et la disparition des anticorps antiplaquettes chez des patients atteints de PTAI après éradication d'une infection par *Helicobacter pylori*. Depuis lors, près d'une trentaine d'études ont été menées et ont abouti à des résultats contradictoires. Un lien fort entre l'infection par *Helicobacter pylori* et la survenue d'un PTAI a été mis en évidence dans des études japonaises et italiennes. Ce lien pourrait être lié à un phénomène de mimétisme moléculaire. Certains anticorps anti-*Helicobacter*, notamment anti-CagA, pourraient reconnaître certains déterminants antigéniques exprimés par les glycoprotéines plaquettaires. Des résultats négatifs ont cependant été rapportés dans des études françaises, américaines et espagnoles sans qu'aucune donnée génétique ou bactériologique convaincante puisse expliquer ces résultats discordants. (Godeau, 2008).

#### **I.12.4. Lupus**

La coexistence d'un PTAI et d'une connectivité, en particulier d'un lupus érythémateux disséminé, est possible. La fréquence de l'association a conduit à inclure la thrombopénie immunologique dans la série des critères diagnostiques de lupus de l'American Rheumatism Association. La thrombopénie survient souvent au cours de l'évolution du lupus mais il existe des formes hématologiques où la thrombopénie est au premier plan et peut révéler la maladie.

Elle est alors souvent associée à une anémie hémolytique auto-immune (syndrome d'Evans).

Les signes cliniques attribuables à la thrombopénie ne sont pas différents de ceux observés au cours des PTAI isolés, sauf dans le cas où elle fait partie d'un SAPL (syndrome des antiphospholipides), alors considéré comme secondaire puisque associé au lupus. Dans cette situation, les patients sont surtout exposés à des complications thrombotiques veineuses ou artérielles plutôt qu'à des problèmes hémorragiques. La physiopathologie de la thrombopénie du lupus fait l'objet de controverses non résolues. La destruction immunologique des plaquettes semble due à la fixation spécifique d'anti-corps antiplaquettes reconnaissant des déterminants antigéniques de la membrane plaquettaire, de manière analogue à ce qui est observé au cours du PTAI « idiopathique ». Plus récemment, il a été suggéré que des anticorps dirigés contre le récepteur de la thrombopoïétine pourraient jouer un rôle. (Godeau, 2008).

#### **I.12.5. Syndrome des antiphospholipides**

Le SAPL est défini par la survenue d'accidents thrombotiques veineux ou artériels et/ou d'avortements à répétition dus à des thromboses artérielles placentaires. Ces manifestations cliniques s'associent au plan biologique à la présence d'anti-corps antiphospholipides (anticorps anticardiolipines et/ou anticorps antiprothrombinase). Les cibles épitopiques reconnues par ces anticorps semblent en fait le plus souvent exprimées par un complexe formé par des phospholipides associés à une protéine, souvent alors la b2 GPI. Le SAPL peut être associé à :

- un lupus (SAPL secondaire).
- un lupus isolé (SAPL primaire).

La thrombopénie, parfois sévère, constituait initialement l'un des critères diagnostiques du syndrome mais n'a pas été retenue dans les dernières classifications. Il est admis que le mécanisme de la thrombopénie est périphérique et immunologique, car la moelle osseuse est normale et riche en mégacaryocytes; il existe fréquemment une augmentation des IgG associées aux plaquettes; le bilan ne montre pas d'argument en faveur d'une consommation ou d'un trouble de la répartition, et les traitements habituellement proposés en cas de thrombopénie immunologique se sont occasionnellement montrés efficaces. Sa cause est en revanche discutée et les différentes études publiées aboutissent à des résultats contradictoires: pour certains la thrombopénie serait directement imputable aux anticorps anti-phospholipides, alors que pour d'autres elle serait due à la présence d'anticorps anti-plaquettes distincts, dirigés non pas contre des structures phospholipidiques mais contre des antigènes exprimés par les glycoprotéines spécifiques de la plaquette. (Godeau, 2008).

#### **I.12.6. Infection par le virus de l'immunodéficience humaine**

La survenue d'une thrombopénie était naguère un événement très fréquent au cours de l'infection par le VIH. Elle est devenue plus rare depuis la mise à disposition de traitements antiviraux très actifs tels que les anti-protéases. La thrombopénie peut être centrale ; par défaut de production, en particulier à un stade avancé de l'infection; Les causes en sont multiples et souvent intriquées: infections opportunistes, infiltration de la moelle par un lymphome, toxicité des médicaments en particulier antiparasitaires ou antiviraux; Les thrombopénies centrales peuvent également être secondaires à une toxicité médullaire du VIH, qui entraîne une perturbation des mécanismes de régulation de l'hématopoïèse, peut-être par le biais d'un défaut de synthèse des facteurs de croissance hématopoïétiques par le microenvironnement médullaire. La thrombopénie peut également être d'origine périphérique immunologique. Bien que volontiers observée à un stade précoce de la maladie, la thrombopénie immunologique peut survenir à tous les stades de la maladie. Le traitement précoce des patients infectés par le VIH explique probablement la diminution de sa fréquence. Parfois, elle révèle l'infection par administrée à pleine dose pendant 3 semaines, puis interrompue en quelques jours. L'administration de la corticothérapie sur une longue période est inutile, car lorsqu'il existe une cortico-dépendance; celle-ci est habituellement observée avec une posologie élevée incompatible avec la poursuite prolongée du traitement. Une rechute survient fréquemment à l'arrêt de la corticothérapie: seulement 20 % à 30 % des patients adultes restent en rémission

complète à l'arrêt du traitement. La fréquence des rechutes n'est pas influencée par la prolongation du traitement.

Il a été proposé d'administrer les corticoïdes à plus forte dose soit par :

- voie orale sous forme de dexaméthasone à la posologie de 40 mg/j pendant 4 jours
- soit par voie veineuse sous forme de bolus de méthylprednisolone à la dose de 15 mg/kg/bolus, sans dépasser la dose de 1 g et en répétant les bolus à une ou deux reprises.

Ces modes d'administration augmenteraient la fréquence et peut-être la durée de la réponse, mais aucun travail prospectif randomisé ne permet de l'affirmer. L'existence d'une contre-indication aux corticoïdes, un diabète ou une hypertension artérielle par exemple, peut conduire à privilégier une autre voie thérapeutique, telle que les IgIV. **(Godeau, 2008).**

### **Troisième partie : nouvelles techniques de dépistage**

De nombreuses méthodes ont été introduites pour dépister et identifier les anticorps anti-PLT, tels que:

#### **I.13. La technique MAIPA monoclonal (anti body immobilization of platelet antigens)**

Le test d'immobilisation d'anticorps monoclonaux des antigènes plaquettaire (MAIPA) s'est avéré être un outil fiable et utile en immunologie plaquettaire. Après la localisation immunochimique des allo- et auto-antigènes plaquettaire les plus importants sur les glycoprotéines plaquettaire (GP) IIb/IIIa, Ia/IIa, Ib/IX, les anticorps correspondants peuvent facilement être détectés avec cette technique car les mAb contre ces constituants membranaires sont désormais facilement disponible. Le dosage permet également un typage fiable des allo-antigènes plaquettaire. La détection de PAIgG spécifique à la GP (par MAIPA direct) s'est avérée être un signe diagnostique spécifique de l'AITP. Le test MAIPA a permis l'identification de « nouvelles » spécificités d'allo-anticorps, y compris des allo-anticorps dirigés contre des antigènes « à basse fréquence ». **(Kiefel, 1992).**

##### **- Principe**

Le principe de cette technique a été appliqué avec succès pour caractériser les anticorps dirigés contre les lymphocytes, les cellules endothéliales et les granulocytes. **(Kiefel, 1992).**

#### **I.14. Immuno-Fluorescence**

La fluorescence est définie, sur la base des définitions physiques des propriétés de la matière, comme la capacité à émettre de la lumière sans délai notable lorsqu'elle est irradiée. La lumière émise a, selon la loi de Stoke, une longueur d'onde plus longue que la lumière absorbée, c'est-à-dire que les photons sont moins énergétiques. L'émission de fluorescence à partir de matériaux non traités est connue sous le nom de fluorescence primaire, naturelle, auto ou autofluorescence. Haitinger a nommé ces matériaux «Fluorochromes» afin de les distinguer des autres colorants utilisés en microscopie à lumière visible. **(Storch , 2000).**

## - Principe

Dans la méthode directe les anticorps sont liés à une sonde fluorescente et utilisés directement pour localiser l'antigène dans l'échantillon concerné. Dans la méthode indirecte, une cellule est sondée avec un anticorps primaire non marqué, et sa localisation est, à son tour, signalée par un anticorps secondaire conjugué à un fluorophore qui reconnaît l'anticorps primaire. Les molécules fluorophores absorbent la lumière d'une longueur d'onde et émettent de la lumière à une longueur d'onde plus grande. Elles diffèrent par leurs spectres d'absorption et d'émission, leur coefficient d'extinction, leur efficacité quantique et leur stabilité. (Wheatley & Wang, 1998).

### **I.15. La radio-immunologie**

La méthode radioimmunologique a été créée par YALOW et BERSON. Actuellement, elle connaît une extension considérable et est appliquée non seulement au dosage de très nombreuses hormones protéiques et polypeptidiques mais aussi à des enzymes et même à des molécules dépourvues de propriétés antigéniques propres telles les stéroïdes. Deux grandes techniques sont actuellement utilisées:

1. l'une est basée sur les antigènes marqués.
2. l'autre sur les anticorps marqués. (Reuter et al., 1973).

## - Principe

Le principe de cette technique consiste à ajouter des anticorps marqués en concentration constante à un milieu contenant des antigènes non marqués en quantité progressivement croissante. La formation de complexes antigène-anticorps marqués sera fonction de la quantité d'antigènes présents dans le milieu. (Reuter et al., 1973).

### **I.16. Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)**

Le test ELISA est un test biochimique qui utilise des anticorps et un changement de couleur induit par une enzyme pour détecter la présence d'un antigène (protéines, peptides, hormones, etc.) ou d'un anticorps dans un échantillon donné.

- Les méthodes ELISA "indirectes" et "sandwich" permettent de détecter l'antigène ou l'anticorps à de très faibles concentrations.

- La méthode compétitive détecte les différences de composition dans les mélanges complexes d'antigènes avec une grande sensibilité, même lorsque l'anticorps spécifique de détection est présent en quantités relativement faibles.

- L'ELISA multiple et portable est un kit de laboratoire prêt à l'emploi et peu coûteux, idéal pour le dépistage de grandes populations dans des environnements à faibles ressources. **(Gan & Patel, 2013).**

#### **- Principe**

ELISA utilise le concept immunologique de base de la liaison d'un antigène à son anticorps spécifique, ce qui permet de détecter de très petites quantités d'antigènes tels que des protéines, des peptides, des hormones ou des anticorps dans un échantillon de fluide. L'ELISA utilise des antigènes et des anticorps marqués par des enzymes pour détecter les molécules biologiques, les enzymes les plus couramment utilisées étant la phosphatase alcaline et la glucose oxydase. **(Gan & Patel, 2013).**

#### **- Avantages**

- L'examen avec cette méthode est plus rapide.
- Une réaction croisée avec des anticorps secondaires peut être. **(Hidayat & Wulandari, 2021).**

#### **- Inconvénients**

- L'amplification du signal résultant est faible.
- Manque de flexibilité dans la sélection des enzymes marquées par des anticorps primaires.
- Il peut y avoir des réactions entre le primaire anticorps et enzymes liés à ces anticorps primaires. **(Hidayat & Wulandari, 2021).**

### **I.17. FCIA (flow cytometric immunobead assay)**

Est un test développé récemment, il associe la rapidité, la reproductibilité, la précision et la sensibilité de la recherche des PAIG par cytométrie en flux, avec la spécificité de la MAIPA, par la possibilité d'identification des GP plaquettaires cibles des auto-anticorps. (Zouitene & Brahimi, 2021).

#### **- Le principe**

Le principe est basé sur l'utilisation des microbilles en polystyrène sensibilisées par des Ac anti-GP plaquettaires.

Les Ac fixés sur les microbilles sont l'anti-GP :

1. IX (SZ1)
2. Ib(SZ2)
3. IIIa(SZ21)
4. IIb(SZ22)
5. P-selectine (SZ51). (Zouitene & Brahimi, 2021).

### **I.18. La cytométrie en flux**

La cytométrie en flux permet de mesurer différents paramètres sur des cellules en suspension dans un liquide, alors qu'elles défilent une à une, à grande vitesse, devant une source lumineuse. Elle fait appel à un appareillage spécifique appelé cytomètre en flux (analyseur-trieur de cellules, encore dénommé FACS pour (fluorescence activated cell sorter), par le constructeur Becton Dickinson. Actuellement, cette technique permet de faire simultanément les analyses quantitative et qualitative de sept ou huit paramètres physiques sur chacun des éléments en suspension monodisperse dans un liquide. Ces éléments peuvent être des cellules, des bactéries, mais aussi des constituants subcellulaires: noyaux, mitochondries, chloroplastes, chromosomes, etc; Cette technique présente le double avantage d'être analytique et préparative. Elle se caractérise par:

– la possibilité de mesurer individuellement et simultanément plusieurs paramètres (taille, granulosité, fluorescences) sur chaque élément en suspension au sein d'une population



hétérogène. Elle définit donc la variation et la distribution de la propriété étudiée, permettant l'identification de sous-populations et l'estimation de la population moyenne.

– la rapidité ( $10^4$  cellules/seconde) et la sensibilité d'analyse (100 déterminants antigéniques/cellule), permettent de caractériser des sous-populations inaccessibles par d'autres techniques: des types cellulaires présents entre  $10^3$  et  $10^6$  (GR fœtaux) peuvent être analysés sans enrichissement préalable.

– la possibilité de séparer physiquement chaque élément analysé selon les propriétés mesurées, pour faire des études fonctionnelles sur les sous-populations ainsi obtenues. **(Gendron, 2003).**

#### - **Principe**

La cytométrie en flux résulte de la combinaison de plusieurs technologies :

**La fluidique** pour introduire et canaliser les cellules vers la zone d'analyse.

**L'optique** avec une source d'excitation et de récupération des signaux.

**L'électronique et l'informatique**, pour convertir les signaux optiques en signaux électriques proportionnels, et les numériser pour en faire une analyse sur ordinateur. **(Gendron, 2003).**

# **Patients et méthodes**

## **II.1. Type de l'étude**

Il s'agit d'une étude transversale (menée sur 7 patients PTI connus et 38 témoins thrombopéniques) et rétrospective (menée sur 41 dossiers et 12 témoins thrombopéniques), l'objectif était d'évaluer les performances de la recherche des anticorps antiplaquettaires par cytométrie en flux (CMF) dans le diagnostic des thrombopénies immunologiques et si elle est adaptée à l'usage en routine au niveau des laboratoires d'analyses médicales, selon le coût et la gestion.

## **II.2. Lieu et durée de l'étude**

Nous avons entrepris cette étude au niveau du laboratoire d'Hémodiagnostique de l'Hôpital Militaire Régional de Constantine pendant 3 mois (du 21 Février au 21 Mai 2022).

## **II.3. Patients**

Dans notre étude nous avons analysé trois différentes populations:

- Patients PTI
- Témoins thrombopéniques
- Témoins sains

Le patient PTI doit toujours être accompagné d'un témoin sain, le test positif doit être validé par un témoin négatif afin d'éliminer une fixation non spécifique due à une mauvaise préparation de l'échantillon.

Les témoins thrombopéniques sont inclus pour évaluer les performances de la technique dans l'identification des thrombopénies immunologiques parmi les autres étiologies.

### **II.3.1. Patients PTI**

Ce sont des personnes atteintes d'une thrombopénie immunologique (PTI), soit en forme aiguë, persistante ou chronique, répondant aux critères diagnostiques de l'ASH de 1996 et 2011, le PTI est caractérisé par une baisse anormale du taux des plaquettes (inférieur à  $100.000/mm^3$ ). Cette population comporte 48 patients.

### **II.3.2. Patients thrombopéniques**

Ce sont des patients présentant une thrombopénie d'origine connue non immunologique: leucémie, insuffisance hépato-cellulaire, PTT, CIVD...etc. Nous avons collecté 50 témoins thrombopéniques.

### **II.3.3. Témoins sains**

Ce sont des personnes normaux sans aucun antécédent pathologique, ni prise médicamenteuse aptes pour le don du sang. Leur taux de plaquettes est normal (entre 150.000 et 200.000mm<sup>3</sup>). Cette population est formée de 50 témoins sains.

## **II.4. Matériels**

### **II.4.1. Cytomètre 'ATTUNE NxT'**

Le cytomètre en flux ATTUNE NxT (**Figure 5**) est un analyseur de cellules de paillasse qui peut être configuré avec jusqu'à 4 lasers séparés dans l'espace pour concevoir, il peut exécuter et analyser de manière flexible des panneaux multicolores jusqu'à 14 couleurs. Il aide beaucoup à réduire le temps de travail dans la préparation et le traitement des cellules, même pour les grandes cellules gênantes et les masses tissulaire dissociées.

Des taux de débit d'échantillonnage jusqu'à 10 fois plus rapides que les systèmes traditionnels sont réalisés par le système sans compromettre l'intégrité des données, même aux réglages les plus élevés de 1000 ul/min, il peut capter jusqu'à 65,000 événements par seconde avec d'autre fonctionnalités automatiser qui vont faciliter la tâche de l'utilisateur.

Il comporte les canaux de mesure de la taille et la structure « FSC, SSC » afin d'analyser les lymphocytes, les monocytes, et les granulocytes. Il contient également sept canaux de détection de la fluorescence dont quatre pour le laser bleu et trois pour le laser rouge.

### **II.4.2. Caractéristiques du cytomètre ATTUNE NxT**

- Mise au point acoustique pour la sensibilité acquisition rapide et précise
- Détection d'événements rares
- Conçu pour la flexibilité
- Nouvelle conception optique
- Technologie anti-obstruction

- Logiciel puissant et intuitif
- Automate d'hématologie : Beckman Coulter DxH500
- Centrifugeuse : Hettich Sentrifugen
- Microscope : LEICA DM 2000
- Micro pipettes réglables



**Figure 5** : Le cytomètre ATTUNE NxT

#### II.4.3. Réactifs et consommables

- SAG-MV
- Tubes EDTA
- Tubes secs
- Lames
- Kit de colorants
- Eau de javel
- H<sub>2</sub>O
- Focus fluide
- Shutdown solution
- Wash solution
- Embout
- Papier absorbant
- Les Anti-corps (**Tableau 1**)

**Tableau 1** : Anticorps utilisés dans le diagnostic des PTI

Nom	Conjugué	Référence	Numéro de lot	Concentration de l'Ac
GoatF(ab') <sub>2</sub> Anti-Human IgM	FITC	H1510 1	207709 0	1,4 mg/ml
GoatF(ab') <sub>2</sub> Anti-Human IgG	FITC	H1010 1C	207709 4	0,4mg /ml
Goat F(ab') <sub>2</sub> anti_Human IgG (Gamma) FITC	FITC	H1010 1C	2243637	0,5mg/ml
CD42b Monoclonal Antibody (HIP1),PE-Cyanine7,eBioscience	PE-Cyanine7	P07359	2056124	5ul/Test
CD41a Monoclonal Antibody (HIP8),PE-Cyanine7,eBioscience	PE	P08514	2573348	5 µL/Test

## II.5. Méthodes

### II.5.1. Interrogatoire

L'interrogatoire est réalisé à la réception des patients, nous avons collecté les informations suivantes afin de sélectionner les patients PTI:

- L'Age
- Les antécédents personnels et familiaux et médico chirurgicaux.
- Les maladies associées et le suivie
- Le syndrome infectieux, fièvre

- syndrome anémique
- Syndrome Hémorragique, Type hémorragique
- Prise de médicaments, chimiothérapie, alcool
- Si le patient est sous traitement (Réponse au traitement)
- Organomégalie (ganglions, rate, foie)
- Hospitalisation (complications infectieuses, thrombotique, ...)

### **II.5.2. Prélèvement**

Le sang veineux a été prélevé par ponction franche et mis dans un tube EDTA (un anticoagulant), si le sang n'est pas prélevé directement sur un tube EDTA, il faut le transvaser immédiatement. Retirer immédiatement l'aiguille pour qu'elle ne provoque pas la coagulation, le tube EDTA est homogénéisé doucement et immédiatement après la ponction pour bien mélanger l'anticoagulant et le sang.

### **II.5.3. Numération Formule Sanguine (FNS)**

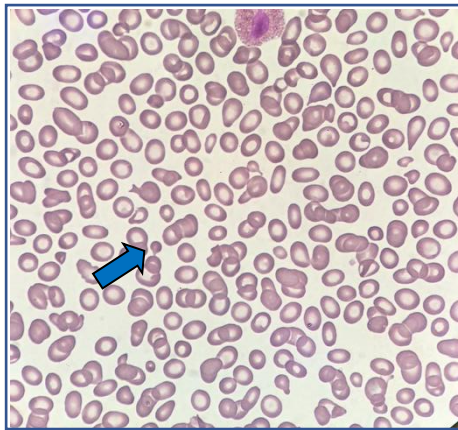
L'obtention de la numération formule sanguine via le Coulter pour but d'avoir:

- Le volume moyen plaquettaire
- Le taux de plaquettes
- Le taux d'hémoglobine
- Le taux des globules blancs

### **II.5.4. Frottis sanguin**

Sur une lame déposer une petite goutte de sang à 1 cm du bord en utilisant une micro-pipette de 5ul, puis placer le bord de l'étaleur en contact avec la lame, entrer en contact avec la goutte de sang (incliner l'étaleur à 45°). Laisser le sang s'étaler le long du bord de l'étaleur. Pousser l'étaleur rapidement, régulièrement, et sans trop appuyer, tout en gardant la même inclinaison. Soulever progressivement l'étaleur, en fin d'étalement. Sécher immédiatement le frottis, par agitation à l'air. Passer à la coloration en utilisant le kit de coloration (MGG). On doit passer la lame dix fois dans chaque colorant tout d'abord dans le fixateur (méthanol) puis dans les colorants. Faire passer la lame colorée sous le robinet d'eau pour se débarrasser de l'excès des colorants. Laisser la lame sécher, pour la lecture la lame doit être placée sous microscope.

- Parmi les erreurs d'une fausse numérotation: la présence de microcytose (globules rouges de petite taille) (**Figure 6**), ces dernières sont considérées comme en étant des plaquettes.



**Figure 6:** Microcytose sous microscope

#### II.5.5. Préparation des échantillons pour la CMF

- Préparer le plasma riche en plaquettes (PRP) par centrifugation réglée à (1100 tours pendant 10min)
- Réaliser cinq lavages par l'utilisation du SAG-M afin d'obtenir un anneau qui va se situer au fond du tube (**Figure 7**) (cet anneau contient toutes les plaquettes du sérum) centrifugés à (2500 tours pendant 5min).



**Figure 7 :** L'anneau plaquettaire

- Les échantillons sont remis en suspension par l'ajout du SAG-M
- 4 tubes sont préparés



<b>Tube</b>	<b>contenus</b>
1 <sup>er</sup> Tube conçu pour « Patient PTI »	50 µl de la suspension des plaquettes lavées + 2 ul ( IgG) + 1 µl Anticorps (CD42b)
2 <sup>ème</sup> Tube conçu pour « Patient PTI »	50 µl de la suspension des plaquettes lavées (préparée) + 1.5 µl ( IgM) + 1 µl Anticorps (CD41a)
3 <sup>ème</sup> Tube conçu pour « Témoin »	50 µl de la suspension des plaquettes lavées + 2µl ( IgG) + 1 ul Anticorps (CD42b)
4 <sup>ème</sup> Tube conçu pour « Témoin »	50 µl de la suspension des plaquettes lavées + 1.5 µl( IgM) + 1 µl Anticorps (CD41a)

- Incuber pendant 20 min à l’abri de la lumière à température ambiante ensuite rajouter 500 µl de SAG-M, et vortexer les tubes avant la lecture par CMF.

### **II.5.6. Choix des anticorps et marquage des plaquettes**

Pour la mise en évidence des anticorps antiplaquettaires d’isotype IgG et/ou IgM, nous avons utilisé des anticorps secondaires, polyclonaux d’origine (goat) dirigés contre les chaînes lourdes d’immunoglobulines (gamma et mu). Les deux réactifs anti-IgG et anti-IgM sont couplés au FITC, la forme de l’anticorps est un fragment F(ab’)<sub>2</sub> :

-Anti IgG: F(ab’)<sub>2</sub>-Goat anti-human IgG FITC, Invitrogen<sup>TM</sup>

-Anti IgM: F(ab’)<sub>2</sub>-Goat anti-human IgM FITC, Invitrogen<sup>TM</sup>

Les anticorps les plus fréquemment utilisés dans la littérature sont des (Goat anti-human immunoglobulin GAH), couplés à l’FITC (**Christopoulos et al., 1993**) ; (**Hagenstrom et al., 2000**) ; (**Guerra et al., 2011**) ; (**Hamidpour et al., 2014**). L’IgG et L’IgM sont largement suffisants pour un dépistage des PAIg.

Il est recommandé d’utiliser des anticorps secondaires anti IgG ou IgM polyclonaux.

L'utilisation des anticorps monoclonaux anti-globuline humaine peuvent détecter seulement 60% des IgG présents à la surface des plaquettes, l'utilisation d'un anti IgG polyclonal, donne un signal plus puissant, par détection d'un nombre plus élevé des Ig de surface (**Christopoulos et al., 1993**). Ceci s'explique par le fait que les anticorps monoclonaux reconnaissent un seul épitope sur la molécule IgG, cet épitope n'est pas toujours accessible pour l'Ac. Les anticorps polyclonaux sont plus utiles et plus pratiques, car ils reconnaissent plusieurs épitopes sur l'immunoglobuline. La quantité d'anticorps à rajouter à la suspension plaquettaire doit être bien ajustée afin de ne pas avoir un excès ni un défaut du marquage. Un excès d'anticorps est à l'origine d'une fixation non spécifique et par conséquent d'un signal faux positif. On note qu'au moment du changement du lot de réactif nous avons gardé les mêmes quantités, la standardisation des résultats a été obtenue par changement du voltage du canal BL1. Cette approche sera discutée dans la discussion.

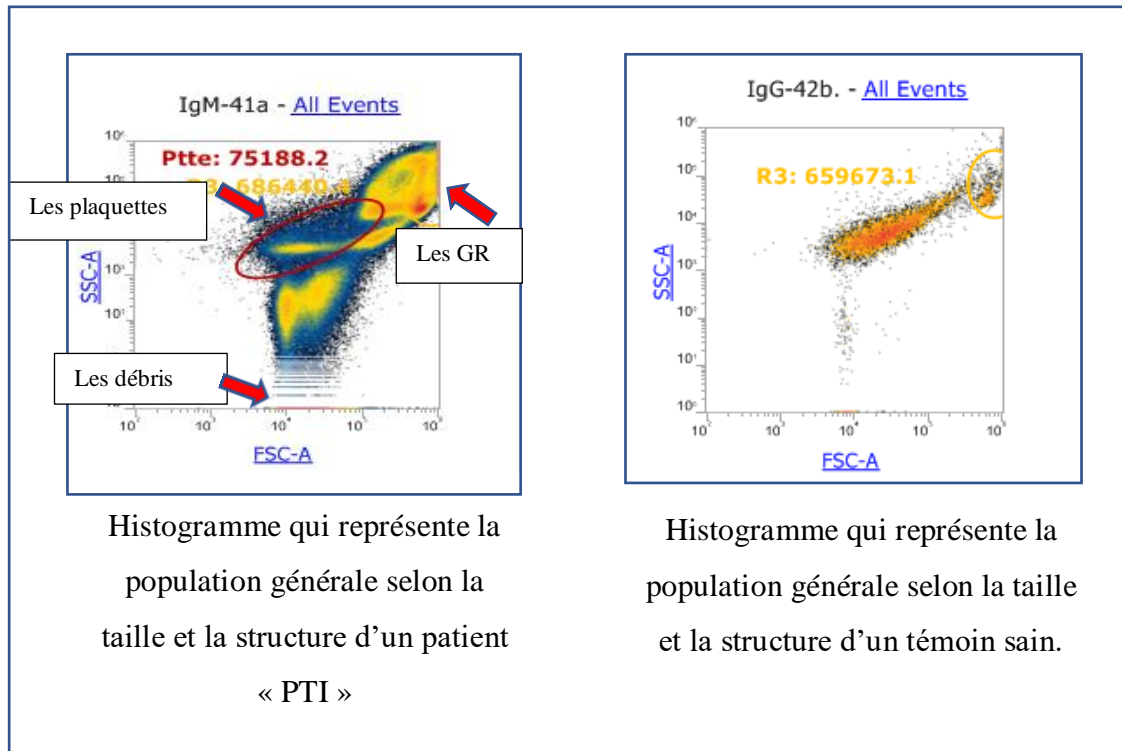
Le contrôle négatif anti-mouse IgG FITC (contrôle isotypique), est utilisé afin de déterminer la fluorescence non spécifique, il est utile lorsque l'interprétation des résultats est faite en pourcentage des plaquettes positives (**Rosenfeld et al., 1987**) ; (**Romero et al., 2000**) ; (**Nishioka et al., 2005**) ; (**Hee jin huh et al., 2009**). Dans le cas de l'interprétation en MFI, le contrôle isotypique n'a aucun intérêt. En revanche, un contrôle positif est très utile, il permet de valider un résultat négatif, et donc d'éliminer un faux négatif par erreur technique, son utilisation va améliorer la sensibilité de la technique. Un contrôle positif standard peut être également employé pour la standardisation des résultats, entre cytomètres ; entre des différents réactifs et entre des lots différents du même réactif. Le contrôle positif est un anticorps d'origine humaine dirigé contre un Ag de surface spécifique des plaquettes, Anti-PLA1 (**Christopoulos et al., 1993**) ;(**Tazzari et al., 1995**) et Anti-HPA (**Nielsen et al., 2016**), ces anticorps sont préparés à partir du plasma des sujets immunisés, leur inconvénient réside dans la disponibilité et le coût élevé.

## **II.6. Mise en marche du Cytomètre (Annexe I)**

## II.7. Interprétation de l'analyse

Après l'analyse des échantillons nous obtenons les gates (cases) suivants :

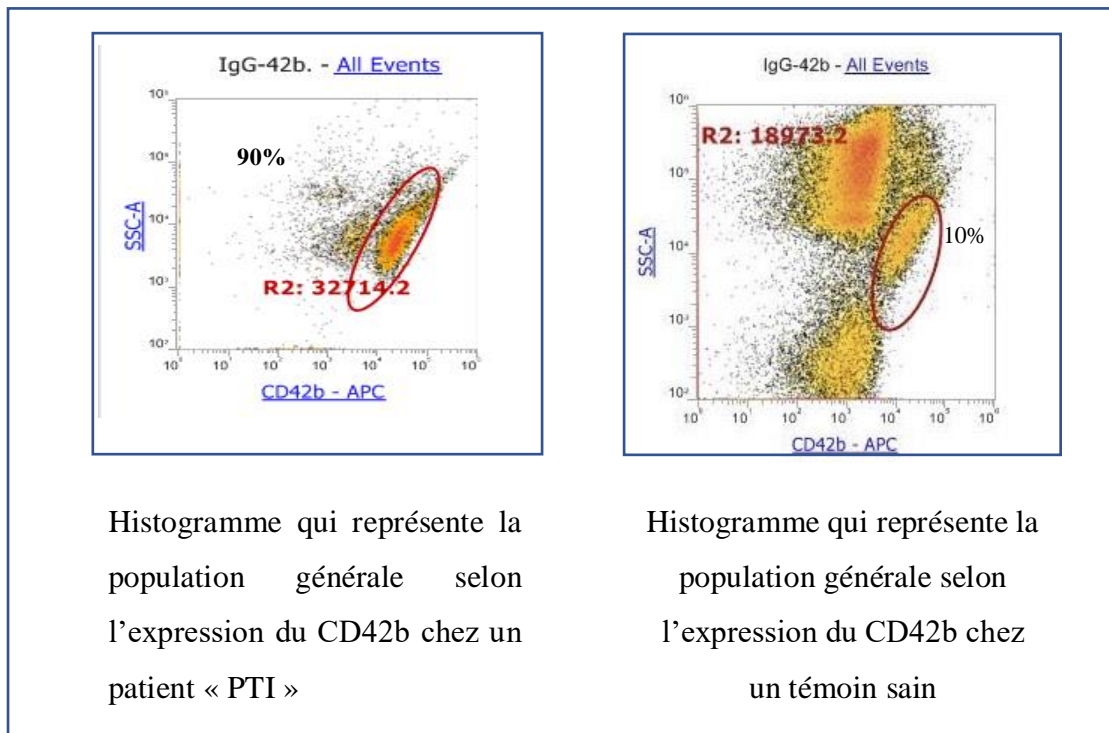
**R3 : Représente la population générale selon la taille et la structure (FSC, SSC).**



**Figure 8 :** Histogrammes qui représentent la population générale selon la taille et la structure.

On remarque la présence des débris issus de la destruction des plaquettes dans l'histogramme de la population générale des patients, contrairement au témoin sain.

◆R2 Représente la population générale selon l'expression du CD42b vs structure.

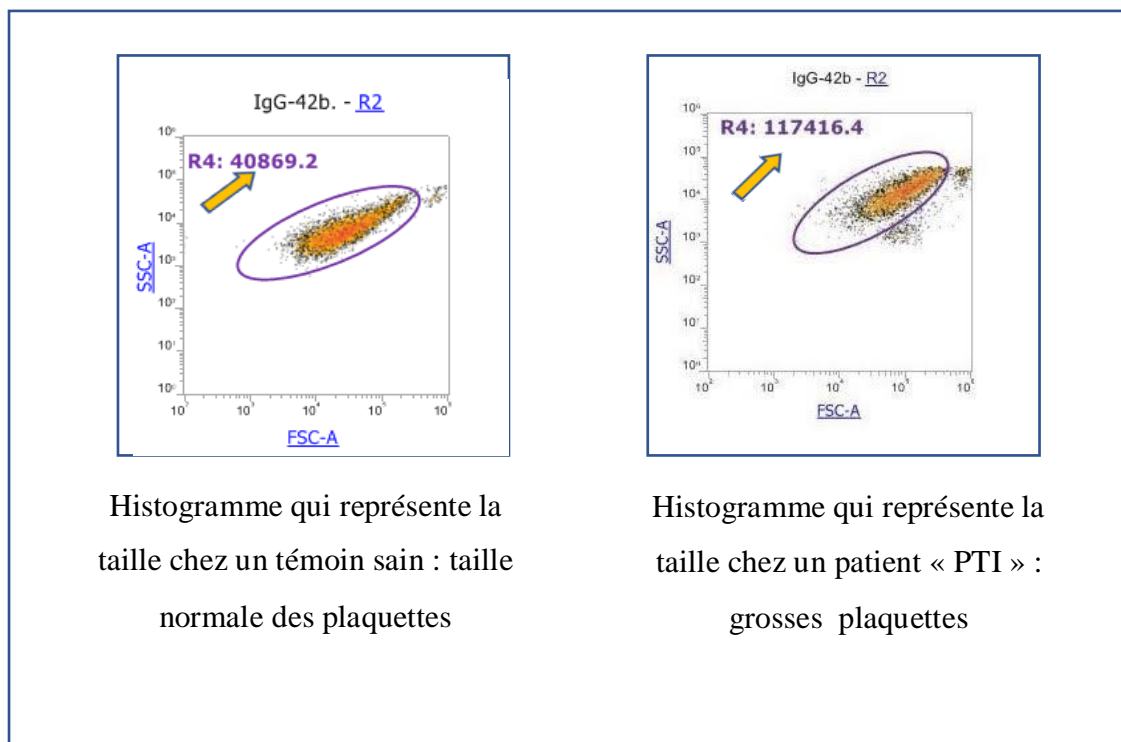


**Figure 9 :** Histogrammes qui représentent la population générale selon l'expression de CD42b.

On remarque que la population générale chez les patients « PTI » représente un taux très faible des vraies plaquettes, présence de débris et des globules rouges, contrairement à la population générale des témoins sains où le taux des vraies plaquettes est très élevé

♦**R4** Représente la taille et la forme des plaquettes, la MFI est le paramètre qui estime la taille plaquettaire.

- FSC nous renseigne sur la taille
- SSC nous renseigne sur la forme

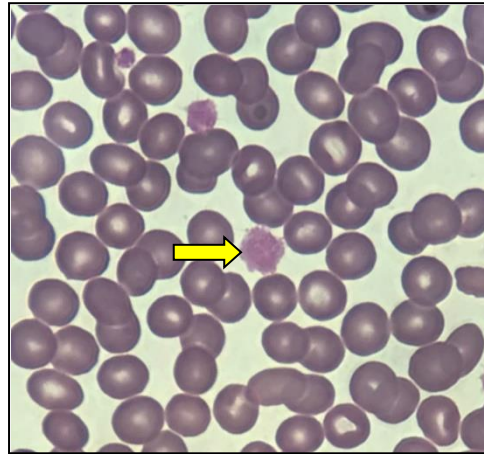


Histogramme qui représente la taille chez un témoin sain : taille normale des plaquettes

Histogramme qui représente la taille chez un patient « PTI » : grosses plaquettes

**Figure 10:** Histogrammes qui représentent la taille "FSC, SSC"

On remarque que chez les patients « PTI » la taille des plaquettes est supérieure à celle des témoins sains, ces grosses plaquettes sont connues sous le nom de plaquettes géantes (**Figure11**).



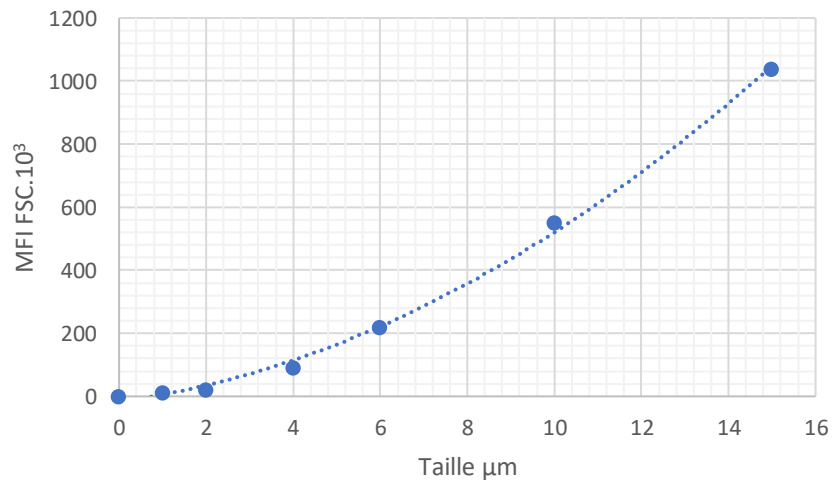
**Figure 11** : Plaquettes géantes sous microscope.

### II.7.1. Calibration de la taille plaquettaire

La MFI-FSC sera par la suite convertie en  $\mu\text{m}$  (**Figure 12**).

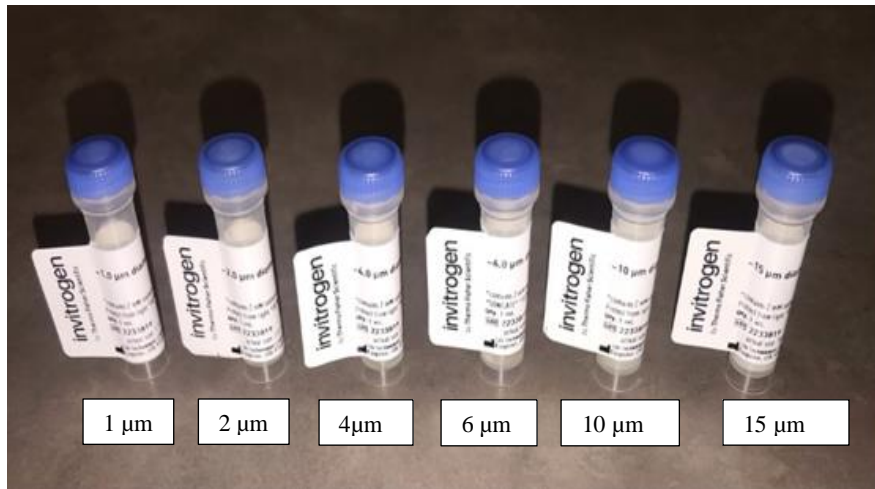
**Tableau 2** : Conversion de la MFI en  $\mu\text{m}$

MFI	Taille
11,8	2 $\mu\text{m}$
19,6	4 $\mu\text{m}$
90,3	6 $\mu\text{m}$
218,3	10 $\mu\text{m}$
1037,8	15 $\mu\text{m}$



**Figure 12** : la courbe de la MFI-FSC (taille des plaquettes)

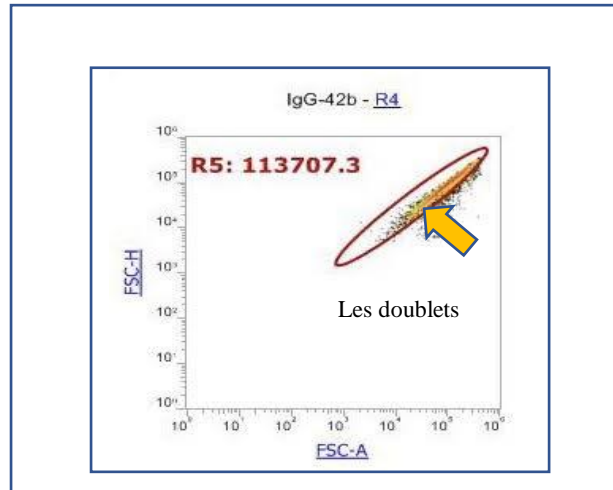
La calibration de la taille plaquettaire a été effectuée à l'aide d'un kit de billes appelé «fluocytometry kit cell size calibration», chaque bille donne une taille FSC (signal FSC) et les billes sont de tailles différentes de 2-15 $\mu\text{m}$  (**Figure 13**), nous avons mesuré la MFI de chaque bille et tracé la courbe d'étalonnage, la taille des plaquettes est déterminée par l'extrapolation de la courbe.



**Figure 13 :** Les billes de calibration

◆**R5: Représente les doublets.**

- FSC-H mesure la Hauteur
- FSC-A mesure l'air sous la courbe

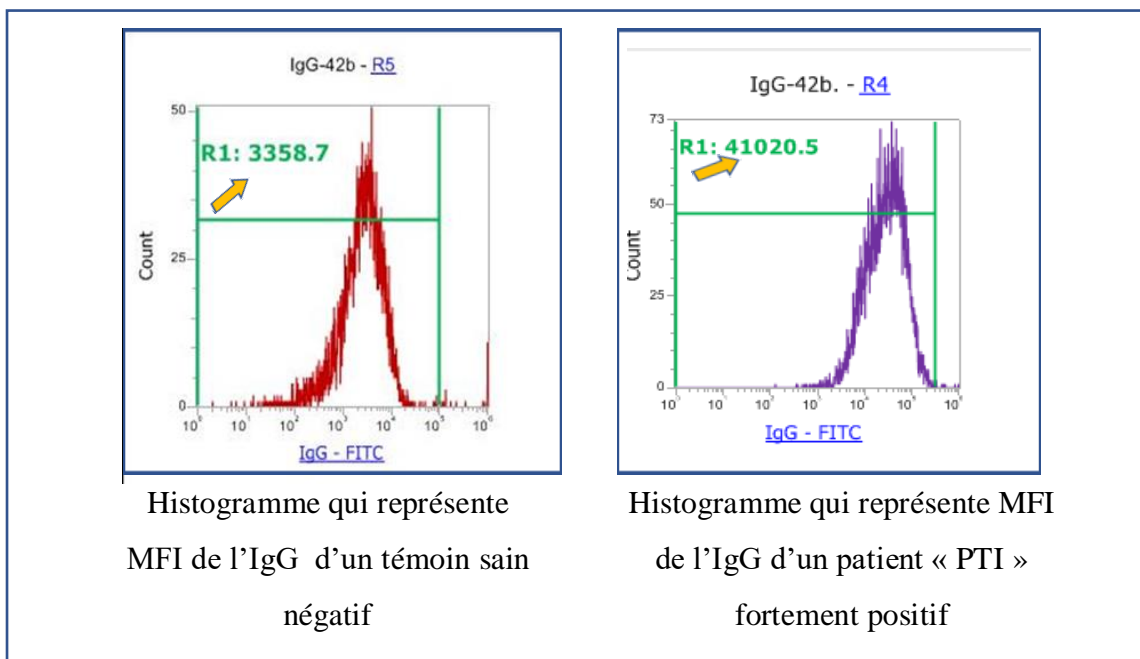


**Figure 14:** Histogramme qui représente les cellules doublets.

- Lors de l'analyse, deux ou plusieurs cellules peuvent passer à la fois en même temps, ces cellules sont connues sous le nom de doublets. Lors de leur passage, elles vont donner un signal très élevé, du coup elles doivent être éliminées.

**R1 : Représente la moyenne de l'intensité de la fluorescence (MFI) des IgG et IgM.**

Afin d'obtenir une courbe lisse il faut que le nombre d'événements (le nombre de plaquettes analysées) dépassent les 7000 événements.



**Figure 15** : Histogrammes qui représentent la MFI de l'IgG

On remarque que l'intensité de la fluorescence de l'IgG chez un patient « PTI » est fortement positive par rapport à l'intensité de fluorescence de l'IgG chez un témoin sain.



## II.8. Méthode statistique

Les résultats ont été saisis sur le logiciel Microsoft Excel 2016 et puis transférés et analysés par le logiciel IBM SPSS V.22.

La comparaison des moyennes pour les variables appariées et indépendantes a été faite par le test T de Student, et la corrélation de Pearson pour les variables quantitatives, le seuil de signification a été fixé à 5% ( $p=0,05$ ).

## II.9. Evaluation des performances du test:

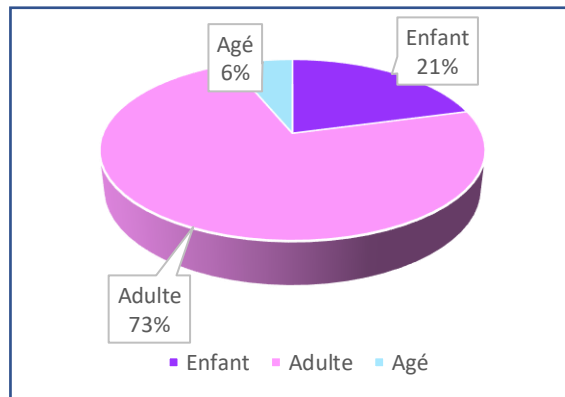
- La courbe ROC est un outil d'aide au choix du seuil d'un test diagnostique. On la trace en calculant la sensibilité et la spécificité du test pour différentes valeurs de seuil. On reporte pour chaque seuil le point d'abscisse et d'ordonnée. Elle permet de choisir la valeur seuil qui offre le meilleur compromis entre sensibilité et spécificité.
- La sensibilité est la capacité du test à bien détecter les malades, elle est calculée par la formule suivante :  $(VP/VP+FN)$ .
- La spécificité est la capacité du test à bien détecter les non-malades. elle est calculée par la formule suivante :  $(VN/VN+FP)$
- Les valeurs prédictives : la valeur prédictive positive, d'un test est la probabilité que la maladie soit présente si le test est positif. La valeur prédictive négative est la probabilité que la maladie soit absente si le test est négatif. Les valeurs prédictives sont influencées par la prévalence de la maladie.
- Les rapports de vraisemblances : ce sont des outils numériques permettant d'évaluer l'efficacité d'un test médical pour discriminer les individus sains des individus malades. Ils s'appuient sur les deux caractéristiques d'un test qui sont sa sensibilité et sa spécificité et ils ne sont pas influencés par la prévalence.
- Plus de 10 Très bon - Diagnostic fiable
- De 5 à 10 Assez bon - Diagnostic à confirmer avec d'autres tests
- De 2 à 5 Faible - Autres tests sont nécessaires
- De 1 à 2 Sans utilité pour le diagnostic

Ces tests ont été déterminés sur le logiciel SPSS, les valeurs de vraisemblance ont été déterminées sur l'application web : <http://araw.mede.uic.edu/cgi-bin/testcalc.pl>

# **Résultats et discussion**

### III.1. Données épidémiologiques

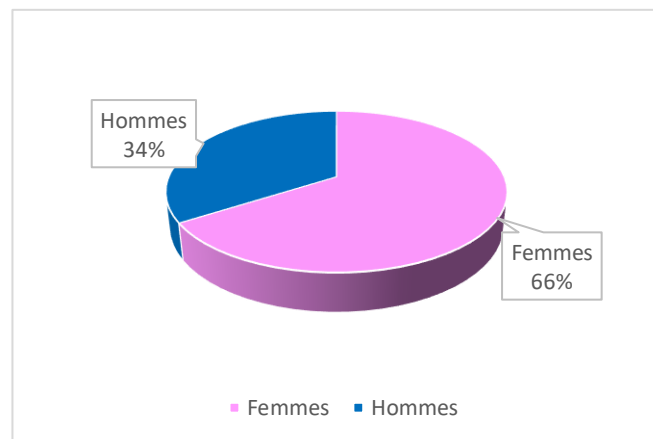
#### III.1.1. Répartition des patients selon l'âge



**Figure 16 :** Répartition des patients selon l'âge

On note une prédominance de l'âge adulte (de 18 à 50 ans) soit 73% de la population générale. La moyenne d'âge de nos patients était de 27ans avec une extrémité allant de 1 an jusqu'à 62 ans. Ces résultats sont proches de ceux de (Marieke et al., 2009) ; (Moullis et al., 2014) qui ont révélé un pic majeur à un âge supérieur à 60 ans.

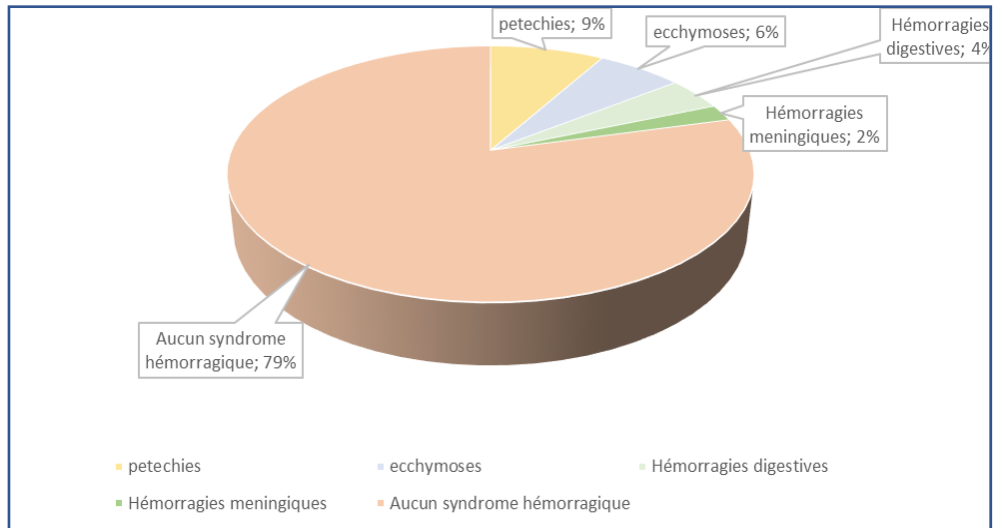
#### III.1.2. Répartition des patients selon le sexe



**Figure 17:** Répartition des patients selon le sexe

On note une prédominance du sexe féminin (66%) avec un sexe ratio femme/homme égale à 1,94. Ce résultat est en accord avec l'étude de (Segal et al., 2006) où la prédominance décrite était féminine et un sexe ratio égale à 1.9.

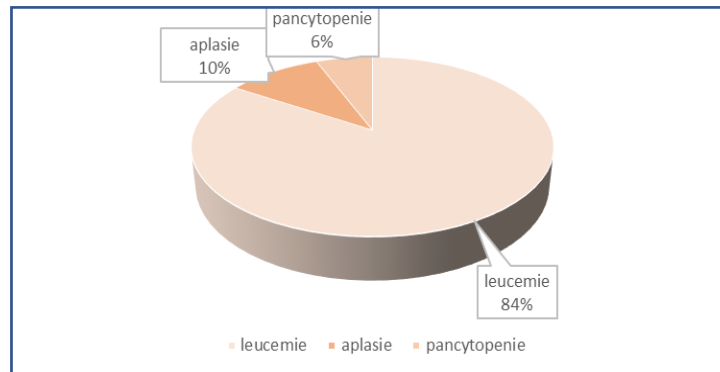
### III.1.3. Répartition des patients selon la présence de syndrome hémorragique.



**Figure 18 :** Répartition des patients selon le syndrome hémorragique.

On observe que la plupart des patients (79%) ne présentent aucun syndrome hémorragique (asymptomatique) donc la découverte du PTI était fortuite suite à la diminution du taux de plaquettes (<100G/l). Les manifestations hémorragiques les plus fréquentes sont représentées par les pétéchie (9%) et les ecchymoses (6%). Par contre nous n'avons aucun cas de formes hémorragiques graves tel que les hémorragies intra-cérébrales. Nos résultats sont en accord avec ceux de (Palau et al., 2017) ; (Moulis et al., 2021).

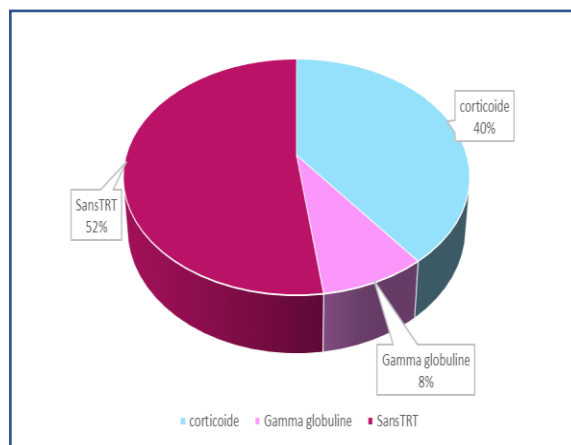
### III.1.4. Répartition des témoins thrombopéniques selon la cause de la thrombopénie



**Figure 19:** Répartition des témoins thrombopéniques selon la cause de la thrombopénie

On note que la majorité des témoins thrombopéniques 84% avait une leucémie aiguë, les autres causes sont réparties entre l’aplasie et la pancytopenie. Ces résultats sont en accord avec ceux de (Dang et al.,2015) où les hémopathies malignes myéloïdes étaient les plus fréquentes (63 %), principalement les leucémies aiguës.

### III.1.5. Répartition des patients selon le type traitement



**Figure 20:** Répartition des patients selon le type de traitement

On note que plus de 50% des patients PTI ne prennent aucun traitement, pour ceux qui sont sous traitement, on note que 40% des patients sont sous corticoïdes et 8% sont sous gamma globuline.

La corticothérapie reste la thérapeutique de première ligne permettant d'obtenir un taux de réponse de 54 % (**Audia et al.,2010**)

### III.2. Répartition des patients selon le taux des plaquettes

**Tableau 3** : Le taux des plaquettes

Population	Nombre	Taux des plaquettes G/l	Ecartype	Signification du test T
Patients	48	43,3	43,3	0,657
Témoins thrombopéniques	45	65,1	29,3	

On remarque que le taux moyen des plaquettes chez les patients était de 43,3 G/l, plus faible que celui des témoins thrombopéniques où la moyenne était de 65,1G/l, mais cette différence n'est pas significative car la valeur P du test T est supérieure à 0,05, elle est donc due au hasard. Par ailleurs le taux normal des plaquettes varie entre 150 et 450 G/l.

### III.3. Répartition des patients selon la sévérité de la thrombopénie

**Tableau 4** : La sévérité de la thrombopénie

Thrombopénie	Nombre	Taux de plaquettes G/l	Pourcentage
Modérée	16	(>50)	33,33%
intermédiaire	17	(20-50)	35,42%
Sévère	15	(<20)	31,25%

On note une répartition équilibrée de nos patients selon la sévérité de leur thrombopénie.

### III.4. Répartition des patients selon le taux des vraies plaquettes

Tableau 5 : Pourcentage des vraies plaquettes

Population	Nombre	Pourcentage des vraies plaquettes	Ecart type	Signification Test T
Patients	48	48%	28,62	6,5.10 <sup>-9</sup>
Témoins sains et thrombopéniques	100	79,1%	16,14	

On remarque que seulement 48% des patients avaient des vraies plaquettes (marquées par les anticorps CD41a ou CD42b), alors que le pourcentage des témoins ayant des vraies plaquettes était de 79.1%. Cette différence est statistiquement très significative (la valeur P du test T << 0,05). Dans cette situation il est très difficile de sélectionner la population plaquettaire à analyser sur un histogramme FSC/SSC à cause de l'interférence des débris et la présence des plaquettes de grande taille qui chevauchent avec les globules rouges résiduels. Il est donc indispensable de sélectionner les plaquettes à analyser par un anticorps antiplaquettaire sur un histogramme SSC/CD41 à (CD42b). Inclure les débris et les globules rouges résiduels entraîne une surestimation de la MFI IgG ou IgM et par conséquent un résultats faux positif, ceci peut expliquer la grande variabilité de la spécificité enregistrée par **(Rosenfeld et al., 1987)** ; **(Jouts et Kekomako,1997)** ; **(Christopoulos et al.,1993)** **(Hezard et al., 2008)** qui ont procédé à la sélection des plaquettes sur l'histogramme FSC/SSC .

### III.5. Comparaison de la taille (MFI-FSC) des plaquettes

**Tableau 6** : La moyenne MFI (taille-FSC) des plaquettes

<b>Population</b>	<b>Nombre</b>	<b>Moyenne MFI-FSC (taille des plaquettes)</b>	<b>Ecartype</b>	<b>Signification du test T</b>
<b>Patients</b>	48	93181	123295	0,007
<b>Témoins sains et thrombopéniques</b>	100	44450	14350	

On remarque que la MFI-FSC des plaquettes des patients était de 93181, elle est significativement plus grande que celle des témoins où elle était de 44450. Les thrombopénies périphériques donnent en générale des plaquettes de grande taille.

La fluorescence non spécifique, obtenue par cytométrie en flux, est due à la fluorescence naturelle (auto-fluorescence) des plaquettes d'une part et à la fixation non spécifique des anticorps à la surface plaquettaire d'autre part. Ces deux sources de bruit de fond, sont très influencées par la taille de la plaquette. Les plaquettes de grande taille générant une auto-fluorescence plus importante et elles fixent plus d'anticorps d'une façon non spécifique, en rapport avec leurs surfaces membranaires plus étendues.

L'analyse des groupes de plaquettes de différentes tailles au sein de la même population plaquettaire montre une augmentation croissante de la fluorescence non spécifique proportionnelle à la taille moyenne plaquettaire avec une parfaite corrélation (corrélation Pearson  $>0,95$ ). Inclure les plaquettes géantes dans l'analyse, entraîne une surestimation de la fluorescence, qui peut être à l'origine d'un résultat faux positif. Afin d'éviter ce phénomène, nous avons sélectionné les plaquettes dont la MFI-FSC est inférieur à  $10^5$  ce qui correspond à une taille plaquettaire moyenne inférieur à  $4,5 \mu\text{m}$ .



### III.6. Comparaison de la moyenne de l'intensité de fluorescence des IgG, IgM

**Tableau 7** : La moyenne de l'intensité de la fluorescence

Population	Nombre	Moyenne	Ecartype	Signification du test T
<b>Patients (MFI IgG)</b>	48	8862	1620	0,000005
<b>Témoins sains et thrombopéniques (MFI IgG)</b>	100	2072	1232	
<b>Patients (MFI IgM)</b>	48	5133	3859	2,46.10 <sup>-13</sup>
<b>Témoins sains et thrombopéniques (MFI IgM)</b>	100	2446	7744	

Le tableau montre que la moyenne de la MFI-IgG des patients (8862) est significativement plus grande que celle de la MFI-IgG des témoins sains et thrombopéniques (2072), tandis que la moyenne de la MFI-IgM des témoins sains et thrombopéniques (2446) est plus basse que celle des de la MFI-IgM des patients (5133).

Pour les patients PTI positifs, l'intensité du signal MFI de l'IgG ou l'IgM est bien corrélée avec la variation du taux des plaquettes, ce qui permettra une surveillance de l'évolution de l'anticorps chez les patients durant et après l'arrêt du traitement. Le dépistage des PAIg par CMF est également très utile dans les cas complexes, comme les patients réfractaires aux traitements de première et deuxième ligne et les cas thrombopéniques médicamenteuses (Porcelijn et al., 2018).

### III.7. Comparaison du Coefficient de Variation

**Tableau 8 :** La moyenne du coefficient de variation

<b>Population</b>	<b>Moyenne « CV »</b>	<b>Ecartype</b>	<b>Signification du test T</b>
<b>Patients « IgG »</b>	167,7	105,5	0,026
<b>Témoins (sains et thrombopéniques) « IgG »</b>	204,7	200,6	
<b>Patients « IgM »</b>	224,7	175	0,481
<b>Témoins (sains et thrombopénique) « IgM »</b>	247,5	87,2	

On note que le CV-IgG des patients est significativement plus bas que celui des témoins, signifiant que la MFI-IgG est plus homogène chez les patients (par rapport à la fluorescence de 7000 plaquettes autrement dit événements). En revanche, les CV-IgM des patients et témoins ne sont pas différents. (Un CV plus haut signifie que la population est hétérogène, CV plus petit signifie que population homogène). Une fluorescence positive se caractérise par son homogénéité, par rapport à la fluorescence non spécifique qui est très hétérogène au sein de la même population cellulaire.

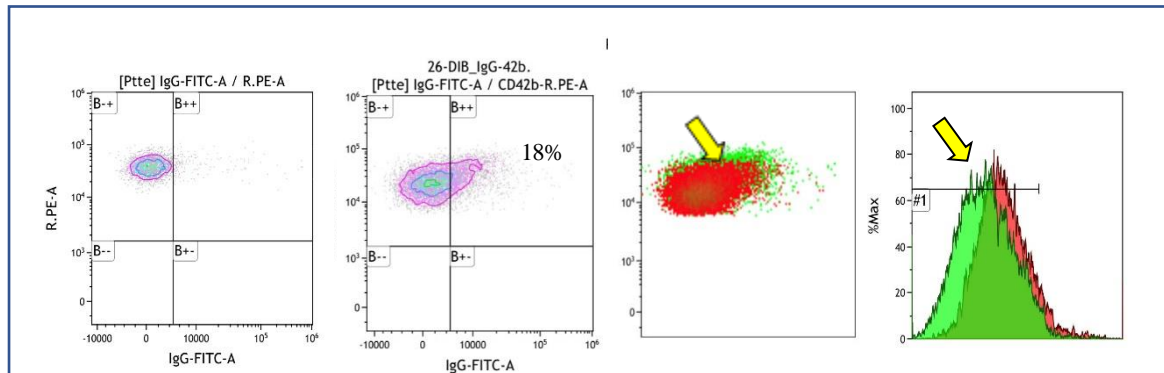
Le coefficient de variation (CV) de la fluorescence IgG ou IgM nous renseigne sur leur homogénéité. Le CV moyen de la MFI-IgG était à 167,7 % chez les patients plus bas par rapport aux témoins où il était à 204,7%, cette différence est statistiquement très significative. Pareil pour la MFI IgM où les CV moyens étaient à 224,7% et 247,5% chez les patients et les témoins respectivement.

Une fluorescence homogène est en faveur d'une vraie fixation des immunoglobulines à la surface plaquettaire, un CV-MFI diminué est souvent observé dans les cas vrais positifs IgG ou IgM. Le CV-MFI peut constituer un paramètre d'aide à l'interprétation des résultats obtenus. Par ailleurs, nous rappelons que le CV-MFI est influencé par la qualité du

réactif (fluorochrome et concentration) et le réglage du voltage du canal de récupération de la fluorescence.

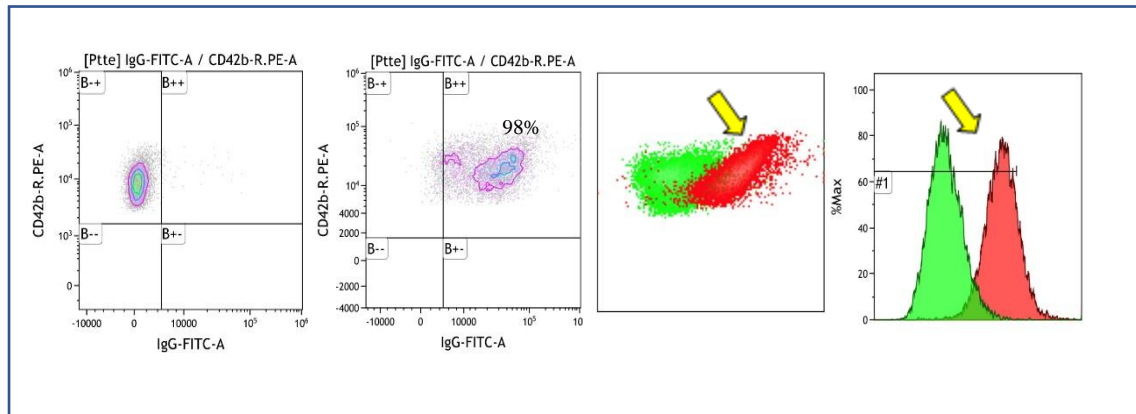
### III.8. Modes d'interprétation

Les résultats sont exprimés en MFI, cette dernière est directement proportionnelle au nombre d'anticorps fixés à la surface des plaquettes. C'est le mode d'interprétation des résultats le plus utilisé par la majorité des études, ainsi que par les kits commercialisés Thrombocytest™ et Platelet PAIg Biocytex™stago™. Néanmoins, on note une interprétation par pourcentage des plaquettes positives dans quelques études (**Rosenfeld, et al., 1987**) ; (**Romero et al., 2000**);(**Nishioka et al., 2005**) ; (**Hee jin huh et al., 2009**).



**Figure 21:** patient faiblement positif (La couleur verte représente le témoin sain, la couleur rouge représente le patient).

On remarque que 18% des plaquettes sont positives chez les patients présentant une MFI IgG à 8600. L'overlay patient/témoin montre une séparation des pics MFI plus évidente que le pourcentage des plaquettes positives



**Figure 22:** Patient fortement positif

On remarque que 98% des plaquettes sont positives chez les patients présentant une MFI IgG à 34000. L'overlay patient/témoin montre une bonne séparation des pics MFI et des populations plaquettaires.

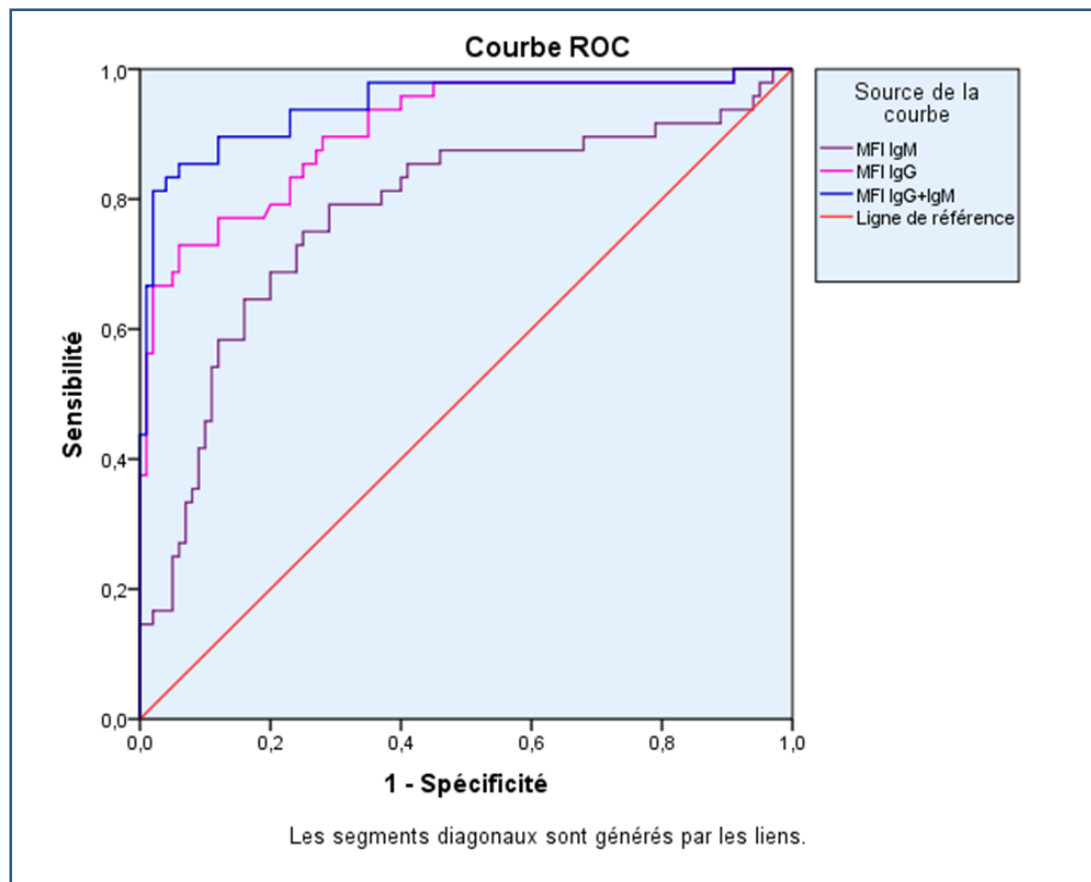
Bien que l'intensité de la fluorescence obtenue chez les patients PTI soit statistiquement plus élevée que celle des témoins, la différence de la MFI entre patients et témoins est de 6700 et 2687 pour l'IgG et l'IgM respectivement pour une MFI moyenne des témoins à 2200 et une valeur seuil à 4900. Donc la différence n'est pas très importante pour permettre une détermination objective du pourcentage des plaquettes positive, principalement dans les cas faiblement positifs. En revanche dans les formes fortement positives, le pourcentage des plaquettes positives est supérieur à 90% mais ces situations sont les moins fréquentes.

Seulement 10% de nos patients positifs ont eu une MFI IgG ou IgM très élevée supérieur à 25000, tandis que 60% ont une MFI faiblement positif inférieur à 9000 (**Annexe III**). En outre, l'interprétation en pourcentage des plaquettes positives ne permet pas une estimation de l'intensité qui est en relation directe avec le type des anticorps et la sévérité de la pathologie.

### III.9. Evaluation des performances du test PAIg

#### III.9.1. Courbe ROC

La courbe ROC (**Figure 23**) permet la détermination et la comparaison des performances diagnostiques de plusieurs tests à l'aide de l'évaluation des aires sous la courbe représentés dans le **Tableau 9**.



**Figure 23** : La courbe ROC

**Tableau 9 : l'évaluation des aires sous la courbe**

<b>Variable(s) des résultats tests</b>	<b>L'air sous la courbe</b>
MFI IgG+IgM	0,926
MFI IgG	0,906
MFI IgM	0,775

D'après ce tableau, on remarque que la meilleure valeur selon la sensibilité et la spécificité est celle de la combinaison (IgG+IgM) qui a une surface sous la courbe ROC à 0,926 très proche de la valeur 1, suivie de celle de IgG, et IgM. La surface sous la courbe ROC pour l'association IgG+IgM était excellente à 0,926 (très proche de 1).

Le choix de la valeur seuil à partir d'une courbe ROC améliore les performances du test (Hezard et al., 2008).

### **III.9.2. Sensibilité et Spécificité du test PAIg**

**Tableau 10 : La sensibilité et la spécificité**

<b>La valeur seuil</b>	<b>Sensibilité</b>	<b>Spécificité</b>
IgG (4900)	65,3%	97%
IgM (4900)	34,7%	91,1%
IgG + IgM (4900)	81,3%	93%

La valeur seuil choisie à partir de la courbe ROC est 4900, elle nous offre la meilleure spécificité tout en gardant une sensibilité élevée. On remarque que cette valeur nous donne une spécificité à 93% et une sensibilité à 81,3% pour l'association IgG+IgM. La sensibilité diminue en cas d'utilisation de l'IgG seul à 65,3% et elle diminue encore davantage pour l'IgM seul à 34,7% mais en gardant une spécificité supérieure à 93% dans les deux cas. Ceci est en rapport avec la prédominance de l'isotype IgG dans le PTI.

La sensibilité et la spécificité représentent des performances propres au test lui-même mais elles nous ne renseignent pas sur les performances du test lorsqu'il est appliqué en pratique courante. Lorsqu'on suspecte un PTI, le clinicien a besoin de savoir la probabilité que le patient soit réellement malade si le test est positif et la probabilité qu'il soit sain si le test est négatif. Ceci n'est possible qu'après la détermination des valeurs prédictives (positive et négative) et les rapports de vraisemblance (**Delacour et al., 2009**) .

Les valeurs prédictives dépendent de la prévalence de la pathologie. Dans notre étude la prévalence des patients était à 32,4% (1 patient pour environ 2 témoins), le calcul de ces valeurs selon le théorème de Bayes (**Nendaz et Perrier, 2004**) montre des excellentes valeurs prédictives, positives à 81% et négative à 91%. Etant donné que ces deux valeurs sont influencées par la prévalence de la maladie, donc dépendantes des caractéristiques épidémiologiques de chaque populations (**Nendaz et Perrier, 2004**).

### III.9.3. Répartition des patients selon l'expression des IgG ou des IgM

**Tableau 11 : L'expression des Ig « IgG,IgM »**

	<b>Nombre</b>	<b>Pourcentage %</b>
IgG Positif	22	45%
IgM positif	07	14%
(IgG+IgM ) positif	10	20%
Faux négatif	09	18%

La population d'étude comporte 22 patients IgG positifs et 7 patients IgM positifs, 10 patients sont IgG+IgM positifs alors que 9 patients sont faux négatifs.

### III.9.4. Fréquence des cas faux négatifs selon le type du PTI (nouveau/chronique)

**Tableau 12 : Les types de la thrombopénie**

<b>Méthode IgG+IgM</b>	<b>cas</b>	<b>PTI chronique</b>	<b>Nouveau cas ou PTI persistant</b>	<b>Total</b>
<b>Vrai positif</b>		14	25	39
<b>Faux négatif</b>		5	4	9
<b>Total</b>		19	29	48

Nous avons noté une fréquence des résultats faux négatifs à 26% (5 cas sur 19) chez les patients présentant un PTI chronique, contre seulement 13% (4 cas sur 29) chez les patients présentant une forme nouvelle ou persistante. Cette différence est statistiquement significative, la valeur P du test khi-2=10<sup>-4</sup>. En outre, nous avons 19 cas de patients présentant un PTI chronique dans notre population, dont 14 sont des vrais positifs IgG ou IgM, la comparaison du taux des plaquettes des cas vrais positifs par rapport aux cas faux négatifs montre un taux moyen de plaquettes chez les 14 cas faux négatifs à 64G/L, nettement supérieur à celui des cas vrais positifs qui était à 34G/L. Nous concluons donc, que le risque d'un résultat faux négatif se multiplie encore plus, lorsqu'on analyse un patient présentant un PTI chronique avec un taux de plaquettes supérieur à 50G/L.

### III.9.5. Rapport de vraisemblance

**Tableau 13 : Rapport de vraisemblance IgG**

<b>Prévalence</b>	0.324324
<b>+LR</b>	33
<b>Taille totale de l'échantillon</b>	148



Le rapport de probabilité positif LR+ est égale à 33 ce qui signifie que le diagnostic est fiable (un bon test) et qu'on est sûr à 95% (Intervalle de confiance à 95 %) si on va refaire l'expérience on trouvera les résultats entre [8.33, 133]

**Tableau 14 : Rapport de vraisemblance « IgM »**

<b>Prévalence</b>	0.324324
<b>+LR</b>	4.43
<b>Taille totale de l'échantillon</b>	148

Le rapport de probabilité positif LR+ est égale à 4.43 ce qui signifie que le diagnostic est faible, et qu'il nécessite de faire d'autres tests et qu'on est sûr à 95% si on va refaire l'expérience on trouvera les résultats entre [2.06-9.53].

**Tableau 15 : Rapport de vraisemblance « IgM + IgG »**

<b>Prévalence</b>	0.324324
<b>+LR</b>	12
<b>Taille totale de l'échantillon</b>	148

Le rapport de probabilité positif LR+ est égale à 12 ce qui signifie que le diagnostic est fiable (un bon test) et qu'on est sûr à 95 % si on va refaire l'expérience on trouvera les résultats entre [5.61-24]

Les rapports de vraisemblances (RV) ou Likelihood ratio LR, permettent l'évaluation du gain diagnostique apporté par le test PAIg. Le LR+ était à 12 ce qui signifie que l'apport au diagnostic positif du test PAIg est fort. À partir des valeurs LR+, nous avons calculé les probabilités poste test en prenant en considération la prévalence de la maladie et après le traçage des nomogrammes de Fagan. Ces valeurs nous permettent de répondre directement à

la question du clinicien (probabilité qu'un patient soit réellement atteint du PTI si le test est positif). Dans les conditions du laboratoire d'hémostase, pour une prévalence estimée à 50% qui représente la probabilité pré test, si le test revient positif, la probabilité poste test est de 90%, donc on est sûr à 90% que le patient est réellement atteint du PTI avec un intervalle de confiance à 95% (81 - 95%).

### III.10. Suivi des patients PTI

Patients	Avant le traitement			Après le traitement		
	Taux de Plaquette	MFI IgG	MFI IgM	Taux de Plaquette	MFI IgM	MFI IgG
<b>1</b>	34,7	7084,7	3548,3	173,9	3193,3	3193,3
<b>2</b>	52,2	20882,7	24941,3	206,4	1329,2	1329,8
<b>3</b>	93,4	7183	4264,1	107,5	2853,9	2109,3
<b>4</b>	15	15005	15005	162,3	1484	2362
<b>5</b>	9,4	15087	16984	29,8	15935,9	17065

On note une réponse au traitement pour les quatre premiers patients dont l'intensité de la fluorescence MFI pour (IgG et IgM) a diminué au-dessous de la valeur seuil normal (4900) avec une augmentation ou normalisation du taux des plaquettes. Par ailleurs le patient N°5 n'avait aucune réponse au traitement, il était cortico-résistant

### III.11. Estimation du cout et du temps nécessaires à la réalisation de la technique PAIg par CMF

**Tableau 16 :** Le cout de la réalisation d'une recherche directe des anticorps antiplaquettaires par cytométrie en flux

Réactif/ consommable	Quantité d'une prise d'essai	Cout DA	Nombre de prises d'essais	Total DA
<b>GoatF(ab')<sub>2</sub> Anti-Human IgG</b>	2	320,78	2	641,56
<b>GoatF(ab')<sub>2</sub> Anti-Human IgM</b>	1,5	200,75	2	401,5
<b>CD41a Monoclonal Antibody (HIP8),PE-Cyanine7,eBioscience</b>	1	195,75	2	392,5
<b>CD42b Monoclonal Antibody (HIP1),PE-Cyanine7,eBioscience</b>	1	194,21	2	388,42
<b>-Focussing fluid</b>	/	182,21	/	182,21
<b>-Shut down</b>				
<b>- consommables</b>				
			<b>Total</b>	2 006,28

L'estimation du cout unitaire des réactifs et des consommables a été faite sur la base des prix figurants sur la facture du fournisseur de l'hôpital militaire pour l'année 2022.

Le cout total d'un dépistage direct des PAIg pour un seul échantillon est estimé à 2006,28 DA. En cas d'analyse d'une série d'échantillons, le cout sera plus réduit. Par exemple, en cas d'analyse de deux échantillons on utilise un seul témoin pour les deux, le cout du test global sera estimé à 3009,42 DA, soit 1504,71 DA pour chaque échantillon.

# Conclusion

Le purpura thrombopénique immunologique est un trouble de la coagulation provoqué par la diminution du nombre de plaquettes (thrombocytes). Dans le PTI, le système immunitaire produit des auto anticorps dirigés contre les plaquettes de la personne elle-même entraînant leur destruction.

En raison de la non disponibilité d'un test biologique qui confirme le diagnostic du PTI notre étude avait l'objectif d'évaluer la recherche directe des immunoglobulines associés aux membranes plaquettaires (PAIg) par la technique de cryométrie en flux développée au niveau du laboratoire d'hémobiologie de l'hôpital militaire de Constantine. Cette dernière a montré des performances analytiques très satisfaisantes et prometteuses.

L'avantage de ce test c'est qu'il détecte bien les anticorps dirigés contre les glycoprotéines plaquettaire et même les anticorps dirigés contre le système HLA ou bien les antigènes des groupes sanguins, on peut l'utiliser même dans les cas des thrombopénies sévères, il ne prend pas beaucoup de temps (75 minutes) et il est moins cher par rapport aux autres tests. En revanche l'inconvénient majeur réside dans la fixation non spécifique des immunoglobulines à la surface plaquettaire ce qui est à l'origine de l'augmentation des cas faux positifs.

Pour que le diagnostic des PTI soit meilleur, il est nécessaire de suivre les recommandations suivantes :

- Bien choisir les anticorps
- Bien sélectionner les patients
- Le patient doit être toujours accompagné d'un témoin sain
- Bien préparer les échantillons
- Bien choisir la valeur seuil.

Ce test n'est pas encore disponible dans les laboratoires publics et privés à cause de plusieurs difficultés notamment la non maîtrise de la cytométrie en flux par les cliniciens et les problèmes de standardisation des résultats non seulement entre les différents laboratoires mais aussi au sein du même laboratoire.

# **Références bibliographiques**

1. Godeau, B. (2009). Purpura thrombopénique immunologique: physiopathologie et traitement. *Transfusion clinique et biologique*, 16(2), 101-105.
2. Moulis, G., Lapeyre-Mestre, M., Adoue, D., & Sailler, L. (2017). Epidemiology and pharmacoepidemiology of immune thrombocytopenia. *La Revue de Medecine Interne*, 38(7), 444-449.
3. Provan, D. (2009). Characteristics of immune thrombocytopenic purpura: a guide for clinical practice. *European Journal of Haematology*, 82, 8-12.
4. Nielsen, O. H., Tuckuviene, R., Nielsen, K. R., & Rosthøj, S. (2016). Flow cytometric measurement of platelet-associated immunoglobulin in children with newly diagnosed Immune Thrombocytopenia. *European Journal of Haematology*, 96(4), 397-403.
5. Neunert, C., Lim, W., Crowther, M., Cohen, A., Solberg Jr, L., & Crowther, M. A. (2011). The American Society of Hematology 2011 evidence-based practice guideline for immune thrombocytopenia. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 117(16), 4190-4207.
6. George, J. N., Woolf, S. H., Raskob, G. E., Wasser, J. S., Aledort, L. M., Ballem, P. J., ... & Warrier, I. (1996). Idiopathic thrombocytopenic purpura: a practice guideline developed by explicit methods for the American Society of Hematology. *Blood*, 88(1), 3-40.
7. Zouitene, Raouf, and Mohamed Brahimi. "Recherche des anticorps antiplaquettaires par cytométrie en flux, chez les patients présentant un purpura thrombopénique immunologique. Detection of anti-platelet antibodies by flow cytometry in patients with immunological thrombocytopenic purpura." *Med Sci* 8.1 (2021): 72-6.
8. Gresele, P., Kleiman, N. S., Lopez, J. A., & Page, C. P. (Eds.). (2017). *Platelets in thrombotic and non-thrombotic disorders: Pathophysiology, pharmacology and therapeutics: An update*. Springer.
9. Anitua, E., Cugat, R., & Sánchez, M. (Eds.). (2018). *Platelet Rich Plasma in Orthopaedics and Sports Medicine*. Springer International Publishing.
10. Que fait la moelle osseuse? . Pierre Fenaux, MD, PhD . Illustrations par Kirk Moldoff . Edition Myelodysplastic Syndromes Foundation, Inc. © 2014 .
11. Kosaki, G., & Kambayashi, J. (2011). Thrombocytogenesis by megakaryocyte; Interpretation by protoplatelet hypothesis. *Proceedings of the Japan Academy, Series B*, 87(5), 254-273.

12. Schulze, H., & Italiano, J. (2016). *Molecular and Cellular Biology of Platelet Formation*. Salmon Tower Building, NY: Springer International Publishing, 10, 978-3.
13. Thon, Jonathan N., and Joseph E. Italiano. "Platelets: production, morphology and ultrastructure." *Antiplatelet Agents* (2012): 3-22.
14. Jandrot-Perrus, M., & Nurden, P. (2010). From platelet functions to therapy. *La Revue de medecine interne*, 31, S319-S323.
15. Debili, Najet, and William Vainchenker. "De macro à micro: l'histoire de la plaquette." *médecine/sciences* 24.5 (2008): 467-469.
16. Godeau, Bertrand. "Purpura thrombopénique auto-immun." *Revue Francophone des Laboratoires* 2008.399 (2008): 9-11.
17. Psaila, Bethan, and James B. Bussel. "Immune thrombocytopenic purpura." *Hematology/oncology clinics of North America* 21.4 (2007): 743-759.
18. Godeau, Bertrand. "Actualités du purpura thrombopénique immunologique." *Revue Francophone des Laboratoires* 449.2013 (2013): 14-18.
19. Zainal, Abir, Amr Salama, and Richard Alweis. "Immune thrombocytopenic purpura." *Journal of community hospital internal medicine perspectives* 9.1 (2019): 59-61.
20. Khellaf, M. "Prise en charge du purpura thrombopénique immunologique de l'adulte." *La Revue de médecine interne* 31 (2010): S329-S332.
21. Kiefel, V. "The MAIPA assay and its applications in immunohaematology." *Transfusion Medicine* 2.3 (1992): 181-188.
22. Storch, W. B. (2000). *Immunofluorescence in clinical immunology: a primer and atlas*. Springer Science & Business Media.
23. Wheatley, Sally P., and Yu-li Wang. "Indirect immunofluorescence microscopy in cultured cells." *Methods in cell biology* 57 (1998): 313-332.
24. Reuter, A. M., J. C. Hendrickx, and P. Franchimont. *Radioimmunoassay*. No. IRE--4/1973. Institut National des Radioelements, 1973.
25. Gan, Stephanie D., and Kruti R. Patel. "Enzyme immunoassay and enzyme-linked immunosorbent assay." *J Invest Dermatol* 133.9 (2013): e12.
26. Hidayat, R., & Wulandari, P. (2021). Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) technique guideline. *Bioscientia Medicina: Journal of Biomedicine and Translational Research*, 5(5), 447-453.



27. Gendron, M. C. (2003). Cytométrie en flux. *EMC Biologie médicale*, 12, 90-60.
28. Christopoulos, C. G., Kelsey, H. C., & Machin, S. J. (1993). A flow cytometric approach to quantitative estimation of platelet surface immunoglobulin G. *Vox sanguinis*, 64(2), 106-115.
29. Hagenström, H., Schlenke, P., Hennig, H., Kirchner, H., & Klüter, H. (2000). Quantification of platelet-associated IgG for differential diagnosis of patients with thrombocytopenia. *Thrombosis and haemostasis*, 84(11), 779-783.
30. Guerra, J. C. D. C., Kanayama, R. H., Nozawa, S. T., Ioshida, M. R., Takiri, I. Y., Lazaro, R. J., ... & Bacal, N. S. (2011). Thrombocytopenia: diagnosis with flow cytometry and antiplatelet antibodies. *Einstein (São Paulo)*, 9, 130-134.
31. Hamidpour, M., Khalili, G., Tajic, N., Shamsian, B. B. S., & Hamidpour, R. (2014). Comparative of three methods (ELIZA, MAIPA and flow cytometry) to determine anti-platelet antibody in children with ITP. *American Journal of Blood Research*, 4(2), 86.
32. Rosenfeld, C. S., Nichols, G., & Bodensteiner, D. C. (1987). Flow cytometric measurement of antiplatelet antibodies. *American journal of clinical pathology*, 87(4), 518-522.
33. Romero-Guzmán, L. T., López-Karpovitch, X., Paredes, R., Barrales-Benitez, O., & Piedras, J. (2000). Detection of platelet-associated immunoglobulins by flow cytometry for the diagnosis of immune thrombocytopenia: a prospective study and critical review. *Haematologica*, 85(6), 627-631.
34. Nishioka, T., Yamane, T., Takubo, T., Ohta, K., Park, K., & Hino, M. (2005). Detection of various platelet-associated immunoglobulins by flow cytometry in idiopathic thrombocytopenic purpura. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry: The Journal of the International Society for Analytical Cytology*, 68(1), 37-42.
35. Huh, H. J., Park, C. J., Kim, S. W., Han, S. H., Jang, S., & Chi, H. S. (2009). Flow cytometric detection of platelet-associated immunoglobulin in patients with immune thrombocytopenic purpura and nonimmune thrombocytopenia. *Annals of Clinical & Laboratory Science*, 39(3), 283-288.
36. Tazzari, P. L., Ricci, F., Vianelli, N., Tassi, C., Belletti, D., Pierri, I., ... & Conte, R. (1995). Detection of platelet-associated antibodies by flow cytometry in hematological autoimmune disorders. *Annals of hematology*, 70(5), 267-272.

37. Nielsen, O. H., Tuckuviene, R., Nielsen, K. R., & Rosthøj, S. (2016). Flow cytometric measurement of platelet-associated immunoglobulin in children with newly diagnosed Immune Thrombocytopenia. *European Journal of Haematology*, 96(4), 397-403.
38. Marieke Schoonen, W., Kucera, G., Coalson, J., Li, L., Rutstein, M., Mowat, F., ... & Kaye, J. A. (2009). Epidemiology of immune thrombocytopenic purpura in the General Practice Research Database. *British journal of haematology*, 145(2), 235-244.
39. Moulis, G., Palmaro, A., Montastruc, J. L., Godeau, B., Lapeyre-Mestre, M., & Sailler, L. (2014). Epidemiology of incident immune thrombocytopenia: a nationwide population-based study in France. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 124(22), 3308-3315.
40. Segal, J. B., & Powe, N. R. (2006). Prevalence of immune thrombocytopenia: analyses of administrative data. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 4(11), 2377-2383.
41. Palau, J., Sancho, E., Herrera, M., Sánchez, S., Mingot, M. E., Upegui, R. I., ... & Sanz, M. A. (2017). Characteristics and management of primary and other immune thrombocytopenias: Spanish registry study. *Hematology*, 22(8), 484-492.
42. Moulis, G., Comont, T., & Adoue, D. (2021). New insights into the epidemiology of immune thrombocytopenia in adult patients: Impact for clinical practice. *La Revue de Médecine Interne*, 42(1), 11-15.
43. Dang, A. P., Signol, N., Bennett-Petitjean, E., Karam, H. H., Penot, A., Vallejo, C., & Bordessoule, D. (2015). Hémopathies sévères révélées aux urgences adultes: étude monocentrique de 108 patients. *Annales françaises de médecine d'urgence*, 5(6), 311-319.
44. Audia, S., Lakomy, D., Guy, J., Leguy-Seguin, V., Berthier, S., Aho, S., ... & Bonnotte, B. (2010). Traitement du purpura thrombopénique immunologique: étude rétrospective de 40 patients. *La Revue de médecine interne*, 31(5), 337-344.
45. Joutsu, L., & Kekomäki, R. (1997). Comparison of the direct platelet immunofluorescence test (direct PIFT) with a modified direct monoclonal antibody-specific immobilization of platelet antigens (direct MAIPA) in detection of platelet-associated IgG. *British journal of haematology*, 96(1), 204-209.
46. Hézard, N., Simon, G., Macé, C., Jallu, V., Kaplan, C., & Nguyen, P. (2008). Is flow cytometry accurate enough to screen platelet autoantibodies?. *Transfusion*, 48(3), 513-518.

47. Porcelijn, L., Huiskes, E., Oldert, G., Schipperus, M., Zwaginga, J. J., & de Haas, M. (2018). Detection of platelet autoantibodies to identify immune thrombocytopenia: state of the art. *British journal of haematology*, 182(3), 423-426.
48. Romero-Guzmán, L. T., López-Karpovitch, X., Paredes, R., Barrales-Benitez, O., & Piedras, J. (2000). Detection of platelet-associated immunoglobulins by flow cytometry for the diagnosis of immune thrombocytopenia: a prospective study and critical review. *Haematologica*, 85(6), 627-631.
49. Nishioka, T., Yamane, T., Takubo, T., Ohta, K., Park, K., & Hino, M. (2005). Detection of various platelet-associated immunoglobulins by flow cytometry in idiopathic thrombocytopenic purpura. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry: The Journal of the International Society for Analytical Cytology*, 68(1), 37-42.
50. Huh, H. J., Park, C. J., Kim, S. W., Han, S. H., Jang, S., & Chi, H. S. (2009). Flow cytometric detection of platelet-associated immunoglobulin in patients with immune thrombocytopenic purpura and nonimmune thrombocytopenia. *Annals of Clinical & Laboratory Science*, 39(3), 283-288.
51. Hézard, N., Simon, G., Macé, C., Jallu, V., Kaplan, C., & Nguyen, P. (2008). Is flow cytometry accurate enough to screen platelet autoantibodies?. *Transfusion*, 48(3), 513-518.
52. Delacour, H., François, N., Servonnet, A., Gentile, A., & Roche, B. (2009). Les rapports de vraisemblance: un outil de choix pour l'interprétation des tests biologiques. *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée*, 24(2), 92-99.
53. Nendaz, M. R., & Perrier, A. (2004). Sensibilité, spécificité, valeur prédictive positive et valeur prédictive négative d'un test diagnostique. *Revue des maladies respiratoires*, 21(2), 390-393.

(1iw): <https://images.app.goo.gl/fXo2DZtvpLvmBoRT9>

(2iw): <https://images.app.goo.gl/qA21S2tKQvA8tsVq6>

(3iw): <https://smart.servier.com/>

(4iw): <https://ars.els-cdn.com/content/image/1-s2.0-S0248866310007496-gr1.jpg>

# **Annexes**

## Annexe I : Mise en marche du cytomètre

### Procédure de démarrage



Les réservoirs du cytomètre

- Vérification des niveaux de liquides et de déchets
- Vérification des niveaux d'eau des réservoirs à liquide ( verser les déchets si les réservoirs sont remplis ).
- Remplissage des réservoirs de liquide de focalisation ( focus ).
- Réchauffage des lasers à la température de fonctionnement.
- Initialisation des pompes.
- Amorcement fluïdique de l'instrument.
- Versement du « shutdown ».

#### 1.1.1. Suivi des performances

Le suivi des performances est un ensemble complet de procédures permettant de surveiller les performances du cytomètre au quotidien.

Le processus de suivi des performances implique :

- Établissement de l'état de référence initial du cytomètre en exécutant les billes de suivi des performances Attune™.
- Exécuter le même ensemble de particules de billes de suivi des performances pour effectuer le test de performance.
- Suivi des évolutions du coefficient de variation et des évolutions des tensions PMT
- Suivi de la linéarité du cytomètre.
- Évaluation de l'efficacité quantique du détecteur (Q) et du fond optique (B).

## Lancement de l'expérimentation

### Création d'une expérience

On clique sur « File » ensuite New Experiment, une autre fenêtre vas s'ouvrir pour pouvoir entrer les spécificités de l'expérience, comme le nombre de tube, le nom de l'expérience.

### Lancement du logiciel

- Se connecter à l'écran de connexion : nom d'utilisateur et mot de passe.
- La page du menu principal s'ouvre.



Fenêtre "Test de performance"

- Cliquez sur : Performance test.
- Le test performance consiste à évaluer les performances du cytometre, ce test doit être réalisé chaque trois mois pour en être sûr que l'automate fonctionne parfaitement

**Performance Test Results**

Performance test successful

Bas: 2029773 - 10/8/2021

3/23/2022 10:16:00 AM

Channel	PMTV	Delta PMTV	Target MFI	MFI	Robust %CV	Qr	Background	Linearity	ASF	Laser Delay	Result
FSC	434	51	300,000	299,122	3.06 %	0.000	0	0.000	1.02	1100	✓
SSC	355	14	300,000	295,384	3.38 %	0.000	0	0.000	1.02	1100	✓
BL1	385	15	300,000	302,622	1.66 %	0.040	222	1.000	1.02	1100	✓
BL2	387	15	300,000	299,855	1.54 %	0.046	151	1.000	1.02	1100	✓
BL3	429	17	300,000	300,542	2.74 %	0.017	76	1.000	1.02	1100	✓
BL4	581	22	300,000	299,763	4.37 %	0.002	183	1.000	1.02	1100	✓
RL1	429	19	300,000	300,082	3.48 %	0.052	105	0.996	1.14	1428	✓
RL2	394	18	300,000	300,954	3.56 %	0.006	243	1.000	1.14	1428	✓
RL3	432	19	300,000	300,661	3.71 %	0.023	134	0.997	1.14	1428	✓

Résultats du test de performance

## Paramétrage du cytomètre

### Ajustement du débit :

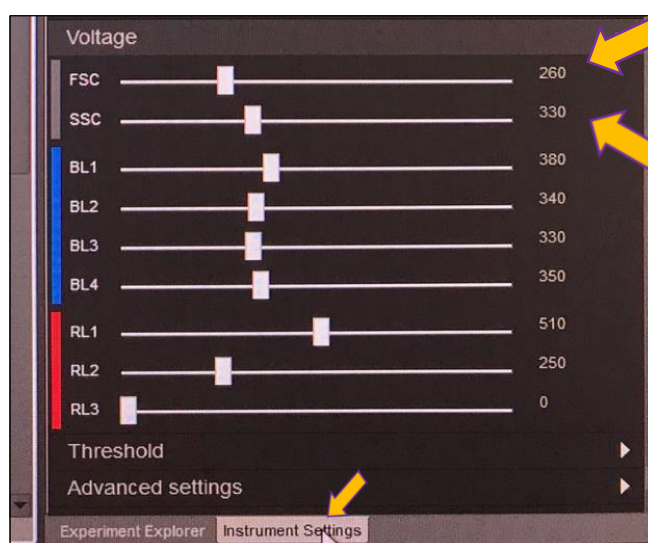
Dans l'onglet Panneau de collections, on peut entrer le volume d'acquisition, pour définir le débit d'acquisition.

### Ajustement du voltage

- Il faut ajuster les paramètres FSC (Forward Scatter) et SSC (Side Scatter) sur le panneau de commande en cliquant sur Instrument setting pour placer la population sur l'échelle soit en ajustant le curseur soit en saisissant la valeur numérique spécifique.

- Ajustement du voltage .

- Ajustement du seuil (threshold).



Fenêtre « Instrument setting »

## **Acquisition des données**

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

Voltage :

- FSC : 260
- SSC : 330
- utilisant une échelle logarithmique avec un seuil (threshold) très faible à 5.

- Une vitesse d'acquisition 100µl/minutes.
- 7000 événements pour l'obtention d'une courbe lisible.
- Nombre de plaquettes analysées 5000 éléments.
- Mise en marche de l'automate (cytomètre).

## **Ajustement du seuil FSC**

L'ajustement du seuil se fait aussi sur le panneau de commande de l'instrument pour supprimer les événements indésirables et l'arrière-plan. D'autres réglages peuvent se faire comme :

- L'ajustement de la grille de dispersion sur la population d'intérêt afin que les histogrammes de fluorescence reflètent la population pour laquelle vous optimisez vos tensions.
- L'ajustement des canaux de fluorescence pour placer votre échantillon non étiqueté dans la zone appropriée de la parcelle (généralement autour de  $10^3$  pour le contrôle le non coloré).



## Annexe II : Données épidémiologiques

### Répartition des patients selon l'âge

Catégorie	Enfants	Adultes	Agés
Effectif	10	35	3

### Répartition des patients selon le sexe

Effectif	Sexe
31	Femmes
17	Hommes

### Répartition des patients selon le type de traitement

Traitement	Effectif
Corticoïdes	19
Gamma Globuline	4
Sans TRT	25

### Répartition des patients selon la présence du syndrome hémorragique

Syndrome Hémorragique	Pétéchie s	Ecchymose s	Hémorragie s digestives	Hémorragies menningique s	Aucun syndrome hémorragique
Effectif	4	3	2	1	38

## Répartition des témoins thrombopéniques selon la cause de la thrombopénie

Pathologie	Effectif
Leucémie aigue	42
Aplasie	5
Pancytopenie	3

## Taux des plaquettes chez les patients et les témoins thrombopéniques.

Population	Nombre	Moyenne « Taux des plaquettes G/l»	Ecartype	Signification du test T
Patients	48	43,3	43,3	0,657
Témoins thrombopéniques	45	65,1	29,3	

## Techniques de PAIg direct par cytométrie en flux

Auteur	anticorps	contrôle	Expression des résultats	sensibilité	spécificité
Rosenfeld 44 PTI	FITC goat anti-IgG humaine	Sheep anti-mouse	% des plaquettes + (moyenne+3SD)	92%	81,8%
Tazzari 34 PTI	FITC goat anti-IgG humaine	Ptte normales + goat anti IgG humaine	MFI	85%	100%

## Annexe III : Répartition des malades en fonction de la MFI

patient	pit	VMP	% vraies plac	taille structu	IgM	CV IgM	IgG	CV IgG		
1	3	7,5	50,3	107.974,51	12093,9	370	23.494,46	75,18		
2	88	12,8	58,7	70767,8	4340,1	428,2	14903,6	275,7		
3	33	10	34,9	71616,5	1331,4	618,1	2136,3	464,5		
4	4	8,9	13	106077,8	3149,9	402,9	11068,1	397,2		
5	61	8,7	89,1	43351,4	2019,6	797,2	12902,3	326,1		
6	59,3	9,65	63,8	58332,2	2158,9	555,5	7285,7	384,2		
7	6,7	9,77	14,6	106536,8	11961,8	283,5	8508,5	366,1		
8	11,6	11,01	0,8	97869,9	6752,4	576	18798,6	516		
9	33	62,3	28,9	66577,8	3603,5	493,4	3603,5	493,4		
10	46	11,4	65,7	72.133,24	5.351,00	91,26	2.509,82	140,67		
11	7,3	13,78	19,6	67.061,19	5.203,92	195,84	7.577,47	188,15		
12	15	10,91	8,8	29.662,07	14.735,09	117,29	1.989,42	207,43		
13	33	10,6	27,1	64.628,43	3.847,81	127,55	9.664,99	123,75		
14	59,8	11,4	98,2	62.979,59	3.346,44	106,10	2.840,14	109,48		
15	45,1	11,68	32,4	103.313,69	4.277,90	132	6.402,95	157,7		
16	32	23	86,6	64.905,94	3.977,48	89,6	6.707,70	74,55		
17	14,8	10,12	92,6	103.467,67	2.390,83	171,39	2.693,69	185,68		
18	27	10,47	58,5	41.867,67	5.564,30	140,03	8.805,46	130,64		
19	11,6	11,1	0,5	112.787,71	2.721,25	215,85	19.344,23	168,87		
20	51	13,81	39,5	105.261,14	2.228,94	205,21	2.794,68	156,13		
21	7	10,81	61,7	66.103,74	4.417,52	99,75	4.154,87	112,57		
22	208	7,4	71,1	40.414,88	3.048,29	118,37	39.949,80	94,08		
23	37	8,04	56,7	63.940,04	6.708,46	155,46	12.248,52	262		
24	45,5	10,26	55,6	49.950,60	4.624,69	105,68	8.701,26	134,42		
25	11,3	13,35	43,5	79.423,98	16.790,75	82,61	3.450,13	120,92		
26	138,1	11,51	35,7	95.146,01	4.269,24	129,28	5.555,86	159,81		
27	69	11,69	96,2	71.325,92	4.747,48	85,85	6.273,72	96,23		
28	54,5	12,46	91,9	116.603,73	4.760,67	106,1	5.943,45	108,24		
29	93,4	8,80	67,3	42.912,28	4.501,55	116,43	7.416,78	70,18		
30	43,6	10,23	57,7	86.497,32	1.064,51	614,77	3.996,57	162,3		
31	70,9	10,84	83,5	55.413,06	4.937,28	143,61	1.878,51	100,71		
32	44,6	10,62	62,6	51.765,78	888,7	231,37	875,71	163,33		
33	5,2	10,18	12,6	129.730,98	7.443,72	109,5	5.757,14	135,74		
34	22,8	12,49	97,2	82.359,79	3.529,45	144,03	9.608,61	66,69		
35	152	9,57	32	37.484,57	4.259,40	158,89	9.805,56	151,73		
36	13,9	10,88	47,5	94.025,95	3.488,49	201,14	7.716,39	114,9		
37	64,8	10,40	78,6	63.561,33	1.597,03	102,05	7.585,06	75,36		
38	79,9	10,29	66,8	72.443,93	828,71	409,44	3.425,27	165,45		
39	19,9	10,37	53,5	78.938,29	2.748,21	141,54	13.690,96	50,03		
40	39	7,8	60,8	53.793,20	3.590,01	101,28	5.189,09	109,87		
41	14	10,5	40,7	58837,1	3092,3	151,1	6707,9	148,2		
42	34,7	7,08	14,4	66579,4	3380,2	242,9	6552,5	155,3	2038,2	76,9
43	63,1	10,39	60,1	60743,9	508,9	556,8	2183,8	129,5	2440,7	57,8
44	9,2	8,83	7,4	911985,2	6700	147,1	2559	212,3	2518,7	119,7
45	35,6	11,49	28,1	120250,6	5394,5	139,5	30220,9	74,5		
46	61,3	12,17	6,7	117416,4	6212,4	135,8	2634,5	102,1		
47	29,8	11,57	27,5	98849,6	17851,7	93,3	17058,9	91,8	8003,2	92,2
48	25,9	9,95	7,7	49040,4	8392,7	181,4	19964,3	107,3	5839,2	117,1

**Année universitaire : 2021-2022**

**Présenté par : LARABA Yasmine**

**MALEK Nesrine**

**RIGHI Abir**

## **Applications de la cytométrie en flux dans le diagnostic des thrombopénies immunologiques**

**Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master en Immunologie moléculaire et cellulaire**

Le purpura thrombopénique immunologique (PTI) est la cytopénie auto-immune la plus fréquente de l'adulte. Il est défini par une thrombopénie isolée inférieure à 100 G/l, en l'absence de toute autre cause identifiée et/ou de maladie associée. Notre objectif était de décrire les caractéristiques épidémiologiques et biologiques du PTI dans le Constantinois et d'évaluer l'utilisation de la cytométrie en flux en routine dans le diagnostic du PTI. Nous avons mené une étude transversale ainsi qu'une étude rétrospective au laboratoire d'hémostase de l'Hôpital Militaire Régional de Constantine pendant une durée de trois mois. La population d'étude est composée de 48 patients PTI connus, 50 témoins sains (normaux) et 50 témoins thrombopéniques. Les résultats montrent que l'âge moyen de nos patients était de 27 ans avec des extrémités allant de 1 an jusqu'à 62 ans. La répartition de la population selon l'âge montre un pic à l'âge adulte (18 à 50 ans) représentant 73% de la population. La répartition selon le sexe montre une prédominance féminine, le sexe ratio femme/homme était 1.9. L'étude par cytométrie en flux a permis d'identifier les plaquettes associées aux immunoglobulines PAIg. Plusieurs optimisations ont été introduites afin d'améliorer les résultats du test. La sensibilité et la spécificité pour l'association IgG-IgM que nous avons eu étaient respectivement de 81,3% et 93% avec un bon rapport de vraisemblance  $LR+ = 12$ . L'amélioration des performances du test dépend du bon choix de la valeur seuil de la courbe ROC. Ce cadre d'étude montre que la cytométrie en flux est indispensable pour une identification plus précise du purpura thrombopénique immunologique permettant un bon diagnostic et une meilleure prise en charge.

**Mots-clefs :** PTI, thrombopénie, PAIg, Cytométrie en flux, Immunoglobulines (IgG, IgM).

**Laboratoires de recherche :** Laboratoire d'hémostase de L'hôpital Militaire Régional- Constantine

**Encadreur :** ZOUITENE Raouf (MA-A – Faculté de médecine, Constantine 3).

**Co encadreur :** HADDAD Souad (MA-A- Université Frères Mentouri – Constantine 1).

**Examineur 1 :** LOUAR Ibtissem ( Prof- Université Frères Mentouri, Constantine 1).

**Examineur 2 :** CHETTOUM Aziez ( Prof- Université Frères Mentouri, Constantine 1).

