



HAL
open science

Évaluation de la fraction des plaquettes immatures (IPF) sur l'automate à numération Sysmex XE-5000 dans le diagnostic des thrombopénies périphériques et centrales au Centre Hospitalier Universitaire de Rouen

Elsa Bera

► To cite this version:

Elsa Bera. Évaluation de la fraction des plaquettes immatures (IPF) sur l'automate à numération Sysmex XE-5000 dans le diagnostic des thrombopénies périphériques et centrales au Centre Hospitalier Universitaire de Rouen. Médecine humaine et pathologie. 2015. dumas-01236097

HAL Id: dumas-01236097

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01236097>

Submitted on 1 Dec 2015

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

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

FACULTE MIXTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE DE ROUEN

ANNEE 2015

N°

THESE POUR LE DOCTORAT EN MEDECINE

(Diplôme d'état)

Par

Elsa BERA

Née le 13 avril 1987 à LAON

PRESENTEE ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT LE 12 octobre 2015

Évaluation de la fraction des plaquettes immatures (IPF) sur
l'automate à numération Sysmex XE-5000 dans le diagnostic des
thrombopénies périphériques et centrales au Centre Hospitalier
Universitaire de Rouen

Président de jury : Professeur Hervé LEVESQUE

Directeur de thèse : Docteur Gérard BUCHONNET

Membres du jury : Professeur Fabienne TAMION

Professeur Martine PESTEL-CARON

Docteur Bruno FILHON

FACULTE MIXTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE DE ROUEN

ANNEE 2015

N°

THESE POUR LE DOCTORAT EN MEDECINE

(Diplôme d'état)

Par

Elsa BERA

Née le 13 avril 1987 à LAON

PRESENTEE ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT LE 12 octobre 2015

Évaluation de la fraction des plaquettes immatures (IPF) sur
l'automate à numération Sysmex XE-5000 dans le diagnostic des
thrombopénies périphériques et centrales au Centre Hospitalier
Universitaire de Rouen

Président de jury : Professeur Hervé LEVESQUE

Directeur de thèse : Docteur Gérard BUCHONNET

Membres du jury : Professeur Fabienne TAMION

Professeur Martine PESTEL-CARON

Docteur Bruno FILHON

ANNEE UNIVERSITAIRE 2014 - 2015
U.F.R. DE MEDECINE ET DE-PHARMACIE DE ROUEN

DOYEN : **Professeur Pierre FREGER**

ASSESEURS : **Professeur Michel GUERBET**
Professeur Benoit VEBER
Professeur Pascal JOLY
Professeur Stéphane MARRET

I - MEDECINE

PROFESSEURS DES UNIVERSITES – PRATICIENS HOSPITALIERS

Mr Frédéric ANSELME	HCN	Cardiologie
Mme Isabelle AUQUIT AUCKBUR	HCN	Chirurgie plastique
Mr Bruno BACHY (<i>surnombre</i>)	HCN	Chirurgie pédiatrique
Mr Fabrice BAUER	HCN	Cardiologie
Mme Soumeya BEKRI	HCN	Biochimie et biologie moléculaire
Mr Jacques BENICHOU	HCN	Bio statistiques et informatique médicale
Mr Jean-Paul BESSOU	HCN	Chirurgie thoracique et cardio-vasculaire
Mme Françoise BEURET-BLANQUART (<i>surnombre</i>)	HCN	Commission E.P.P. D.P.C. Pôle Qualité
Mr Guy BONMARCHAND (<i>surnombre</i>)	HCN	Réanimation médicale
Mr Olivier BOYER	UFR	Immunologie
Mr Jean-François CAILLARD (<i>surnombre</i>)	HCN	Médecine et santé au travail
Mr François CARON	HCN	Maladies infectieuses et tropicales
Mr Philippe CHASSAGNE	HCN	Médecine interne (gériatrie)
Mr Vincent COMPERE	HCN	Anesthésiologie et réanimation chirurgicale
Mr Antoine CUVELIER	HB	Pneumologie
Mr Pierre CZERNICHOW	HCH	Epidémiologie, économie de la santé
Mr Jean-Nicolas DACHER	HCN	Radiologie et imagerie médicale

Mr Stéfán DARMONI	HCN	Informatique médicale et techniques de communication
Mr Pierre DECHELOTTE	HCN	Nutrition
Mme Danièle DEHESDIN (<i>surnombre</i>)	HCN	Oto-rhino-laryngologie
Mr Frédéric DI FIORE	CB	Cancérologie
Mr Fabien DOGUET	HCN	Chirurgie Cardio Vasculaire
Mr Jean DOUCET	SJ	Thérapeutique - Médecine interne et gériatrie
Mr Bernard DUBRAY	CB	Radiothérapie
Mr Philippe DUCROTTE	HCN	Hépto-gastro-entérologie
Mr Frank DUJARDIN	HCN	Chirurgie orthopédique - Traumatologique
Mr Fabrice DUPARC	HCN	Anatomie - Chirurgie orthopédique et traumatologique
Mr Eric DURAND	HCN	Cardiologie
Mr Bertrand DUREUIL	HCN	Anesthésiologie et réanimation chirurgicale
Mme Hélène ELTCHANINOFF	HCN	Cardiologie
Mr Thierry FREBOURG	UFR	Génétique
Mr Pierre FREGER	HCN	Anatomie - Neurochirurgie
Mr Jean François GEHANNO	HCN	Médecine et santé au travail
Mr Emmanuel GERARDIN	HCN	Imagerie médicale
Mme Priscille GERARDIN	HCN	Pédopsychiatrie
Mr Michel GODIN (<i>surnombre</i>)	HB	Néphrologie
M. Guillaume GOURCEROL	HCN	Physiologie
Mr Philippe GRISE (<i>surnombre</i>)	HCN	Urologie
Mr Olivier GUILLIN	HCN	Psychiatrie Adultes
Mr Didier HANNEQUIN	HCN	Neurologie
Mr Fabrice JARDIN	CB	Hématologie
Mr Luc-Marie JOLY	HCN	Médecine d'urgence
Mr Pascal JOLY	HCN	Dermato - Vénérologie
Mme Annie LAQUERRIERE	HCN	Anatomie et cytologie pathologiques
Mr Vincent LAUDENBACH	HCN	Anesthésie et réanimation chirurgicale
Mr Xavier LE LOET	HCN	Rhumatologie
Mr Joël LECHEVALLIER	HCN	Chirurgie infantile
Mr Hervé LEFEBVRE	HB	Endocrinologie et maladies métaboliques
Mr Thierry LEQUERRE	HB	Rhumatologie
Mr Eric LEREBOURS	HCN	Nutrition
Mme Anne-Marie LEROI	HCN	Physiologie
Mr Hervé LEVESQUE	HB	Médecine interne
Mme Agnès LIARD-ZMUDA	HCN	Chirurgie Infantile

Mr Pierre Yves LITZLER	HCN	Chirurgie cardiaque
Mr Bertrand MACE	HCN	Histologie, embryologie, cytogénétique
M. David MALTETE	HCN	Neurologie
Mr Christophe MARGUET	HCN	Pédiatrie
Mme Isabelle MARIE	HB	Médecine interne
Mr Jean-Paul MARIE	HCN	Oto-rhino-laryngologie
Mr Loïc MARPEAU	HCN	Gynécologie - Obstétrique
Mr Stéphane MARRET	HCN	Pédiatrie
Mme Véronique MERLE	HCN	Epidémiologie
Mr Pierre MICHEL	HCN	Hépto-gastro-entérologie
Mr Bruno MIHOUT (<i>surnombre</i>)	HCN	Neurologie
Mr Jean-François MUIR	HB	Pneumologie
Mr Marc MURAINÉ	HCN	Ophtalmologie
Mr Philippe MUSETTE	HCN	Dermatologie - Vénérologie
Mr Christophe PEILLON	HCN	Chirurgie générale
Mr Jean-Marc PERON (<i>surnombre</i>)	HCN	Stomatologie et chirurgie maxillo-faciale
Mr Christian PFISTER	HCN	Urologie
Mr Jean-Christophe PLANTIER	HCN	Bactériologie - Virologie
Mr Didier PLISSONNIER	HCN	Chirurgie vasculaire
Mr Bernard PROUST	HCN	Médecine légale
Mr François PROUST	HCN	Neurochirurgie
Mme Nathalie RIVES	HCN	Biologie du développement et de la reproduction
Mr Jean-Christophe RICHARD (<i>détachement</i>)	HCN	Réanimation médicale - Médecine d'urgence
Mr Horace ROMAN	HCN	Gynécologie - Obstétrique
Mr Jean-Christophe SABOURIN	HCN	Anatomie - Pathologie
Mr Guillaume SAVOYE	HCN	Hépto-gastrologie
Mme Céline SAVOYE-COLLET	HCN	Imagerie médicale
Mme Pascale SCHNEIDER	HCN	Pédiatrie
Mr Michel SCOTTE	HCN	Chirurgie digestive
Mme Fabienne TAMION	HCN	Thérapeutique
Mr Luc THIBERVILLE	HCN	Pneumologie
Mr Christian THUILLEZ	HB	Pharmacologie
Mr Hervé TILLY	CB	Hématologie et transfusion
Mr Jean-Jacques TUECH	HCN	Chirurgie digestive
Mr Jean-Pierre VANNIER	HCN	Pédiatrie génétique
Mr Benoît VEBER	HCN	Anesthésiologie - Réanimation chirurgicale

Mr Pierre VERA	CB	Biophysique et traitement de l'image
Mr Eric VERIN	CRMPR	Médecine physique et de réadaptation
Mr Eric VERSPYCK	HCN	Gynécologie obstétrique
Mr Olivier VITTECOQ	HB	Rhumatologie
Mr Jacques WEBER	HCN	Physiologie

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES – PRATICIENS HOSPITALIERS

Mme Noëlle BARBIER-FREBOURG	HCN	Bactériologie – Virologie
Mr Jeremy BELLIEN	HCN	Pharmacologie
Mme Carole BRASSE LAGNEL	HCN	Biochimie
Mme Valérie BRIDOUX HUYBRECHTS	HCN	Chirurgie Vasculaire
Mr Gérard BUCHONNET	HCN	Hématologie
Mme Mireille CASTANET	HCN	Pédiatrie
Mme Nathalie CHASTAN	HCN	Physiologie
Mme Sophie CLAEYSSENS	HCN	Biochimie et biologie moléculaire
Mr Moïse COEFFIER	HCN	Nutrition
Mr Stéphanie DERREY	HCN	Neurochirurgie
Mr Manuel ETIENNE	HCN	Maladies infectieuses et tropicales
Mr Serge JACQUOT	UFR	Immunologie
Mr Joël LADNER	HCN	Epidémiologie, économie de la santé
Mr Jean-Baptiste LATOUCHE	UFR	Biologie cellulaire
Mr Thomas MOUREZ	HCN	Bactériologie
Mr Jean-François MENARD	HCN	Biophysique
Mme Muriel QUILLARD	HCN	Biochimie et biologie moléculaire
Mr Vincent RICHARD	UFR	Pharmacologie
Mr Mathieu SALAUN	HCN	Pneumologie
Mme Pascale SAUGIER-VEBER	HCN	Génétique
Mme Anne-Claire TOBENAS-DUJARDIN	HCN	Anatomie
Mr Olivier TROST	HCN	Chirurgie Maxillo Faciale

PROFESSEUR AGREGE OU CERTIFIE

Mme Dominique LANIEZ	UFR	Anglais
Mr Thierry WABLE	UFR	Communication

II - PHARMACIE

PROFESSEURS

Mr Thierry BESSON	Chimie Thérapeutique
Mr Jean-Jacques BONNET	Pharmacologie
Mr Roland CAPRON (PU-PH)	Biophysique
Mr Jean COSTENTIN (Professeur émérite)	Pharmacologie
Mme Isabelle DUBUS	Biochimie
Mr Loïc FAVENNEC (PU-PH)	Parasitologie
Mr Jean Pierre GOULLE	Toxicologie
Mr Michel GUERBET	Toxicologie
Mme Isabelle LEROUX - NICOLLET	Physiologie
Mme Christelle MONTEIL	Toxicologie
Mme Martine PESTEL-CARON (PU-PH)	Microbiologie
Mme Elisabeth SEGUIN	Pharmacognosie
Mr Rémi VARIN (PU-PH)	Pharmacie clinique
Mr Jean-Marie VAUGEOIS	Pharmacologie
Mr Philippe VERITE	Chimie analytique

MAITRES DE CONFERENCES

Mme Cécile BARBOT	Chimie Générale et Minérale
Mme Dominique BOUCHER	Pharmacologie
Mr Frédéric BOUNOURE	Pharmacie Galénique
Mr Abdeslam CHAGRAOUI	Physiologie
Mr Jean CHASTANG	Biomathématiques
Mme Marie Catherine CONCE-CHEMTOB santé	Législation pharmaceutique et économie de la
Mme Elizabeth CHOSSON	Botanique
Mme Cécile CORBIERE	Biochimie
Mr Eric DITTMAR	Biophysique
Mme Nathalie DOURMAP	Pharmacologie
Mme Isabelle DUBUC	Pharmacologie

Mr Abdelhakim ELOMRI	Pharmacognosie
Mr François ESTOUR	Chimie Organique
Mr Gilles GARGALA (MCU-PH)	Parasitologie
Mme Najla GHARBI	Chimie analytique
Mme Marie-Laure GROULT	Botanique
Mr Hervé HUE	Biophysique et mathématiques
Mme Laetitia LE GOFF	Parasitologie - Immunologie
Mme Hong LU	Biologie
Mme Sabine MENAGER	Chimie organique
Mr Mohamed SKIBA	Pharmacie galénique
Mme Malika SKIBA	Pharmacie galénique
Mme Christine THARASSE	Chimie thérapeutique
Mr Frédéric ZIEGLER	Biochimie

PROFESSEURS ASSOCIES

Mme Cécile GUERARD-DETUNCQ	Pharmacie officinale
Mr Jean-François HOUIVET	Pharmacie officinale

PROFESSEUR CERTIFIE

Mme Mathilde GUERIN	Anglais
----------------------------	---------

ASSISTANT HOSPITALO-UNIVERSITAIRE

Mr Jérémie MARTINET	Immunologie
----------------------------	-------------

ATTACHES TEMPORAIRES D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE

Mr Romy RAZAKANDRAINIBE	Parasitologie
Mr François HALLOUARD	Galénique

LISTE DES RESPONSABLES DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES

Mme Cécile BARBOT	Chimie Générale et minérale
Mr Thierry BESSON	Chimie thérapeutique
Mr Roland CAPRON	Biophysique
Mr Jean CHASTANG	Mathématiques
Mme Marie-Catherine CONCE-CHEMTOB	Législation et économie de la santé
Mme Elisabeth CHOSSON	Botanique
Mr Jean-Jacques BONNET	Pharmacodynamie
Mme Isabelle DUBUS	Biochimie
Mr Loïc FAVENNEC	Parasitologie
Mr Michel GUERBET	Toxicologie
Mr François ESTOUR	Chimie organique
Mme Isabelle LEROUX-NICOLLET	Physiologie
Mme Martine PESTEL-CARON	Microbiologie
Mme Elisabeth SEGUIN	Pharmacognosie
Mr Mohamed SKIBA	Pharmacie galénique
Mr Philippe VERITE	Chimie analytique

III – MEDECINE GENERALE

PROFESSEUR

Mr Jean-Loup **HERMIL** UFR Médecine générale

PROFESSEURS ASSOCIES A MI-TEMPS

Mr Emmanuel **LEFEBVRE** UFR Médecine Générale

Mr Alain **MERCIER** UFR Médecine générale

Mr Philippe **NGUYEN THANH** UFR Médecine générale

MAITRE DE CONFERENCES ASSOCIE A MI-TEMPS

Mr Pascal **BOULET** UFR Médecine générale

Mme Elisabeth **MAUVIARD** UFR Médecine générale

Mme Yveline **SEVRIN** UFR Médecine générale

Mme Marie Thérèse **THUEUX** UFR Médecine générale

ENSEIGNANTS MONO-APPARTENANTS

PROFESSEURS

Mr Serguei FETISSOV (med)	Physiologie (ADEN)
Mr Paul MULDER (phar)	Sciences du Médicament
Mme Su RUAN (med)	Génie Informatique

MAITRES DE CONFERENCES

Mr Sahil ADRIOUCH (med) Inserm 905)	Biochimie et biologie moléculaire (Unité)
Mme Gaëlle BOUGEARD-DENOYELLE (med)	Biochimie et biologie moléculaire (UMR 1079)
Mme Carine CLEREN (phar)	Neurosciences (Néovasc)
Mme Pascaline GAILDRAT (phar)	Génétique moléculaire humaine (UMR 1079)
Mr Nicolas GUEROUT (phar)	Neurophysiologie
Mr Antoine OUVRARD-PASCAUD (med)	Physiologie (Unité Inserm 1076)
Mr Frédéric PASQUET	Sciences du langage, orthophonie
Mme Isabelle TOURNIER (phar)	Biochimie (UMR 1079)

CHEF DES SERVICES ADMINISTRATIFS : Mme Véronique **DELAFONTAINE**

HCN - Hôpital Charles Nicolle

HB - Hôpital de BOIS GUILLAUME

CB - Centre Henri Becquerel

CHS - Centre Hospitalier Spécialisé du Rouvray

**CRMPR - Centre Régional de Médecine Physique et de Réadaptation
Rouen**

SJ – Saint Julien

Par délibération en date du 3 mars 1967, la faculté a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui seront présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner aucune approbation ni improbation

A Monsieur le Professeur Hervé LEVESQUE,

Vous me faites l'honneur de présider ce jury de thèse.

Je vous remercie de l'intérêt que vous avez porté à ce travail et vous prie de recevoir ici toute ma reconnaissance et l'expression de mon plus profond respect.

A Madame le Professeur Fabienne TAMION,

Vous me faites l'honneur de siéger parmi le jury de cette thèse.

Je vous prie de trouver ici l'expression de ma sincère gratitude pour l'intérêt que vous portez à ce travail et de recevoir mon plus grand respect.

A Madame le Professeur Martine PESTEL-CARON,

Vous me faites l'honneur de siéger parmi le jury de cette thèse.

Je vous remercie pour votre enseignement et votre disponibilité lors de mon passage dans votre service.

Veillez trouver dans ce travail l'expression de mon plus grand respect et de toute ma reconnaissance.

A Monsieur le Docteur Bruno FILHON,

Tu me fais l'honneur de siéger parmi le jury de cette thèse.

Reçois ici l'expression de ma sincère gratitude et de mes remerciements pour l'intérêt que tu as porté à ce travail.

A Monsieur le Docteur Gérard BUCHONNET,

Tu m'as fait l'honneur de bien vouloir assurer la direction de cette thèse.

Je te remercie pour ton enseignement, ta disponibilité, ta confiance et la bienveillance dont tu as fait preuve au cours de mon internat et durant ce travail de thèse.

Tu as su me transmettre ta passion et ta curiosité pour la cytologie.

Je te prie de croire en l'expression de ma sincère gratitude et de tout mon respect.

A Bernard LENORMAND, merci pour la confiance que vous voulez bien m'accorder, veuillez trouver ici le témoignage de mes sincères remerciements pour votre soutien dans le passé et pour les années à venir.

A Marie-Paule CALLAT qui m'a transmis sa passion pour la cytologie, merci pour votre rigueur et vos enseignements de si grande qualité.

A Sylvie DALIPHARD pour sa gaieté et son œil de lynx ; ton énergie et ton enthousiasme sont communicatifs.

A Catherine BOUTET qui m'a transmis sa passion de la cytométrie, merci pour ta bienveillance et ta patience.

A Jeanne-Yvonne BORG, Véronique LECAM-DUCHEZ, Agnès LAHARY, Virginie BARBAY, Marie-Hélène CHRETIEN, Marielle FRESEL, Pierre CHAMOUNI, au plaisir de travailler à vos côtés, merci pour votre gentillesse et votre disponibilité.

A tous les techniciens et secrétaires de l'IBC que j'ai croisé durant mon internat et plus spécialement à ceux du laboratoire d'hématologie : merci pour votre accueil et votre gentillesse. Un merci plus particulièrement à Florence pour ta bonne humeur, toujours là quand j'ai besoin de toi. A Dany et Laure pour leur aide dans ce travail.

A Benoit, André et au Dr MENARD pour leur aide, plus qu'indispensable, pour les statistiques.

Aux biologistes et à toute l'équipe du laboratoire du CHG de Dieppe pour leur accueil et leur gentillesse pendant mon semestre chez eux.

A toutes les équipes : biologistes, techniciens avec lesquels j'ai travaillé durant mon internat et qui m'ont appris mon métier, merci !

A tous mes co-internes et surtout à ceux de ce dernier semestre pour leurs soutiens ces derniers mois : Florian, Victor, Aurélien, Gwendoline, Valentin, Julien, Isabelle et Marie-Christine.

A mes parents, merci pour votre soutien sans faille et votre amour tout au long de ces années, je n'en serai pas là sans vous, je vous aime. Merci pour vos relectures de ce travail de thèse même si vous n'y compreniez rien.

A mes grands-parents, je sais combien vous seriez fiers si vous étiez présents aujourd'hui.

A ma sœur chérie, Laure c'est grâce à toi que j'ai commencé cette grande aventure, merci de ta présence à mes côtés depuis toutes ces années.

A Pauline ma sœur de cœur, à tous ces moments partagés, nos orgies de sushi aux mojitos de l'adriatique.

A Anaïs, mon binôme rouennais dans cet internat et en dehors, à tous les bons moments passés ensemble et à venir.

A Lulu, mon petit clown, toujours présente dans les bons et les mauvais moments, tu martyrises mon chat mais je t'aime quand même. Et à Maxou, pour nos soirées foot.

A mes copines d'Amiens et maintenant d'ailleurs parce que ça ne s'arrêtera jamais : Anna, Martine, Didine, Flore, Heïdi et Banou.

A Réjane, ma deuxième grand-mère.

A Jean-Pierre, merci pour ton accueil et ta gentillesse durant mes escapades parisiennes.

A Ulysse et Augustin mes loulous devenus beaucoup trop grands, et à leurs parents Marie-Aude et Laurent.

A Richard et Rosette, pour leur affection et leur accueil toujours très chaleureux.

A Juliette, au trio que l'on forme avec Anaïs depuis le début de cette vie rouennaise et j'espère pour longtemps encore.

A Jovani, mon chef préféré, à tous nos cafés et ces heures à squatter ton bureau bientôt le mien!!

A Bérangère et Michael, mes copains hémato, avec lesquels j'ai découvert cette spécialité fascinante.

A Céline, mon binôme d'hémato dans cette fin d'internat et pour quelques années encore.

A Justine, pour la fraîcheur et la folie que tu m'as apportée ces derniers mois.

A Vico, mon ami de toujours, merci pour ta gentillesse et ta fidélité toutes ces années.

A Chloé et Manon, à nos soirées papotages et nos week-end cocooning.

A tous mes copains bio & co : Rayan, Yoann, Charline, Camille, Aurélien, Benoit, Florian, Ismaël, Céline, Cédric, Valentin, Gwendoline...

Sommaire

Introduction	1
I) Rappel sur la mégacaryocytopoïèse	3
1- Les étapes de développement et de maturation.....	3
1.1- Les progéniteurs mégacaryocytaires	3
1.2- Les précurseurs mégacaryocytaires	4
1.2.1- Les précurseurs immatures	4
1.2.2- Les mégacaryocytes matures	5
1.3- La thrombocytopoïèse.....	7
2- La régulation de la mégacaryocytopoïèse	8
2.1- Régulation positive	8
2.1.1- La TPO.....	8
2.1.2- Les autres cytokines	9
2.1.3- Les facteurs de transcription	9
2.2- Régulation négative	9
2.3- L'auto-régulation	10
II) Thrombopénie	11
1- Les principales étiologies d'une thrombopénie	11
1.1- Thrombopénie artéfactuelle	11
1.2- Thrombopénies constitutionnelles	12
1.2.1- Le syndrome MYH9	13
1.3- Thrombopénies centrales	14
1.4- Thrombopénies périphériques.....	15
1.4.1- Séquestration splénique des plaquettes	15
1.4.2- Destruction périphérique immunologique	15
1.4.2.1- Les thrombopénies immunoallergiques	15
1.4.2.2- Les thrombopénies allo-immunes	17
1.4.2.3- Les thrombopénies auto-immunes secondaires	17
1.4.2.4- Le purpura thrombopénique immunologique (PTI).....	18
1.4.3- Consommation excessive des plaquettes	20
1.4.3.1- MAT.....	20
1.4.3.2- CIVD.....	21
2 - Exploration biologique d'une thrombopénie	21
2.1- La numération plaquettaire au laboratoire d'hématologie.....	21
2.1.1 Méthode par impédance	21
2.1.2 Frottis sanguin	23
2.1.3 Méthode optique.....	23
2.1.4 Numération en chambre de comptage	25
2.1.5 Méthode par cytométrie de flux	26
2.2- Les urgences diagnostiques.....	27
2.3- Recherche d'une étiologie périphérique	28
2.4- Le myélogramme	29
2.5- Recherche d'Ac antiplaquettaires	29
III) La Fraction des plaquettes immatures (IPF) sur l'automate XE 5000, Sysmex	32
1- Historique des plaquettes réticulées	32
2- Principe de mesure de l'IPF.....	34
3- Intervalles de références de l'IPF	35
4- Stabilité	37

5- Reproductibilité.....	37
6- Intérêt clinique de l'IPF.....	37
6.1- IPF et thrombopénies périphériques	38
6.2- IPF et thrombopénies centrales	39
6.3- IPF et thrombopénie du VIH.....	40
6.4- IPF et pathologies diverses	40
Buts de l'étude.....	41
Matériels et méthodes	42
I) Valeurs normales de l'IPF.....	42
II) Stabilité de l'IPF	42
II) Groupes thrombopénies.....	42
III) Mesure de l'IPF	44
IV) Analyse statistique	45
Résultats	46
I) Valeurs normales de l'IPF.....	46
II) Stabilité de l'IPF	46
III) Définition des groupes thrombopéniques	47
1- Caractéristiques de la population analysée	47
1.1- Groupe des thrombopénies périphériques.....	47
1.2- Groupe des thrombopénies centrales	47
2- Les étiologies des thrombopénies	48
2.1- Groupe des thrombopénies périphériques.....	48
2.2- Groupe des thrombopénies centrales	49
3- Caractéristiques de l'hémogramme	50
3.1- Groupe des thrombopénies périphériques.....	50
3.2- Groupe des thrombopénies centrales	51
VI) Valeur de la numération plaquettaire et de l'IPF	52
1- Groupe contrôle	52
2- Groupe thrombopénies périphériques	52
3- Groupe thrombopénies centrales.....	53
V) Analyse comparative des numérations plaquettaires selon les groupes de patients.....	54
VI) Analyse comparative de l'IPF selon les groupes de patients	54
VIII) Analyse comparative des groupe de patients en fonction de la numération plaquettaire	56
IX) Valeurs optimales de l'IPF pour distinguer l'origine de la thrombopénie	58
IX) Groupe des thrombopénies constitutionnelles	60
Discussion	61
Conclusion	67
Bibliographie.....	68

Abréviations

Ac : Anticorps

ADN : Acide Désoxyribo-Nucléique

Ag : Antigène

AM : Aplasie médullaire

ARN : Acide ribonucléique

ARNm : Acide ribonucléique messenger

BFU : Burst Forming Unit

BFU-MK : Burst Forming Unit- Megacaryocyte

CFU : Colony Forming Unit

CFU-GEMM : Colony Forming Unit-Granulocyte Erythrocyte Monocyte Megacaryocyte

CFU-MK : Colony Forming Unit- Megacaryocyte

CIVD : Coagulation intra-vasculaire disséminée

CLCCHB : Centre de Lutte Contre le Cancer Henri Becquerel

CMP : Progéniteur commun myéloïde

CTAD : Citrate Théophylline Adénosine Dipyridamole

CV : Coefficient de variabilité

EDTA : Ethylène Diamine Tétra-Acétique

FS : Foward scatter

FT : Facteur de transcription

GM-CSF : Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor

Gp : Glycoprotéines

GR : Globules rouges

HAS : Haute Autorité de Santé

HGE : Hépto-Gastro-Entérologie

HOP : Hémato-Oncologie Pédiatrique

HPA : Human Platelet Antigen

HPN : Hémoglobinurie Paroxystique Nocturne

IL-3 : Interleukine-3

IPF : Fraction des Plaquettes Immatures

LA : Leucémie aiguë

MAI : Maladie auto-immune

MAIPA : Monoclonal Antibody Immobilization of Platelet Antigens

MAT : Microangiopathie Thrombotique
MEP : progéniteur commun érythro-mégacaryocytaire
NFS : Numération formule sanguine
PE : Phyco-érythrine
PF4 : Facteur plaquettaire 4
PDGF : Platelet-derived growth factor
PNN : Polynucléaires neutrophiles
PTI : Purpura thrombopénique immunologique
PTT : Purpura thrombotique thrombocytopénique
SAM : Syndrome d'Activation Macrophagique
SCF : Stem Cell Factor
SHU : Syndrome hémolytique et urémique
TC : Thrombopénie Centrale
TGF- β : Transforming Growth Factor β
TIH : Thrombopénie induite par l'héparine
TP : Thrombopénie Périphérique
TPO : Thrombopoïétine
VIH : Virus de l'immunodéficience humaine
VHB : Virus de l'hépatite B
VHC : Virus de l'hépatite C
vWF : Facteur vonWillebrand

Tableaux

Tableau n°1 : Thrombopénies constitutionnelles : classification en fonction de la taille des plaquettes.

Tableau n°2 : Principaux médicaments pouvant être responsables d'une thrombopénie périphérique.

Tableau n°3 : Examens complémentaires à demander devant un PTI.

Tableau n°4 : Valeurs de référence de l'IPF (en %) dans les populations de sujets témoins de la littérature.

Tableau n°5 : Valeurs de la numération plaquettaire et de l'IPF à H0, H8, H24 de la réception du prélèvement au laboratoire.

Tableau n°6 : Caractéristiques de la population de l'étude.

Tableau n°7 : Valeurs de la numération plaquettaire et de l'IPF dans les groupes contrôle, thrombopénies centrales et thrombopénies périphériques.

Figures

Figure n°1 : La différenciation et la maturation des mégacaryocytes.

Figure n°2 : Photographies de frottis de myélogramme en microscopie optique représentant les mégacaryocytes à différents stades de maturation.

Figure n°3 : La production des plaquettes par les mégacaryocytes.

Figure n°4 : Photographie d'un frottis sanguin en microscopie optique représentant des amas plaquettaires.

Figure n°5 : Photographie d'un frottis sanguin en microscopie optique montrant à gauche un pseudo-corps de Döhle dans le cytoplasme d'un polynucléaire neutrophile, à droite une plaquette géante ayant une taille plus grande que les hématies.

Figure n°6 : Photographie d'une carte de gel du test ID-PaGIA Test d'héparine/d'anticorps PF4 (Biorad).

Figure n°7 : Physiopathologie de la destruction périphérique des plaquettes dans le PTI.

Figure n°8 : Numération des plaquettes par impédance.

Figure n°9 : Graphique représentant le canal RET sur le XE-2100.

Figure n°10 : A- Photographie du kit "Thrombo-TIC" (Bioanalytic, Allemagne) utilisé pour effectuer les numérations plaquettaires en chambre de comptage. B- Photographie de plaquettes en chambre de comptage en microscopie optique à contraste de phase.

Figure n°11 : Graphique représentant les cellules marquées par le CD41 en fonction de leur taille (Foward Scatter) sur l'automate Navios.

Figure n°12 : Conduite à tenir au laboratoire devant une thrombopénie.

Figure n°13 : Principe du test MAIPA.

Figure n°14 : Photographie d'un frottis sanguin en microscopie optique représentant des réticulocytes colorés au bleu de crésyl.

Figure n°15 : Graphique représentant le canal RET sur le XE 2100.

Figure n°16 : Schéma descriptif de l'étude

Figure n°17 : Répartition des patients selon l'étiologie de la thrombopénie périphérique.

Figure n°18 : Répartition des patients selon les étiologies de la thrombopénie centrale.

Figure n°19 : Répartition des patients du groupe des thrombopénies périphériques selon les cytopénies retrouvées à l'hémogramme.

Figure n°20 : Répartition des patients du groupe des thrombopénies centrales selon les cytopénies retrouvées à l'hémogramme.

Figure n°21 : Box plot représentant l'IPF dans les groupes contrôles, thrombopénies centrales et thrombopénies périphériques.

Figure n°22 : Box plot représentant l'IPF des sous-groupes des carences vitaminiques et des autres étiologies centrales et du groupe thrombopénies périphériques.

Figure n°23 : Box plot représentant l'IPF des sous-groupes du PTI et des autres étiologies périphériques et du groupe thrombopénies centrales.

Figure n°24 : Box plot représentant l'IPF dans les groupes des thrombopénies centrales et périphériques et du sous-groupe PTI lorsque la numération plaquettaire est inférieure à 50G/l.

Figure n°25 : Box plot représentant l'IPF dans les groupes des thrombopénies centrales et périphériques lorsque la numération plaquettaire est supérieure à 50G/l.

Figure n°26 : Courbe ROC de sensibilité et spécificité permettant de distinguer une thrombopénie d'origine périphérique, d'une thrombopénie d'origine centrale.

Figure n°27 : Courbe ROC de sensibilité et spécificité pour distinguer le PTI des autres thrombopénies (thrombopénies centrales et autres étiologies des thrombopénies périphériques).

Figure n°28 : Représentation de la variation des réticulocytes en fonction de l'origine de l'anémie (A) et de l'IPF en fonction de l'origine de la thrombopénie (B).

Introduction

L'automatisation des examens de routine en biologie médicale et notamment la numération formule sanguine (NFS) en hématologie a permis d'obtenir des résultats plus rapides et d'une grande fiabilité améliorant la qualité des résultats rendus. En effet, l'accroissement du nombre de demandes et de paramètres analysés, ainsi que la démarche d'accréditation des laboratoires de biologie médicale ont favorisé le développement d'automates de plus en plus performants.

C'est ainsi que de nouveaux paramètres appelés "paramètres recherches" ont été développés par les constructeurs et sont déjà disponibles sur ces automates. Cependant, pour l'instant, ils ne sont pas encore utilisés en routine mais relèvent plutôt du domaine de la recherche. Concernant les globules rouges, il s'agit notamment des indices d'hypochromie (Hypo-He) et de microcytose (microR) des érythrocytes qui permettraient de dépister la sphérocytose héréditaire (1). S'agissant des globules blancs, les paramètres NEUT-X et NEUT-Y renseignent sur l'activation des polynucléaires neutrophiles (PNN) en quantifiant leur granularité et le contenu en ADN et ARN de leur noyau. Ils pourraient ainsi aider à prédire l'activation des PNN secondaire à une infection ou une dysplasie des PNN orientant vers le diagnostic de syndrome myélodysplasique (2)(3). Quant aux plaquettes, il s'agit de l'IPF (*Immature platelet fraction*) correspondant à la fraction des plaquettes immatures. Ce paramètre permet de quantifier les plaquettes néoformées, également appelées plaquettes réticulées, qui correspondent à l'équivalent pour les plaquettes, des réticulocytes pour les globules rouges.

Les plaquettes jouent un rôle essentiel dans l'hémostase primaire. Elles permettent la formation d'un clou plaquettaire indispensable pour l'arrêt des saignements. Pour ce faire, l'organisme produit, à partir des précurseurs plaquettaires médullaires, les mégacaryocytes, environ 10^{11} plaquettes par jour, qui sont libérées dans la circulation sanguine, afin de maintenir un taux de base entre 150 et 400 000 par mm^3 de sang (4).

La thrombopénie se définit par un taux de plaquettes inférieur à 150 000 par mm^3 de sang. Lorsque ce taux est inférieur à 20 000 par mm^3 , il s'agit d'une urgence vitale en raison du risque hémorragique associé. Le diagnostic étiologique d'une thrombopénie est parfois difficile, les étiologies pouvant être multiples. L'origine de la thrombopénie peut être centrale, par insuffisance de production, ou périphérique, par consommation, destruction ou séquestration des plaquettes. Son origine peut également être mixte.

L'examen de choix utilisé pour différencier l'origine de la thrombopénie est le myélogramme. Cependant il s'agit d'un geste invasif voire douloureux pour certains patients, et dont l'interprétation est étroitement liée à la qualité du prélèvement.

Afin de prédire la régénération plaquettaire, de nombreuses techniques ont été étudiées, notamment la mesure isotopique de la durée de vie des plaquettes ou la mesure de la glycalicin (fragment de la glycoprotéine Ib de la membrane plaquettaire). Cependant leurs utilisations étaient limitées à la recherche et n'ont pu être appliquées en routine. En 1969, Ingram et Coopersmith ont découvert l'existence des plaquettes réticulées (5). Néanmoins, le dosage de ces plaquettes réticulées qui était effectué par cytométrie de flux ne permettait pas d'obtenir des valeurs fiables et reproductibles. Depuis plusieurs années, les nouvelles générations d'automates d'hématologie cytologique sont capables de mesurer de façon standardisée les plaquettes réticulées. Ce taux de plaquettes réticulées pourrait, par analogie avec les réticulocytes, permettre de prédire la régénération plaquettaire au cours d'une thrombopénie et donc l'origine de la thrombopénie.

I) Rappel sur la mégacaryocytopoïèse

La production de toutes les cellules sanguines et notamment des plaquettes dans la moelle osseuse résulte d'un processus de différenciation cellulaire dont le point de départ est la cellule souche pluripotente. Cette production est régulée de façon complexe pour obtenir un équilibre entre stimulation et inhibition de l'hématopoïèse.

1- Les étapes de développement et de maturation

Sous l'influence de facteurs stimulants, la cellule souche hématopoïétique va s'engager dans des étapes de différenciation afin d'aboutir au stade de progéniteurs.

1.1- Les progéniteurs mégacaryocytaires

La cellule souche hématopoïétique s'engage sous l'action de facteurs de croissance vers la lignée lymphoïde ou myéloïde. Le progéniteur commun myéloïde (CMP) précoce, appelé CFU-GEMM (*Colony Forming Unit – Granulocyte Erythrocyte Monocyte Megacaryocyte*) est à l'origine de toutes les cellules myéloïdes. Ce CMP va se différencier en un progéniteur commun bipotent érythroïdo-mégacaryocytaire (MEP) sous l'influence de facteurs de transcription (FT). Le principal FT impliqué dans cette différenciation est GATA-1. Il oriente le MEP vers la lignée mégacaryocytaire donnant naissance aux progéniteurs précoces BFU-MK (*Burst forming unit-Megacaryocyte*) puis aux progéniteurs tardifs CFU-MK (3-5).

Ces progéniteurs CFU-MK aboutissent à la formation des premières cellules morphologiquement identifiables, les précurseurs mégacaryocytaires.

1.2- Les précurseurs mégacaryocytaires

Les précurseurs mégacaryocytaires perdent leur capacité de division mais ils deviennent aptes à la réplication de l'ADN et à la maturation cytoplasmique.

1.2.1- Les précurseurs immatures

La prolifération des CFU-MK cesse, donnant naissance à une cellule transitionnelle, le promégacaryoblaste, qui n'est pas encore reconnaissable morphologiquement.

Leur identification est alors facilitée grâce à l'apparition des principales glycoprotéines (Gp) telles que la GpIIb/IIIa (CD41), la GpIb (CD42) de même que le facteur von Willebrand (vWF), le facteur plaquettaire 4 (PF4) et les granules α (6)(7).

Le promégacaryoblaste se différencie en mégacaryoblaste, première cellule identifiable morphologiquement.

Par la suite, cette cellule va subir une phase d'amplification qui se fera par une voie singulière de la lignée mégacaryocytaire : l'endomitose. Celle-ci correspond à une réplication de l'ADN nucléaire qui n'est pas suivie de division cytoplasmique. Ceci entraîne alors une augmentation de la taille du cytoplasme de la cellule avec un noyau polylobé aboutissant à des cellules polyploïdes géantes. Ce phénomène commence au stade de promégacaryoblaste mais se produit essentiellement à celui de mégacaryoblaste. Les mégacaryoblastes subissent une succession d'endomitoses conduisant à une polypléidisation du noyau d'une teneur en ADN équivalente à 2, 4, 8, 16, 32 ou même 64 fois celle des cellules haploïdes (figure n°1) (5)(8).

Ils deviennent alors morphologiquement identifiables du fait de leur différenciation. Au fil des endomitoses, la chromatine nucléaire se condense progressivement et la taille du noyau augmente avec un rapport nucléocytoplasmique qui reste élevé avec un cytoplasme basophile, caractéristique des cellules immatures. Ce phénomène régule indirectement le nombre de plaquettes.

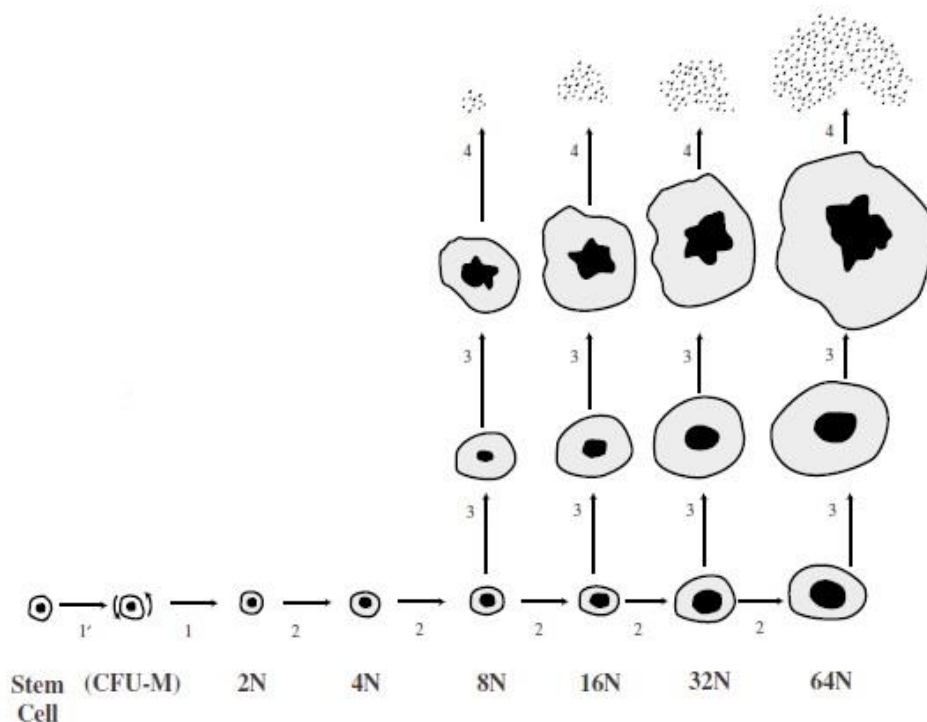


Figure n°1 : La différenciation et la maturation des mégacaryocytes d'après Kuter *et al.*, The Oncologist, 1996 (11).

1'- La cellule souche s'engage dans la différenciation mégacaryocytaire. 1- Les progéniteurs mégacaryocytaires (CFU-M) se différencient en précurseurs mégacaryocytaires. 2- Ces précurseurs subissent une succession d'endomitoses. 3- Les endomitoses laissent place à la différenciation cellulaire : la maturation cytoplasmique et la segmentation nucléaire des mégacaryocytes. 4- La libération des plaquettes.

1.2.2- Les mégacaryocytes matures

Selon les besoins de l'organisme en plaquettes, les endomitoses s'arrêtent, laissant place à la différenciation cellulaire. C'est alors que commencent la segmentation du noyau ainsi que la croissance et la maturation cytoplasmique (figure n°1). Ce processus dure environ 8 jours pendant lesquels deux structures cytoplasmiques se développent : le système de membranes de démarcation et les granules sécrétoires (7).

La membrane plasmique du mégacaryocyte s'invagine et se développe pour créer un réseau complexe de membranes appelées membranes de démarcation qui donneront naissance aux membranes plasmiques des futures plaquettes.

Le mégacaryocyte contient trois types de granules sécrétoires : les granules alpha les plus nombreuses et les plus volumineuses, qui contiennent un grand nombre de facteur de croissance, de protéines adhésives, de facteurs de la coagulation, d'immunoglobulines; les

granules denses qui contiennent des nucléotides et des catécholamines vaso-actives, et enfin les lysosomes qui contiennent des phosphatases et hydrolases acides et la cathepsine D ; ces derniers ont pour fonction la dégradation protéique (4)(5).

Ainsi le mégacaryoblaste se différencie en mégacaryocyte basophile ; à ce stade, la ploïdie est maximale et la synthèse d'ADN cesse. La taille du cytoplasme augmente et il devient basophile, quelques granulations azurophiles apparaissent. Puis, le mégacaryocyte devient alors granuleux, de taille augmentée avec un noyau volumineux et son cytoplasme est acidophile. Enfin, celui-ci se différencie en mégacaryocyte mature thrombocyto-gène ; débute alors la formation des plaquettes (figure n°2) (6).

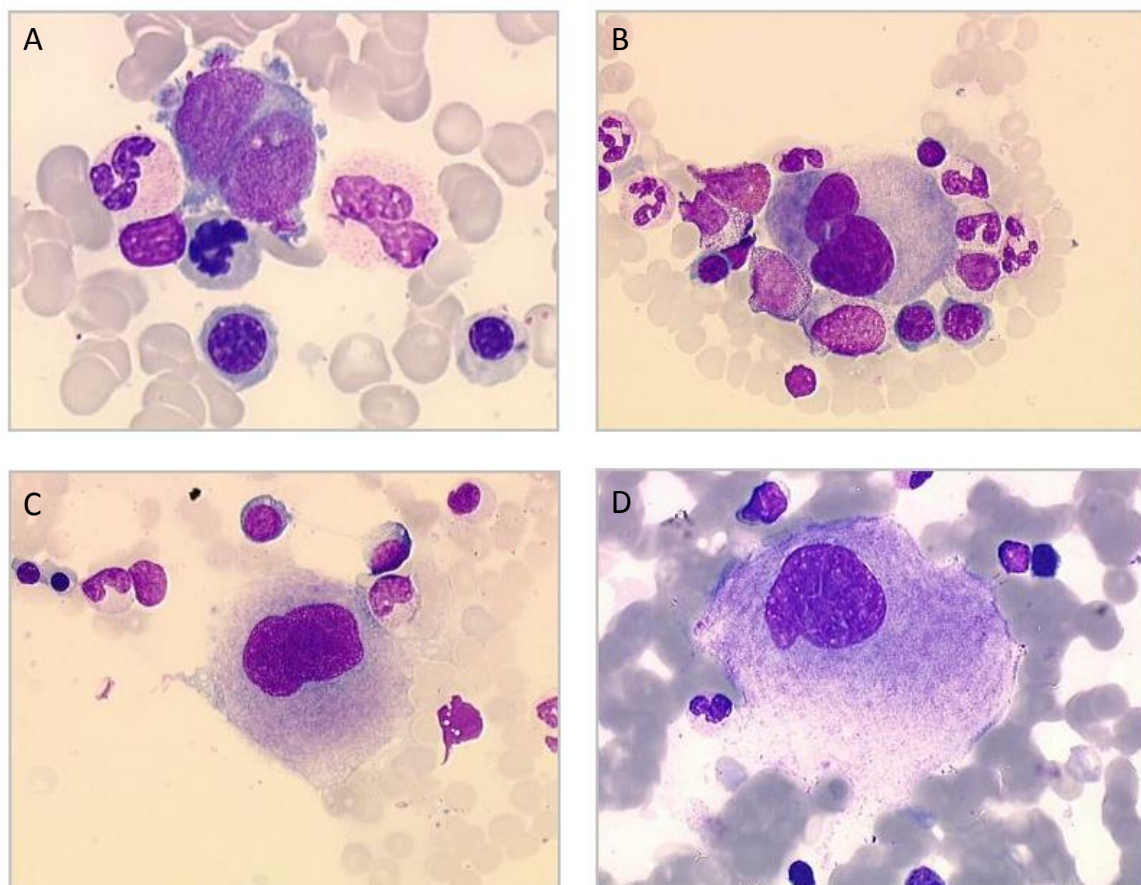


Figure n°2 : Photographies de frottis de myélogramme en microscopie optique représentant les mégacaryocytes à différents stades de maturation, d'après Zandecki sur hematocell.univ-angers.fr (12).

2A- Mégacaryoblaste : rapport nucléo-cytoplasmique élevé, noyau rond, chromatine fine, cytoplasme très basophile sans granulations. 2B- Mégacaryocyte basophile : grandes cellules, le noyau commence à se lobuler, la taille du cytoplasme augmente, quelques granulations apparaissent. 2C- Mégacaryocyte granuleux : le noyau est multilobé, la chromatine plus dense, le cytoplasme perd sa basophilie, devenant acidophile et riche en granulations. 2D- Mégacaryocyte mature : le noyau est multilobé, dense et le cytoplasme a une teinte qui évoque celle des plaquettes.

1.3- La thrombocytopoïèse

La thrombocytopoïèse correspond à la formation et à la libération des plaquettes. Il s'agit de fragments cellulaires anucléés provenant de la segmentation du cytoplasme des mégacaryocytes.

Cependant le mécanisme de formation et de libération des plaquettes est mal connu. La formation des plaquettes débute au sein des mégacaryocytes matures thrombocytogènes, dans lesquels les granules se regroupent et le système de membranes de démarcation se met en place. Il se forme de fins prolongements cytoplasmiques à type de pseudopodes qui sont appelés proplaquettes. La fragmentation des proplaquettes donnera les plaquettes (figure n°3) (8).

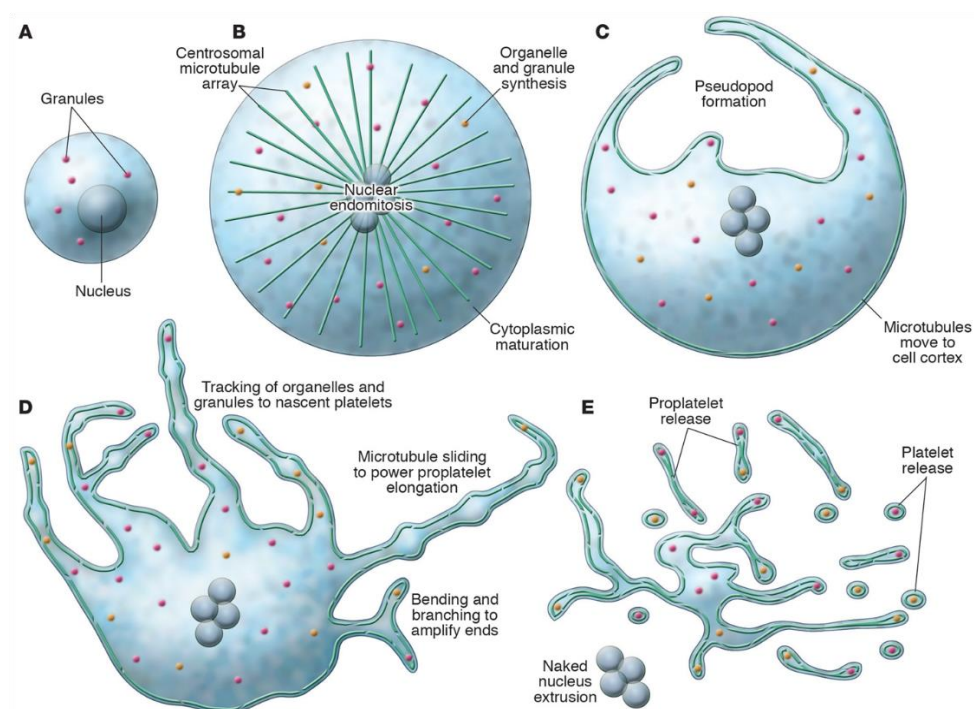


Figure n°3 : La production des plaquettes par les mégacaryocytes d'après Patel *et al.*, Journal of Clinical Investigation, 2005 (8).

3A- Le mégacaryocyte immature subit les endomitoses, la maturation de son cytoplasme, la segmentation de son noyau, le développement de membranes de démarcation et des granules. 3B- Ce mégacaryocyte devient alors mature et thrombocytogène. 3C- La formation de pseudopodes débute. 3D- Aboutissant à la formation de proplaquettes. 3E- Leur fragmentation permet la libération des plaquettes.

Le mécanisme et le lieu de fragmentation des proplaquettes n'est pas certain. Il existe deux théories possibles. L'une énonce que les proplaquettes vont se fragmenter sous l'action des forces de cisaillement pour libérer les plaquettes dans la lumière des sinus de la moelle osseuse (8). L'autre propose que les mégacaryocytes peuvent également passer dans la circulation

sanguine, la libération des plaquettes se faisant alors par extravasation à travers l'endothélium pulmonaire (13).

2- La régulation de la mégacaryocytopoïèse

Les plaquettes ont un rôle crucial dans de nombreux mécanismes physiologiques et notamment dans l'hémostase primaire. Ainsi il est indispensable de maintenir un taux constant de plaquettes. C'est pourquoi la mégacaryocytopoïèse est régulée de manière positive et négative par de nombreux facteurs de transcription et des cytokines.

2.1- Régulation positive

La régulation positive de la mégacaryocytopoïèse se fait principalement par les cytokines, dont la plus importante est la thrombopoïétine (TPO).

2.1.1- La TPO

Cette glycoprotéine est synthétisée principalement au niveau du foie mais également dans le rein et dans la moelle osseuse. Elle a été découverte en 1994, dans le même temps que son récepteur c-Mpl (14). Le principal régulateur de la production de TPO est la masse mégacaryocytaire reflétée par la production plaquettaire.

La TPO stimule la croissance des progéniteurs primitifs multipotents avec l'action combinée du Stem Cell Factor (SCF). Elle favorise la croissance et la maturation des progéniteurs de la lignée mégacaryocytaire.

La TPO est capable d'induire la maturation complète des mégacaryocytes en stimulant la ploïdisation, l'augmentation de la taille des cellules, l'expression des Gp membranaires, la formation des granules et du système de membranes de démarcation et la fragmentation des proplaquettes en plaquettes (6)(7).

2.1.2- Les autres cytokines

La TPO agit en synergie avec d'autres cytokines pour favoriser la mégacaryocytopoïèse, notamment : l'interleukine 3 (IL3) et le SCF qui agissent sur les étapes précoces de la mégacaryocytopoïèse en favorisant la croissance des progéniteurs mégacaryocytaires. De même que l'IL-6 et l'IL-11 qui stimulent la polyploïdisation et la maturation des mégacaryocytes, l'érythropoïétine, le *Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor* (GM-CSF) et le SCF favorisent également la maturation mégacaryocytaire (3)(4).

2.1.3- Les facteurs de transcription

La mégacaryocytopoïèse est également régulée par différents facteurs de transcription qui interviennent lors des différentes étapes de la différenciation mégacaryocytaire.

Au premier rang, on retrouve le facteur de transcription GATA-1 et son cofacteur FOG-1 qui sont impliqués dans l'engagement mégacaryocytaire du progéniteur commun bipotent érythro-mégacaryocytaire (BFU-E/MK). Le facteur FLI-1 est impliqué dans la maturation cytoplasmique des progéniteurs. Le facteur NF-E2 quant à lui est impliqué dans les dernières étapes de la maturation lors de la production des proplaquettes et la libération des plaquettes (4)(5).

2.2- Régulation négative

Certains facteurs de croissance sont à l'origine d'une régulation négative de la mégacaryocytopoïèse, il s'agit principalement de produits de libération plaquettaire tels que le PDGF (*platelet-derived growth factor*), le PF4, le TGF β (*Transforming Growth Factor β*) qui inhibent la prolifération et la maturation des progéniteurs mégacaryocytaires. La particularité du TGF β est d'inhiber également les endomitoses et la maturation cytoplasmique (6).

2.3- L'auto-régulation

Le principal mécanisme d'autorégulation dépend de la masse plaquettaire. Ainsi la quantité de TPO circulant dans le sérum est directement contrôlée par la masse plaquettaire : lorsque les plaquettes circulent en nombre important la TPO se fixe sur son récepteur c-mpl exprimé par les mégacaryocytes et les plaquettes. Celle-ci est alors endocytée, le taux de TPO circulant diminue, limitant ainsi la stimulation des mégacaryocytes et donc la production de plaquettes. A l'inverse lors d'une thrombopénie, le taux de TPO augmente puisqu'elle ne se lie pas suffisamment à son récepteur, stimulant la production de plaquettes.

Lors d'une diminution du pool de plaquettes, le taux de thrombopoïétine augmente de 50% en 8 heures et atteint son pic maximal en 24 heures (11)(12).

Enfin le microenvironnement médullaire influence la mégacaryocytopoïèse : les cellules stromales (fibroblastes, cellules endothéliales,...) sécrètent des cytokines et présentent des molécules d'adhésion qui peuvent réguler la mégacaryocytopoïèse de façon positive ou négative.

II) Thrombopénie

Une thrombopénie correspond à une diminution du nombre de plaquettes sanguines inférieur à $150.000/\text{mm}^3$, quelque soit l'âge du patient. Cette anomalie peut être révélée par un tableau de syndrome hémorragique cutanéomuqueux ou de façon fortuite lors d'un bilan sanguin systématique. Il existe divers mécanismes pouvant expliquer cette thrombopénie. Ces mécanismes peuvent être classés en fonction de l'origine de la thrombopénie. Lorsque la thrombopénie est d'origine centrale, il s'agit d'une insuffisance de production des plaquettes, le nombre de mégacaryocytes dans la moelle osseuse est alors diminué ou absent. Les thrombopénies d'origine périphérique peuvent être dues à différents mécanismes : la destruction, la consommation ou la séquestration des plaquettes. Le nombre de mégacaryocytes dans la moelle osseuse est alors normal ou augmenté. Enfin lorsque ces 2 mécanismes sont concomitants, la thrombopénie a alors une origine mixte.

Il existe une multitude de causes de thrombopénie.

1-Les principales étiologies d'une thrombopénie

1.1- Thrombopénie artéfactuelle

Les prélèvements veineux de NFS sont effectués sur des tubes contenant un anticoagulant : l'Éthylène Diamine Tétra-Acétique (EDTA). Cet anticoagulant peut être à l'origine d'un phénomène d'agglutination des plaquettes, diminuant ainsi le chiffre de plaquettes rendu par l'automate. Ces amas plaquettaires sont recherchés lors de l'examen du frottis sanguin (figure n°4). On parle alors de fausse thrombopénie sur EDTA. L'utilisation de tubes contenant un autre anticoagulant, le citrate, permet le plus souvent de rectifier ce problème. Si l'agrégation des plaquettes persiste, un tube contenant du citrate, de la théophylline, de l'adénosine et du dipyridamole (tube CTAD) sera alors utilisé. Parfois le phénomène d'agrégation subsiste, un prélèvement sanguin capillaire devra alors être réalisé.

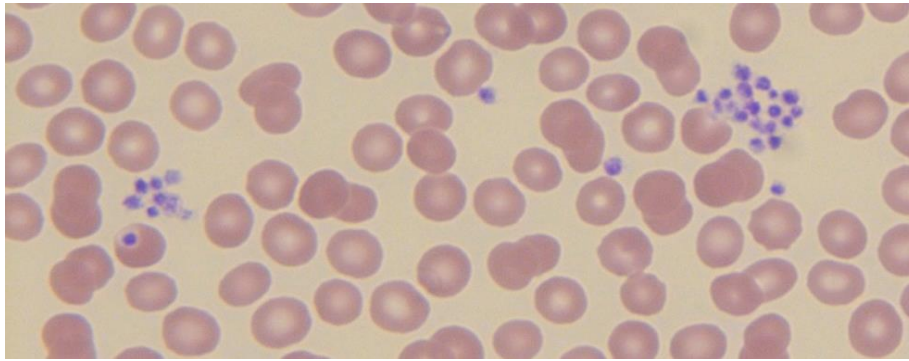


Figure n° 4 : Photographie d'un frottis sanguin en microscopie optique représentant des amas plaquettaires. Photographie prise au Laboratoire d'Hématologie du CHU de Rouen.

1.2- Thrombopénies constitutionnelles

Les thrombopénies constitutionnelles peuvent être des thrombopénies isolées ou des aplasies médullaires primitives (maladie de Fanconi, syndrome de Schwachman,...). Les syndromes peuvent être classés selon la taille des plaquettes. Il existe de nombreuses pathologies décrites (tableau n°1).

Tableau n°1 : Thrombopénies constitutionnelles : classification en fonction de la taille des plaquettes d'après Leverger *et al*, Archives de Pédiatrie, 2010 (17).

Microcytaire	Syndrome de Wiskott-Aldrich
	Thrombopénie liée à l'X
Normocytaire	Thrombopénie avec absence de radius (TAR)
	Syndrome oculo-oto-radial ou IVIC syndrome
	Amégacaryocytose avec synostose radio cubitale
	Amégacaryocytose congénitale
	Thrombopénie familiale liée au chromosome 10
	Thrombopénie familiale et prédisposition LAM
	Thrombopénie Québec
Macrocytaire	Thrombopénie Paris-Trousseau
	Syndrome de DiGeorge ou Syndrome de délétion 22q11.2
	Syndrome MYH9
	Thrombopénie méditerranéenne
	Thrombopénie liée à l'X avec dysérythropoïèse
	Syndrome de Bernard Soulier
	Pseudo Willebrand plaquettaire
Syndrome des plaquettes grises	

1.2.1- Le syndrome MYH9

Il s'agit d'un syndrome relativement rare pour lequel le cytologiste a un rôle important de dépistage diagnostic. Ce syndrome est constitué d'un groupe de plusieurs entités clinico-biologiques liées à une mutation du gène MYH9 (chromosome 22q12-13) qui code pour la chaîne lourde de la myosine non musculaire de type IIA (NMMHC-IIA) (18). On retrouve dans ce groupe les syndromes de May Heggling, de Sebastian, d'Epstein, de Fechtner et d'Alport-like. Ce sont des maladies à transmission autosomale dominante qui s'expriment à l'état hétérozygote (18)(19).

Elles associent de façon constante une macrothrombocytopenie et de façon variable des pseudocorps de Döhle, une surdité, une atteinte rénale ou une cataracte. Les numérations plaquettaires du syndrome MYH9 varient le plus souvent de 30 à 100 G/l et ne sont que très rarement associées à des manifestations hémorragiques graves avec au contraire une hyperagr gabilit  de ces plaquettes (19).

La myosine IIA est essentielle dans les fonctions contractiles et sécrétoires de la plaquette, elle participe au cytosquelette du mégacaryocyte et de la plaquette et joue un rôle dans la constitution des plaquettes à partir des pseudopodes du mégacaryocyte. Cependant le mécanisme précis de la macrocytose plaquettaire n'est pas clairement expliqué (20). De plus les mutations de MYH9 entraînent une dimérisation anormale de la myosine, qui devient alors instable et précipite dans le cytoplasme des PNN formant ainsi des inclusions basophiles : les pseudocorps de D hle (19).

Au laboratoire d'hématologie, lors de la présence d'une thrombopénie associée à un volume plaquettaire moyen augmenté et un histogramme du volume plaquettaire anormal ou lors d'une suspicion de syndrome MYH9 clinique, une étude minutieuse du frottis sanguin doit être effectuée afin de conforter le diagnostic. Sur le frottis sanguin, la présence de macroplaquettes et de plaquettes géantes ainsi que la mise en évidence des pseudocorps de D hle conforteront le diagnostic (figure n 5). Cependant, les pseudo-corps de D hle peuvent passer inaperçus, une analyse par immunofluorescence de la myosine intraleucocytaire et plaquettaire pourra alors être faite. La confirmation du diagnostic se fera par la biologie moléculaire par s quenc ge du gène MYH9 à la recherche de mutations (plus de 30 mutations identifiées sur les 40 exons du gène MYH9) (21).

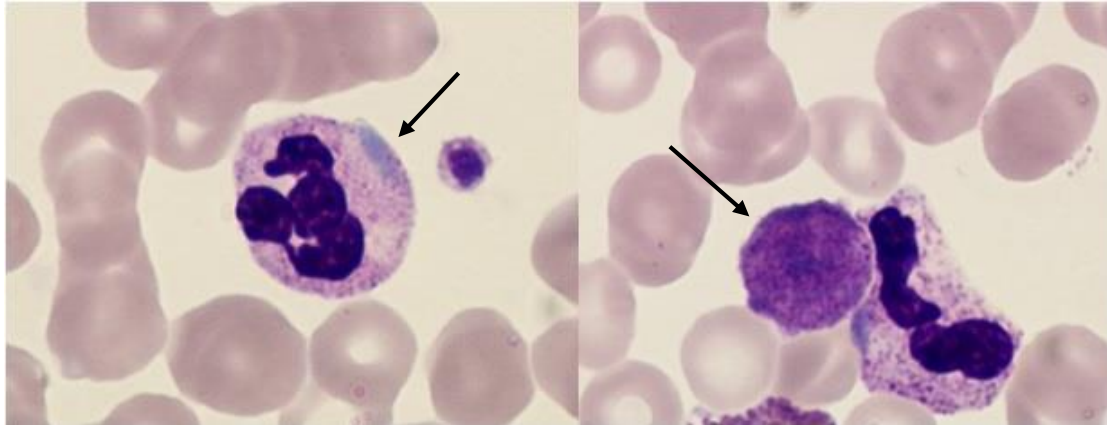


Figure n° 5 : Photographie d'un frottis sanguin en microscopie optique montrant à gauche un pseudo-corps de Döhle dans le cytoplasme d'un polynucléaire neutrophile, à droite une plaquette géante ayant une taille plus grande que les hématies. Photographie prise au Laboratoire d'Hématologie du CHU de Rouen.

1.3- Thrombopénies centrales

Elles peuvent être secondaires à de nombreuses étiologies, le plus souvent à l'origine de bicytopénies ou pancytopénies plutôt que de thrombopénie isolée, telles que :

- L'aplasie médullaire qui est le plus souvent idiopathique mais peut également être en lien avec la prise d'un médicament, la consommation d'alcool, l'exposition à des toxiques ou à un agent infectieux, un clone d'hémoglobinurie paroxystique nocturne (HPN) ou qui peut être constitutionnelle (anémie de Fanconi, syndrome de Shwachman-Diamond,...).
- L'envahissement médullaire par des cellules de métastases de tumeurs solides ou par une hémopathie qui est responsable d'une insuffisance médullaire entraînant les cytopénies.
- Les carences vitaminiques évoluées qui peuvent entraîner une mégalo-blastose des cellules médullaires avec des signes de dysplasie qui sera à l'origine d'une pancytopénie. Une carence aiguë en folates peut survenir après une infection sévère, une alimentation parentérale exclusive prolongée, une insuffisance rénale aiguë dialysée. La thrombopénie sera alors le premier retentissement périphérique de cette carence.
- Le Syndrome d'Activation Macrophagique (SAM) qui est une stimulation inappropriée des cellules macrophagiques dans la moelle osseuse et le système lymphoïde entraînant une phagocytose anormale des éléments figurés du sang et la libération de cytokines pro-inflammatoires. Les signes cliniques sont peu spécifiques, ce sont les éléments biologiques qui sont évocateurs de ce syndrome : une bicytopénie ou pancytopénie associée à une augmentation des LDH, de la ferritine et des triglycérides, un bilan hépatique perturbé et une coagulopathie. Le diagnostic est confirmé par la présence d'image d'hémophagocytose sur le

myélogramme. Ce syndrome peut être primaire principalement chez l'enfant (lymphohistiocytose familiale, syndrome de Griscelli,...) ou secondaire à une infection, une hémopathie notamment un syndrome lymphoprolifératif ou une maladie auto-immune (MAI) (22).

- Enfin la myélodysplasie qui entraîne une insuffisance médullaire qualitative responsable des cytopénies.

1.4- Thrombopénies périphériques

1.4.1- Séquestration splénique des plaquettes

Il existe de nombreuses causes d'hypersplénisme responsables de la séquestration des plaquettes au niveau de la rate dont la principale est l'hypertension portale de la cirrhose. Cependant indépendamment de la cause, toute splénomégalie entraîne une augmentation de la séquestration des plaquettes à l'origine de la cytopénie; lorsque la splénomégalie est volumineuse, elle sera également responsable d'une hémodilution surestimant la thrombopénie.

1.4.2- Destruction périphérique immunologique

1.4.2.1- Les thrombopénies immunoallergiques

Ces thrombopénies sont liées à la prise d'un médicament par le patient. La plus connue est la thrombopénie induite par l'héparine (TIH). Elle a pour particularité de n'entraîner qu'exceptionnellement une symptomatologie hémorragique et à l'inverse, d'être plutôt responsable de manifestations thrombotiques en lien avec une activation de la coagulation. En effet, la TIH est un syndrome clinico-biologique résultant de l'activation des plaquettes en présence d'héparine par des anticorps, le plus souvent de type IgG, reconnaissant les complexes macromoléculaires formés par l'héparine et le PF4. Cette interaction conduit à une activation cellulaire mais contribue aussi à une élimination plus rapide des plaquettes sensibilisées par les anticorps via le système des phagocytes mononucléés. La thrombopénie survient typiquement entre le 5^{ème} et le 15^{ème} jour de traitement par l'héparine (plus précocement lors d'une exposition

antérieure à l'héparine) avec une numération plaquettaire inférieure à 100 G/l ou une chute des plaquettes d'au moins 40% par rapport à la valeur initiale avant traitement.

Une évaluation de la probabilité diagnostique est tout d'abord faite par le test des "4Ts" (Thrombopénie, Timing, Thromboses, autres causes de Thrombopénie). Si celle-ci est en faveur d'une TIH, deux tests diagnostiques rapides immunologiques permettent d'obtenir un résultat quantitatif dans l'heure qui suit le prélèvement : le test HIT PaGia® (Biorad) basé sur une immunofiltration sur gel (figure n°6) et le stick Expert HIT® (Stago), un test d'immunochromatographie sur membrane détectant spécifiquement les IgG anti PF4/héparine. La confirmation du diagnostic sera faite par deux types de tests : les tests fonctionnels permettant d'étudier l'agrégation des plaquettes en présence d'héparine et les tests immunoenzymatiques de type ELISA mettant en évidence les anticorps fixés sur les complexes PF4/héparines. Plus rarement, certaines équipes mesurent une libération de sérotonine radiomarquée dont l'intensité reflète le niveau d'activation plaquettaire. L'arrêt de l'héparine est obligatoire dès que le diagnostic est suspecté, un traitement antithrombotique substitutif est alors indispensable (le danaparoïde sodique ou l'hirudine) (23).



Figure n°6 : Photographie d'une carte de gel du test ID-PaGIA Test d'héparine/d'anticorps PF4 (Biorad). Photographie prise au Laboratoire d'Hématologie du CHU de Rouen. 4 puits sont négatifs (A), un puit est positif (B) et un puit est douteux (C).

De nombreux médicaments peuvent être à l'origine de thrombopénie notamment certains antibiotiques dont les pénicillines, les céphalosporines, le cotrimoxazole, la quinine ou la

rifampicine (tableau n°2). Le mécanisme immunologique à l'origine de la thrombopénie est variable et dépend du médicament en cause (24)(25).

Tableau n°2 : Principaux médicaments pouvant être responsables d'une thrombopénie périphérique d'après Marret et Ohana, 2006, Gestion d'une thrombopénie en anesthésie (26).

<u>Antalgiques</u> : Aspirine, anti-inflammatoire non stéroïdiens
<u>Anti-infectieux</u> : sulfaméthoxazole-triméthoprim, bêta-lactamines, sulfamides, rifampicine, quinolones, vancomycine
<u>Antidépresseurs et anxiolytiques</u> : diazépam, carbamates, acide valproïque, clonazépam
Quinines et quinidiques, digoxine, hydrochlorothiazide
<u>Antiulcéreux</u> : oméprazole, cimétidine
<u>Antidiabétiques</u> : Sulfamides
<u>Antiagrégants</u> : antagoniste de GpIIb-IIIa, ticlopidine
<u>Anticoagulants</u> : héparine non fractionnée, héparine de bas poids moléculaire
<u>Antirhumatismaux</u> : Sels d'or

1.4.2.2- Les thrombopénies allo-immunes

Il en existe deux types : la thrombopénie materno-fœtale ou néonatale et la thrombopénie post-transfusionnelle. La première est due à la destruction des plaquettes du fœtus ou du nouveau-né par les anticorps (Ac) maternels dirigés contre un alloantigène plaquettaire paternel, hérité par le fœtus et dont la mère est dépourvue. Concernant la deuxième, l'immunisation est dirigée contre les alloantigènes plaquettaires HPA (Human Platelet Antigen), le plus fréquemment HPA-1a et 5a/5b, ces allo-Ac sont apparus lors d'une transfusion ancienne ou à la suite de grossesses le plus souvent multiples (27).

1.4.2.3- Les thrombopénies auto-immunes secondaires

Les thrombopénies auto-immunes peuvent être secondaires à une MAI (lupus érythémateux disséminé, syndrome des anticorps anti-phospholipides,..), à une hémopathie lymphoïde chronique (leucémie lymphoïde chronique, lymphome,..) ou à un déficit immunitaire primitif (déficit immunitaire commun variable, microdélétion 22q11,...). Il peut s'agir également d'une étiologie virale; les principaux virus en cause sont le VIH, le VHC ou le VHB.

Si la thrombopénie auto-immune est associée à une anémie hémolytique auto-immune, on parle de syndrome d'Evans. Celui-ci peut être primitif ou secondaire; les causes sont alors les mêmes que celles des thrombopénies auto-immunes (24).

1.4.2.4- Le purpura thrombopénique immunologique (PTI)

Définition

Le PTI est une MAI plurifactorielle liée à une destruction importante de plaquettes d'origine immune et à une production médullaire inadaptée (28). Le diagnostic sera à évoquer devant un chiffre de plaquettes inférieur à $100\ 000/\text{mm}^3$ isolé, chez l'adulte comme chez l'enfant, après exclusion de tout autre cause. La présentation clinique est très variable, le patient peut être asymptomatique ou présenter une symptomatologie hémorragique diverse (purpura pétéchial, hématomes, hémorragies).

Un PTI est dit nouvellement diagnostiqué dans les 3 mois suivant le diagnostic, il est persistant entre 3 et 12 mois et il devient chronique après plus d'un an d'évolution. Le terme de PTI sévère est employé lors de la présence d'une symptomatologie hémorragique nécessitant la mise en place d'un traitement (29).

Physiopathologie du PTI

→ La destruction périphérique des plaquettes (30)(31)

L'un des principaux mécanismes de la destruction périphérique des plaquettes est la formation d'auto-anticorps (autoAc) dirigés contre les antigènes (Ag) exprimés par les plaquettes (figure n°7). Les principales cibles antigéniques sont les glycoprotéines membranaires des plaquettes et principalement la GpIIb/IIIa (récepteur du fibrinogène) mais également la GpIb/IX (récepteur du facteur von Willebrand) et la GpIa/IIa (récepteur du collagène).

La fixation des autoAc sur les plaquettes va favoriser leur phagocytose et leur destruction par les macrophages spléniques principalement mais également hépatiques et médullaires. Les macrophages possèdent des récepteurs à leur surface qui reconnaissent le fragment Fc des immunoglobulines favorisant la phagocytose des plaquettes recouvertes par les autoAc. Les peptides issus de la dégradation antigénique vont être présentés aux lymphocytes T, entraînant

leur activation. Cette activation aura pour conséquence un déséquilibre de la balance Th1-Th2 par diminution de la réponse Th2. Il existerait également un défaut d'apoptose avec une diminution de la molécule anti-apoptotique Bcl-2 et une augmentation de Bax, pro-apoptotique. Ces anomalies favoriseraient ainsi l'émergence de clones T autoréactifs qui participent à l'activation des lymphocytes B. Ces lymphocytes B vont proliférer et amplifier la production des auto-Ac anti-plaquettaires.

De plus, il semblerait qu'il existe un déficit quantitatif et fonctionnel des lymphocytes T régulateurs chez les patients atteints de PTI, avec pour conséquence une perte de la tolérance au soi entretenant ces phénomènes auto-immuns.

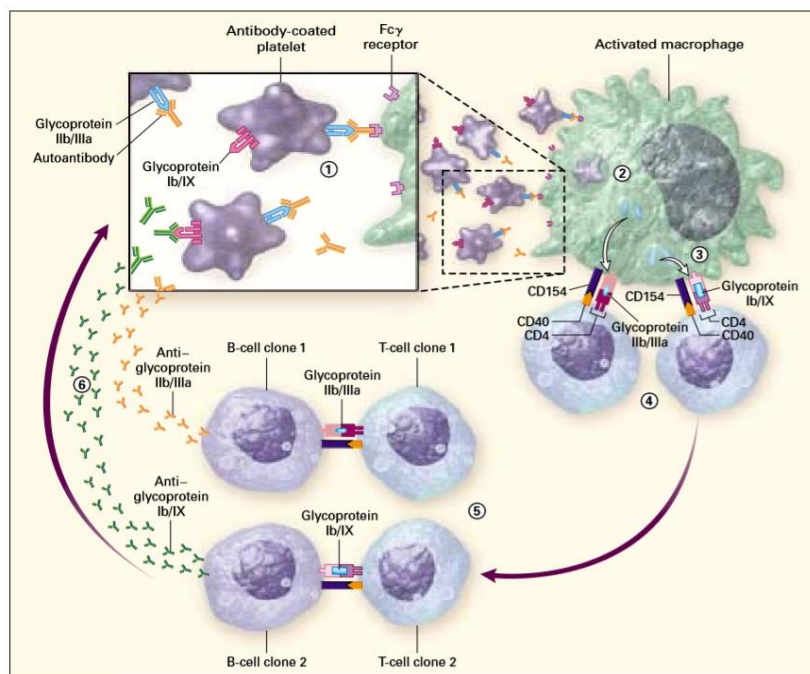


Figure n° 7 : Physiopathologie de la destruction périphérique des plaquettes dans le PTI, d'après Cines *et al*, The New England Journal of Medicine, 2002 (32). 1- Les auto-Ac se fixent aux glycoprotéines plaquettaires (Gp IIb/IIIa, Ib/IX). 2- Les plaquettes recouvertes d'auto-Ac sont reconnues par les macrophages via le fragment Fc, elles sont alors internalisées et dégradées. 3- Les peptides issus de la dégradation antigénique sont présentés aux lymphocytes T. 4- Les lymphocytes T sont activés via le système de co-stimulation, il s'agit de clones T auto-réactifs 5- Les clones T activent des lymphocytes B 6- Ces lymphocytes B vont amplifier la production d'Ac dirigés contre les Gp plaquettaires.

→ Le défaut de production médullaire (30)(31)

En effet, lors du PTI il existe une production de plaquettes inadaptée face à leur destruction périphérique. Comme les plaquettes, les mégacaryocytes expriment également à leur surface

les glycoprotéines membranaires Gp IIb/IIIa et GpIb/IX. Ils sont donc également la cible des autoAc, entraînant leur apoptose et donc une diminution des mégacaryocytes. De plus il a été montré que chez les patients atteints de PTI, les taux sériques de TPO sont anormalement bas comparativement à ceux des thrombopénies centrales car la masse plaquettaire produite est proche de la normale, il n'y a donc pas de stimulation médullaire (33).

1.4.3- Consommation excessive des plaquettes

Les deux principales causes de consommation excessive des plaquettes sont également deux urgences vitales qu'il faut systématiquement éliminer rapidement devant une thrombopénie. Il s'agit des microangiopathies thrombotiques (MAT) et de la coagulation intra-vasculaire disséminée (CIVD).

1.4.3.1- MAT

Une MAT se définit par l'association d'une anémie hémolytique mécanique et d'une thrombopénie avec des défaillances d'organes. Les deux principales formes de MAT sont le syndrome hémolytique et urémique (SHU) et le purpura thrombotique thrombocytopénique (PTT).

Le SHU est caractérisé par une atteinte rénale mais une atteinte extra-rénale est possible. Il peut s'associer à une gastroentérite à *Escherichia coli* O157:H7, producteur de shigatoxine, il s'agit alors d'un SHU typique touchant préférentiellement les enfants. Sinon le SHU sera dit atypique. Le PTT peut s'accompagner d'une atteinte multiviscérale : cérébrale, rénale, cardiaque, digestive ou surrénalienne. Il existe deux formes cliniques : le PTT acquis et celui congénital. Dans le PTT acquis des anticorps sont dirigés contre la protéine ADAMS13, protéase spécifique responsable du clivage des multimères de vWF de haut poids moléculaire. Lorsque les multimères ne sont plus clivés, ils s'accumulent et sont responsables de microthrombi. Le PTT héréditaire est beaucoup plus rare, il est dû à des mutations du gène d'ADAMS13 (34). De nombreuses pathologies peuvent se compliquer d'un PTT : infections (VIH), cancers, MAI (35)(36).

1.4.3.2- CIVD

La CIVD est un syndrome clinico-pathologique qui peut compliquer de très nombreuses maladies : les sepsis graves, les pathologies obstétricales, les cancers, les leucémies aiguës (LA promyélocytaire notamment) et les pathologies hémolytiques. Il s'agit d'une activation généralisée de la coagulation avec une génération excessive de thrombine responsable de dépôts de fibrine dans la microcirculation. Il en résulte une activation du système fibrinolytique ainsi que la consommation des plaquettes et de facteurs de la coagulation notamment du fibrinogène. Au niveau clinique, cela se traduit par des manifestations hémorragiques avec des saignements souvent sévères, des manifestations thrombotiques et des défaillances multi-viscérales liées à l'hypoxie et à l'hypoperfusion. Une forme chronique de CIVD peut exister avec une évolution sur plusieurs semaines ou mois, le plus souvent dans le cadre de néoplasies (37).

2 - Exploration biologique d'une thrombopénie

2.1- La numération plaquettaire au laboratoire d'hématologie

2.1.1 Méthode par impédance

La numération des plaquettes sanguines au laboratoire du CHU de Rouen est effectuée en routine sur l'automate Sysmex XE-5000 par une méthode d'impédance. La limite inférieure de linéarité de cette méthode pour la numération des plaquettes est de 6 G/l, ce qui permet d'effectuer cette méthode lors des thrombopénies sévères. La quantification des plaquettes et des globules rouges est réalisée simultanément dans une chambre de comptage. La focalisation hydrodynamique permet, par la mise en suspension des cellules dans un liquide de gainage, l'unicité du passage cellulaire et l'absence de déformation des cellules. Le passage des cellules à travers un orifice modifie la résistance électrique entre deux électrodes (principe Coulter). Cette variation d'impédance est enregistrée sous forme d'impulsion électrique, la taille de l'impulsion est proportionnelle à la taille de la particule correspondante. Les cellules sont ainsi classées en fonction de leur volume. Lorsque celui-ci est inférieur à 40 femtolitres, la cellule est comptée en plaquette sinon elle l'est en globule rouge. L'automate rend alors des histogrammes érythrocytaire et plaquettaire (figure n°8).

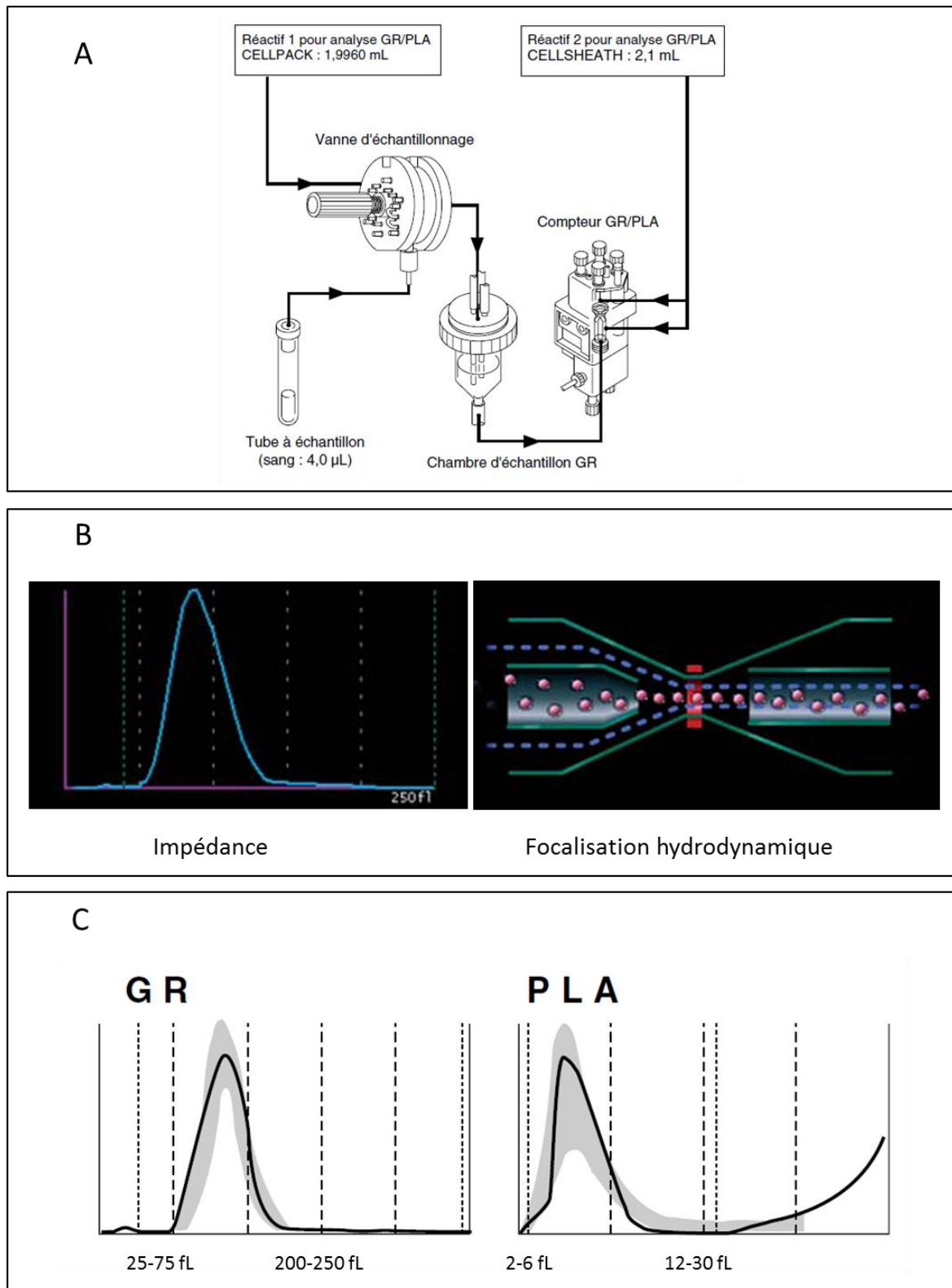


Figure n°8 : Numération des plaquettes par impédance, d'après Analyseur automatique d'hématologie XE-5000 Mode d'emploi, version décembre 2008, Sysmex.

6A : Schéma de la chambre de comptage des hématies et plaquettes (GR/PLA) de l'automate XE-5000.
 6B : Principe de mesure par impédance et détermination des volumes (Volume = résistivité x courant) et de la focalisation hydrodynamique qui permet par injection d'un liquide de gainage une unicité des passages et l'absence de déformation cellulaire.
 6C : Expression de la plage de taille cellulaire normale pour les hématies (GR) et les plaquettes (PLA) normalement bien séparées.

Des anomalies de la taille des plaquettes et des globules rouges entraînent donc des erreurs de l'automate sur le classement de ces éléments. La validation d'une numération doit ainsi être faite après une analyse minutieuse de ces histogrammes et la présence d'anomalies sur ceux-ci doit systématiquement amener à vérifier les plaquettes sur frottis sanguin.

2.1.2 Frottis sanguin

Lors de la présence d'anomalie sur l'histogramme des plaquettes et pour toute thrombopénie inférieure à 130G/l, un frottis sanguin est réalisé afin de rechercher la présence d'amas plaquettaires et d'effectuer une évaluation manuelle du chiffre de plaquettes. Une étude attentive de toutes les lignées sanguines doit également être faite afin de rechercher des arguments pouvant orienter vers une étiologie : la taille et l'aspect des plaquettes, la présence de pseudocorps de Döhle dans le cytoplasme des PNN, la segmentation du noyau des PNN, la présence de cellules anormales (blastiques, lymphoïdes), schizocytes, microcytes.

L'évaluation du chiffre de plaquettes s'effectue à l'objectif 50 dans des champs où les hématies sont bien réparties, le nombre de plaquettes comptées en moyenne par champ est alors multiplié par 4 pour obtenir le compte de plaquettes totales en Giga par litre (G/l).

Si le compte plaquettaire ne correspond pas à celui trouvé initialement par l'automate, d'autres techniques sont disponibles pour effectuer la numération plaquettaire, nous utilisons en premier lieu la méthode optique disponible sur l'automate de routine Sysmex XE-5000.

2.1.3 Méthode optique

La numération plaquettaire par méthode optique est disponible sur l'automate de routine XE-5000, via le canal de mesure des réticulocytes. Le principe de mesure est semblable à celui de la cytométrie de flux. Les cellules sanguines sont mises en contact avec un fluorochrome contenant de la polyméthine et de l'oxazine (réactif Ret-Search) qui pénètre leur membrane et se lie à l'ARN des plaquettes et des hématies immatures. Les cellules défilent dans le canal

réticulocytes dans lequel elles sont exposées à un faisceau laser de 633nm de longueur d'onde. Ce faisceau excite le fluorochrome et induit l'émission de fluorescence rouge.

Le XE-5000 réalise la numération en intégrant l'émission de fluorescence rouge, la diffusion de la lumière aux petits angles (forward scatter) et aux grands angles (side scatter). Le volume cellulaire, déduit de la lumière aux petits angles ainsi que l'intensité de fluorescence de chaque cellule traversant le faisceau sont ainsi obtenus et permettent de classer les cellules.

Un logiciel informatique (IPF Master Software, Sysmex) traite les données et les restitue sous la forme d'un graphe dans lequel chaque cellule est représentée par un point, avec en abscisse la fluorescence et en ordonnée le volume cellulaire. Des nuages de points représentent les différents types de cellules : les globules rouges, les réticulocytes, les plaquettes et les plaquettes immatures que l'on peut ainsi distinguer et quantifier selon leurs caractéristiques de taille et de contenu en ARN. Les plaquettes matures seront reconnues par leur petite taille et leur absence de contenu en ARN (figure n°9).

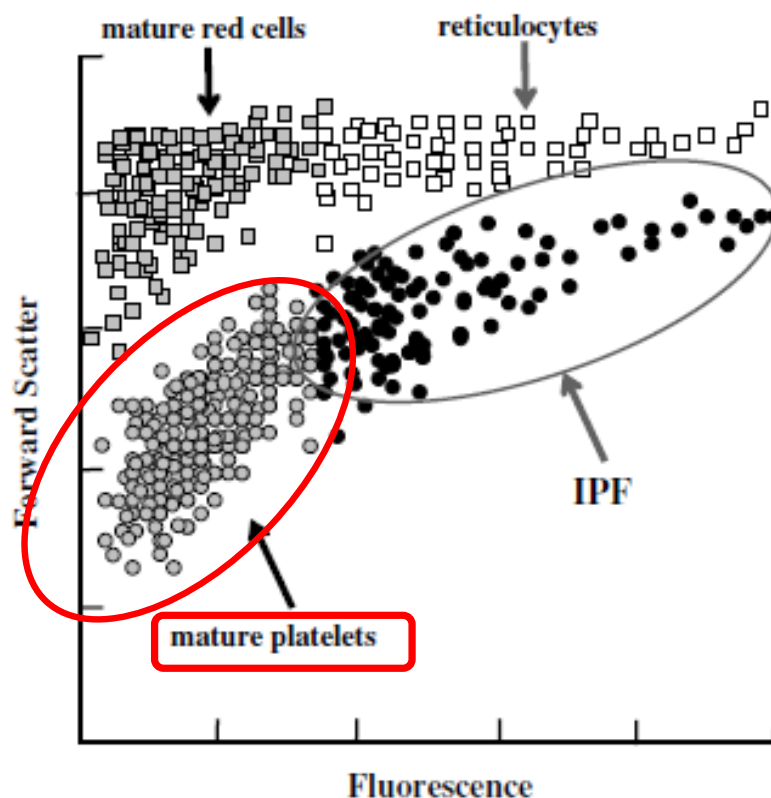


Figure n°9 : Graphique représentant le canal RET sur le XE-2100 d'après Saigo *et al*, *Transfusion and Apheresis Science*, 2008 (38). Les plaquettes matures correspondent aux cellules ayant un petit volume cellulaire (faible forward scatter) et une faible intensité de fluorescence.

Cependant la limite inférieure de linéarité pour la numération des plaquettes en optique est de 30G/l. C'est-à-dire que lorsque la thrombopénie est inférieure à 30G/l, cette technique ne peut être utilisée. Dans ce cas ou lorsque le compte de plaquettes obtenu est toujours discordant, une numération des plaquettes en chambre de comptage est alors réalisée.

2.1.4 Numération en chambre de comptage

Le kit « Thrombo-TIC » (Bioanalytic, Allemagne) (figure n°10) est utilisé pour effectuer cette technique de numération manuelle des plaquettes. Le prélèvement sanguin est mis en suspension dans une solution de tampon d'oxalate permettant la lyse des érythrocytes, la désagrégation et l'arrondissement des plaquettes. La suspension est mise en chambre de comptage, la numération est faite en utilisant un microscope à contraste de phase, les plaquettes apparaissent alors rondes, incolores avec des bords sombres, réfringentes. Si ce compte ne permet pas d'obtenir un résultat adéquat, la dernière solution consiste à effectuer une numération des plaquettes par cytométrie de flux.



Figure n°10 : A- Photographie du kit "Thrombo-TIC" (Bioanalytic, Allemagne) utilisé pour effectuer les numérations plaquettaires en chambre de comptage. Disponible sur le site internet : bioanalytic.de/idv-hematology.en.html. B- Photographie de plaquettes en chambre de comptage en microscopie optique à contraste de phase. Photographie prise au Laboratoire d'Hématologie du CHU de Rouen.

2.1.5 Méthode par cytométrie de flux

La numération des plaquettes par cytométrie de flux est effectuée sur un automate spécialisé Navios (Beckman Coulter). La même technique que celle décrite précédemment est utilisée. Les plaquettes sont marquées par l'anticorps CD41 dirigé contre la GpIIb-IIIa couplé à un fluorochrome, la phyco-érythrine (PE). Les cellules sont mises en suspension et passent devant un faisceau laser qui excite le fluorochrome et induit l'émission de fluorescence. Les cellules sont ensuite identifiées en fonction de leur volume déduit de la lumière aux petits angles (FS) et en fonction de l'expression du CD41. Les plaquettes sont de petite taille et expriment fortement le CD41. Les globules rouges sont également évalués afin de pouvoir ajuster le nombre de plaquettes à la numération des globules rouges de l'automate. Les globules rouges sont de plus grandes tailles et n'expriment pas le CD41 (figure n°11). Pour ajuster le nombre de plaquettes, celui obtenu est alors multiplié par le nombre de GR de l'automate et divisé par le nombre de GR obtenu en cytométrie de flux.

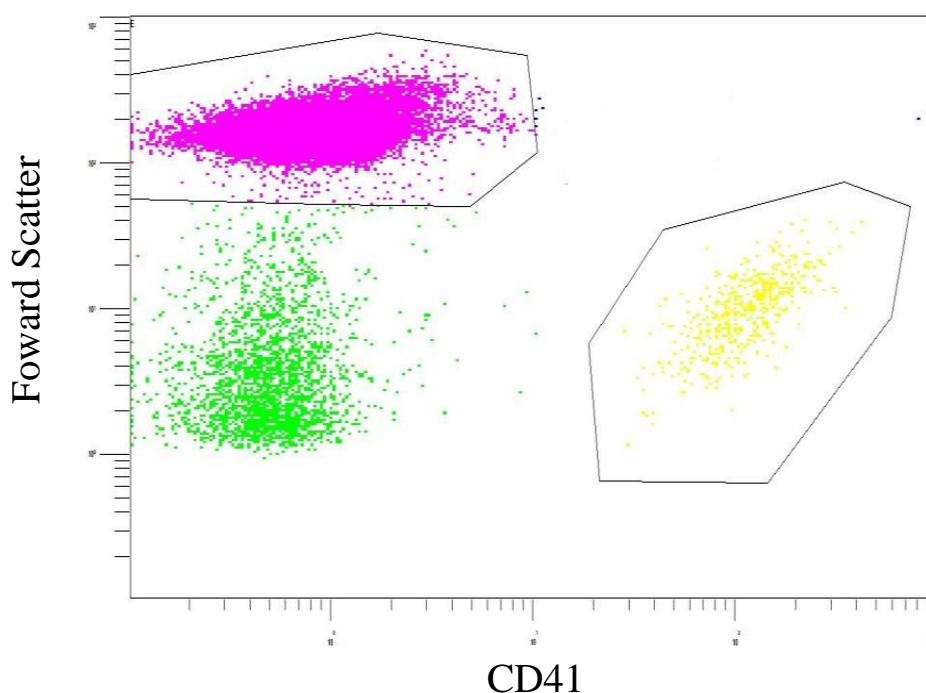


Figure n°11 : graphique représentant les cellules marquées par le CD41 en fonction de leur taille (Foward Scatter) sur l'automate Navios. Les plaquettes correspondent aux points jaunes de petite taille et exprimant fortement le CD41. Les globules rouges correspondent aux points roses de plus grande taille et n'exprimant pas le CD41. Les points verts correspondent aux cellules lysées.

Ainsi, la stratégie de validation de la numération plaquettaire lors d'une thrombopénie suit un logigramme précis (figure n°12).

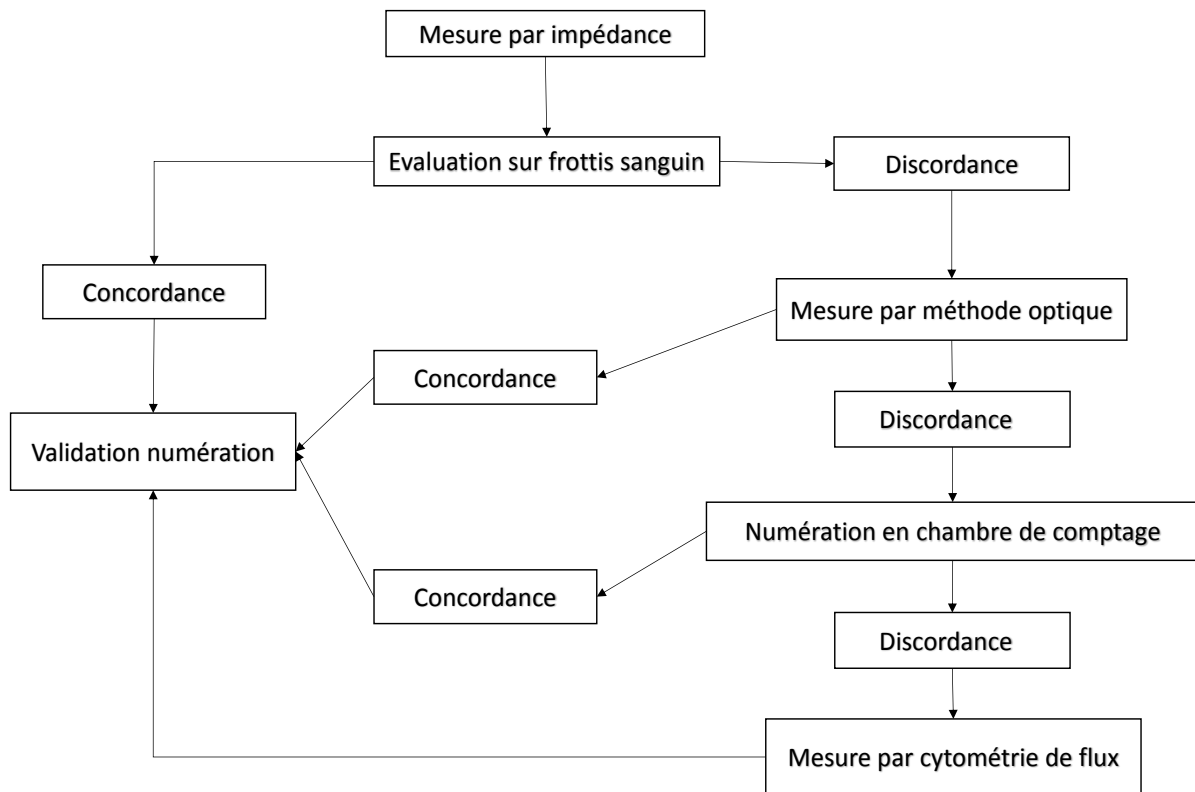


Figure n°12 : Conduite à tenir au laboratoire devant une thrombopénie

Une fois le chiffre de plaquettes rendu par le laboratoire, le clinicien doit en premier lieu éliminer les urgences diagnostiques.

2.2- Les urgences diagnostiques

La présence d'une thrombopénie nécessite bien évidemment dans un premier temps un examen clinique complet. Les signes cliniques de gravité d'une thrombopénie doivent être recherchés : des saignements extériorisés, des bulles hémorragiques intrabuccales, des hémorragies rétiniennes, un syndrome méningé ainsi que des signes de localisation neurologique ou d'hypertension intracrânienne (39). Cet examen permettra également d'orienter les examens complémentaires.

La présence d'une thrombopénie, surtout si elle est majeure ($< 20\text{G/L}$), impose l'identification d'une étiologie précise, en particulier les diagnostics urgents car ils peuvent impliquer rapidement le pronostic vital du patient.

Pour éliminer une CIVD, un bilan d'hémostase doit être effectué : TP, TCA, fibrinogène, complexes solubles et produits de dégradations de la fibrine. La consommation de tous les facteurs de la coagulation lors d'une CIVD entraîne une baisse du TP, un allongement du TCA, une hypofibrinogénémie et la présence de complexes solubles (association des produits de dégradation de la fibrine et des monomères de fibrine).

Une MAT doit être évoquée lors de l'association de la thrombopénie avec une anémie régénérative; il faut alors rechercher la présence de réticulocytes et de schizocytes sur le frottis sanguin, témoignant d'une hémolyse mécanique des globules rouges. Le dosage de la créatininémie devra être demandée en cas de suspicion de SHU. Si un PTT est suspecté, un dosage de la protéase ADAMS13 devra être discuté avec un biologiste spécialisé (36)(40).

Si la thrombopénie est associée à de la fièvre et à un retour de voyage, un paludisme doit être éliminé par le frottis sanguin et la goutte épaisse. Si la fièvre est associée à un purpura, il faut évoquer un purpura fulminans et faire une biopsie cutanée et des hémocultures.

2.3- Recherche d'une étiologie périphérique

Un ensemble d'examens doit être effectué afin d'étayer le diagnostic étiologique et différentiel de la thrombopénie (tableau n°3). La recherche d'une splénomégalie et d'une pathologie hépatique se fera à l'aide d'une échographie abdominale et d'un bilan hépatique. Une cause virale sera à identifier par les sérologies (VIH, VHB, VHC,..). Un contexte auto-immun sera mis en évidence par la prescription d'autoAc : anti-nucléaires, anticoagulant circulant, anti-cardiolipine, anti- β 2glycoprotéine1, anti-phospholipides, anti thyroïde, test de Coombs érythrocytaire. Une électrophorèse des protéines sériques peut également être réalisée pour mettre en évidence un déficit immunitaire.

2.4- Le myélogramme

Il s'agit d'un examen invasif dont l'indication doit être discutée avec un spécialiste. Il est principalement utilisé pour diagnostiquer les étiologies centrales des thrombopénies, dans ces situations il est cependant exceptionnel que la thrombopénie soit isolée.

En revanche, lors d'un PTI typique, la réalisation de cet examen ne fait pas consensus. Cependant au moment du diagnostic la réalisation du myélogramme est indispensable lorsque la thrombopénie est associée une anomalie d'une autre lignée ou que des anomalies évoquant une atteinte centrale sont retrouvées sur le frottis sanguin. De la même façon, cet examen devra être effectué chez l'adulte, lorsque celui-ci a plus de 60 ans ou lorsqu'il présente une organomégalie. Chez l'enfant, la présence d'une altération de l'état général, une organomégalie ou des douleurs osseuses feront discuter la réalisation d'un myélogramme (39).

En l'absence de cause retrouvée, un PTI devra être évoqué. Le PTI est un diagnostic d'élimination cependant une recherche des Ac antiplaquettaires peut être effectuée.

2.5- Recherche d'Ac antiplaquettaires

Ces examens sont potentiellement utiles mais ils manquent de sensibilité, et des résultats négatifs ne peuvent pas toujours permettre d'exclure le diagnostic.

Le test de Coombs plaquettaire consiste à mettre en évidence les Ac fixés sur les plaquettes. Pour cela, les plaquettes sont mises en contact avec un Ac anti-Immunoglobuline fluorescent qui se fixe aux Ac présents sur les plaquettes. La fluorescence est ensuite analysée par la cytométrie de flux. Cependant ce test n'est pas très spécifique car d'autres Ac non spécifiques peuvent être reconnus. Le test MAIPA (*Monoclonal Antibody Immobilization of Platelet Antigens*) est plus spécifique car il détecte un auto-Ac fixé spécifiquement sur une des glycoprotéines membranaires (figure n°13). Cependant il s'agit d'une technique longue (20 heures), elle ne doit être utilisée qu'en cas de difficulté diagnostique.

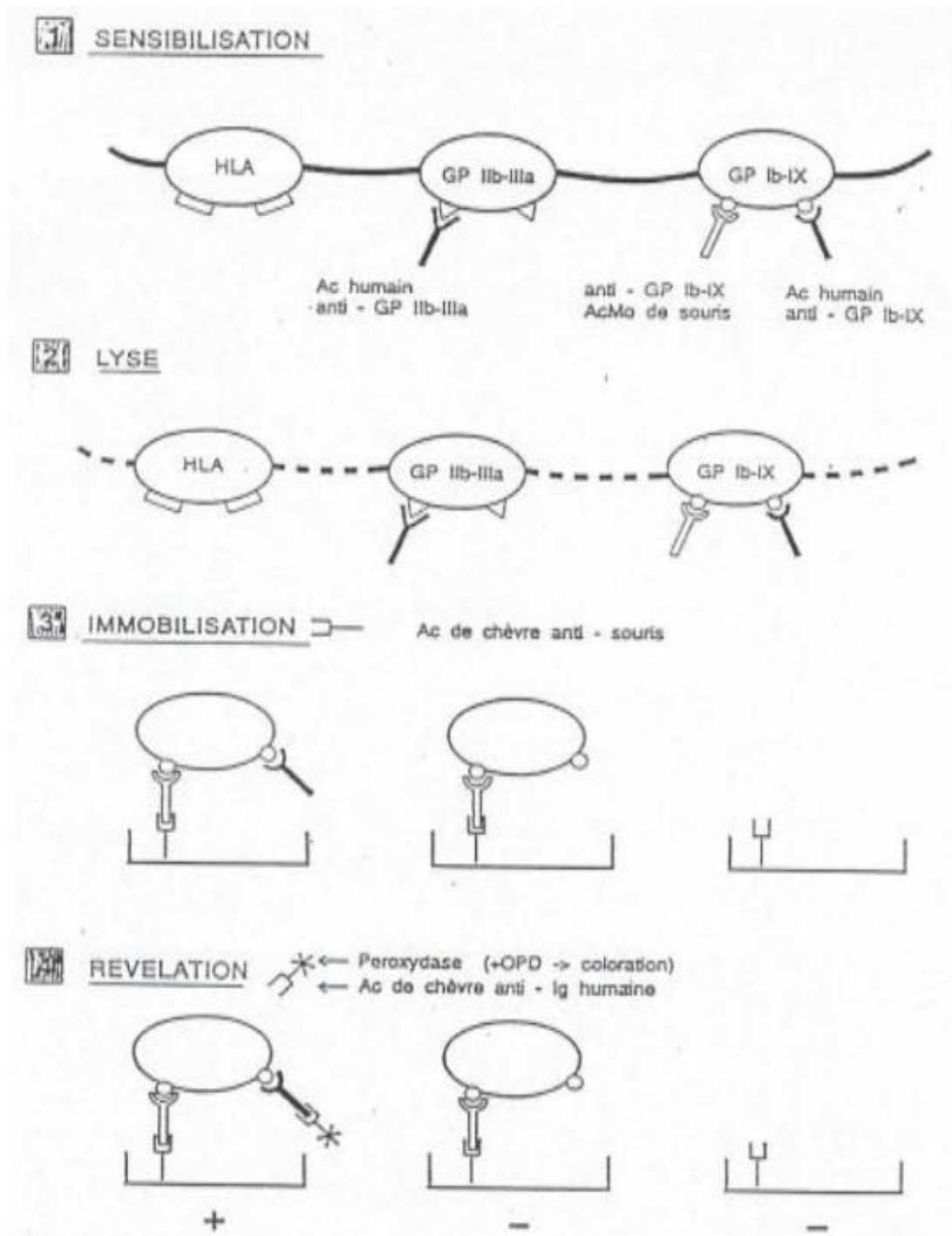


Figure n°13 : Principe du test MAIPA d'après Kiefel, Blood, 1987 (41). 1- Sensibilisation : Fixation d'un Ac humain anti-GP sur les plaquettes du malade, 2- Lyse : Dénaturation des membranes plaquettaires, 3- Immobilisation : des complexes GP-Ac sur une microplaque recouverte d'anticorps anti-Ig de souris dirigé contre l'Ac de départ, 4- Révélation : addition d'un Ac anti-Ig humaine marquée à la peroxydase dirigé contre l'Ac du complexe Gp+Ac, réaction colorée de la peroxydase.

L'Haute Autorité de Santé (HAS) a publié en 2009 des recommandations sur les examens complémentaires à réaliser et leur pertinence lors du diagnostic de PTI (tableau n°3).

Tableau n°3 : Examens complémentaires à demander devant un PTI selon l'HAS, 2009 (39).

Examens systématiques	Examens en fonction du contexte	Examens inutiles
NFS sur tube citrate si doute sur fausse thrombopénie à l'EDTA	Myélogramme +/- caryotype	Temps de saignement
Frotis sanguin analysé par l'hématologiste biologiste	Recherche d'un anticoagulant circulant	Dosage du complément
Electrophorèse des protéines sériques ou dosage pondéral des Ig	Anticorps anticardiolipides	Dosage de TPO et recherche de plaquettes réticulées
Sérologies VIH	Chez l'adulte, recherche d'une infection par <i>Helicobacter Pylori</i> (Breath-test à l'uréase ou recherche d'antigène dans les selles) *	
Sérologies des hépatites B et C	Échographie abdominale systématique pour certains, en particulier si une splénectomie est envisagée	
Bilan hépatique	Immunophénotypage des lymphocytes circulants	
Anticorps antinucléaires	Immunoélectrophorèse des protéines sériques	
TSH et anticorps antithyroïde	Durée de vie isotopique des plaquettes	
Créatinine	Anticorps antiplaquettes par MAIPA	
TP, TCA, fibrinogène		
Groupe sanguin, agglutinines irrégulières dans les formes sévères		

La recherche de plaquettes réticulées était un examen inutile pour l'HAS en 2009, cependant depuis cette date de nombreuses évolutions ont été mises en place par rapport à leur numération et beaucoup d'études ont été réalisées afin d'évaluer leur place dans le diagnostic des thrombopénies.

III) La Fraction des plaquettes immatures (IPF) sur l'automate XE 5000, Sysmex

Les plaquettes immatures sont communément appelées plaquettes réticulées, en référence aux globules rouges immatures, les réticulocytes. Il s'agit des plaquettes les plus jeunes résultant de la fragmentation des mégacaryocytes et libérées directement dans la circulation sanguine. Toujours par analogie avec les réticulocytes, la numération de ces plaquettes néoformées a été proposée comme marqueur du renouvellement plaquettaire et de la thrombopoïèse.

1- Historique des plaquettes réticulées

Les plaquettes réticulées ont été décrites pour la première fois par Ingram et Coopersmith en 1969 chez le chien (5). Cette étude a permis de mettre en évidence l'apparition de plaquettes néoformées sur le frottis sanguin suite à une hémorragie aiguë : celles ci possédaient des granulations cytoplasmiques se colorant au bleu de méthylène nouveau, de la même façon que les réticulocytes. Ces granulations sont des résidus de réticulum endoplasmique et d'ARN messager (ARNm) provenant des mégacaryocytes. L'ARNm des plaquettes est instable et se dégrade rapidement dans la circulation, en 24h environ dans les modèles canins et murins, alors que la durée de vie totale des plaquettes est de huit jours (42).

Cette technique de coloration au bleu de méthylène nouveau a été développée en routine pour analyser de façon manuelle les réticulocytes : le bleu de méthylène nouveau réagit avec le ribosome des réticulocytes formant des précipités de granules et filaments détectés et comptés au microscope (figure n°14).

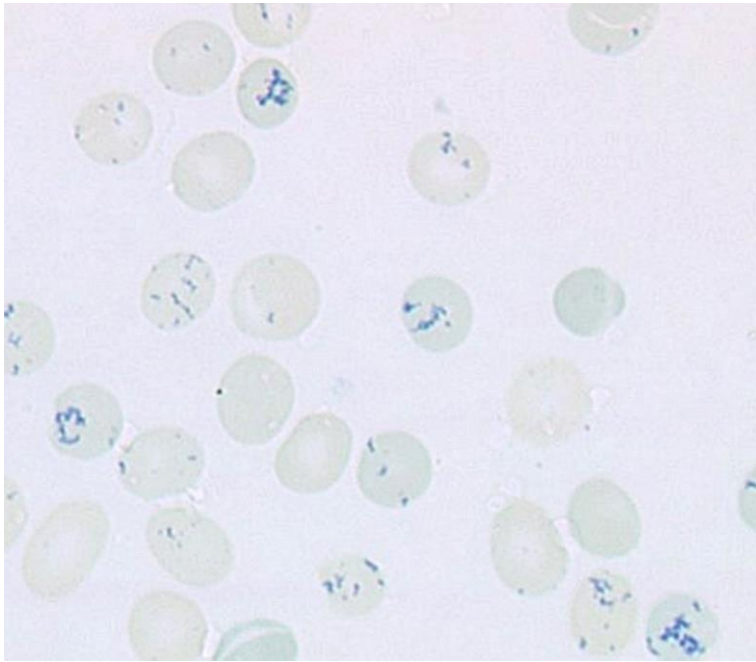


Figure n°14 : Photographie d'un frottis sanguin en microscopie optique représentant des réticulocytes colorés au bleu de crésyl. Photographie prise au Laboratoire d'Hématologie du CHU de Rouen.

Cependant cette méthode est peu précise, longue à mettre en œuvre et responsable d'erreurs liées à une fixation non spécifique du colorant (43).

Cette technique a donc été progressivement supplantée par la cytométrie de flux. Celle-ci consiste en l'utilisation d'un fluorochrome ayant une affinité pour les acides nucléiques. De nombreux fluorochromes étaient déjà utilisés pour l'analyse des réticulocytes tels que l'acridine orange, le pyronin Y ou le thiazole orange. Le thiazole orange a été le premier fluorochrome employé dans l'étude des plaquettes réticulées et resta le plus couramment utilisé du fait de certaines de ses propriétés : il pénètre facilement la membrane plaquettaire du fait de son caractère lipophile et il est excité à 488nm, une longueur d'onde adaptée au laser Argon utilisé dans la plupart des cytomètres (44).

L'analyse de la littérature montre une grande variation entre les valeurs normales de référence des plaquettes réticulées chez les sujets sains obtenues par cytométrie de flux selon les études (11-15). Ces variations seraient liées au fait qu'une partie du signal émis par le thiazole orange dérive d'autres structures plaquettaires telles que l'ADN mitochondrial ou les granules denses (47). Une autre raison pour expliquer les variations des valeurs normales chez le sujet sain est l'absence de standardisation de la technique entre les laboratoires. En effet, les protocoles

diffèrent concernant le type de prélèvement utilisé (sang total ou plasma riche en plaquettes), le type de fluorochrome employé et sa concentration ou le temps d'incubation. De plus, la cytométrie de flux nécessite un matériel spécialisé et une interprétation experte des résultats. Ainsi le dosage des plaquettes réticulées par cytométrie de flux, bien que prometteur, ne permet pas d'obtenir des résultats fiables et reproductibles et ne peut donc pas être utilisé en routine. C'est pourquoi depuis quelques années, une méthode de mesure automatisée a été développée sur les nouvelles générations d'automates de cytologie hématologique.

2- Principe de mesure de l'IPF

Une méthode automatisée de mesure des plaquettes réticulées a été développée par la société Sysmex (Kobe, Japon) sur l'automate d'hématologie XE 5000.

Au cours des dernières années, le développement de nouveaux logiciels et principes de mesure ont permis d'ajouter d'autres paramètres à la numération formule sanguine effectuée jusqu'alors. Ainsi, le XE 5000 possède un canal de mesure, le canal RET, sur lequel est obtenu le compte de réticulocytes. Celui-ci est également capable de déterminer les plaquettes immatures sous la forme d'une fraction immature des plaquettes (*Immature Platelet Fraction* ou IPF%). Ce canal permet également d'obtenir un compte des plaquettes en mode optique en complément de la méthode de mesure classique par impédancemétrie.

Le principe de mesure correspond à celui décrit précédemment pour la numération des plaquettes optiques.

Au sein des plaquettes, le logiciel distingue les plaquettes immatures qui ont un plus grand volume et une forte intensité de fluorescence (figure n°15). La fraction des plaquettes immatures est exprimée en pourcentage de la numération plaquettaire totale (48).

La mesure de l'IPF par les automates d'hématologie de routine permet ainsi d'obtenir un résultat en moins d'une minute en même temps que la numération formule sanguine et le compte de réticulocytes. Cette technique entièrement automatisée permet donc d'obtenir un résultat rapide et standardisé (49).

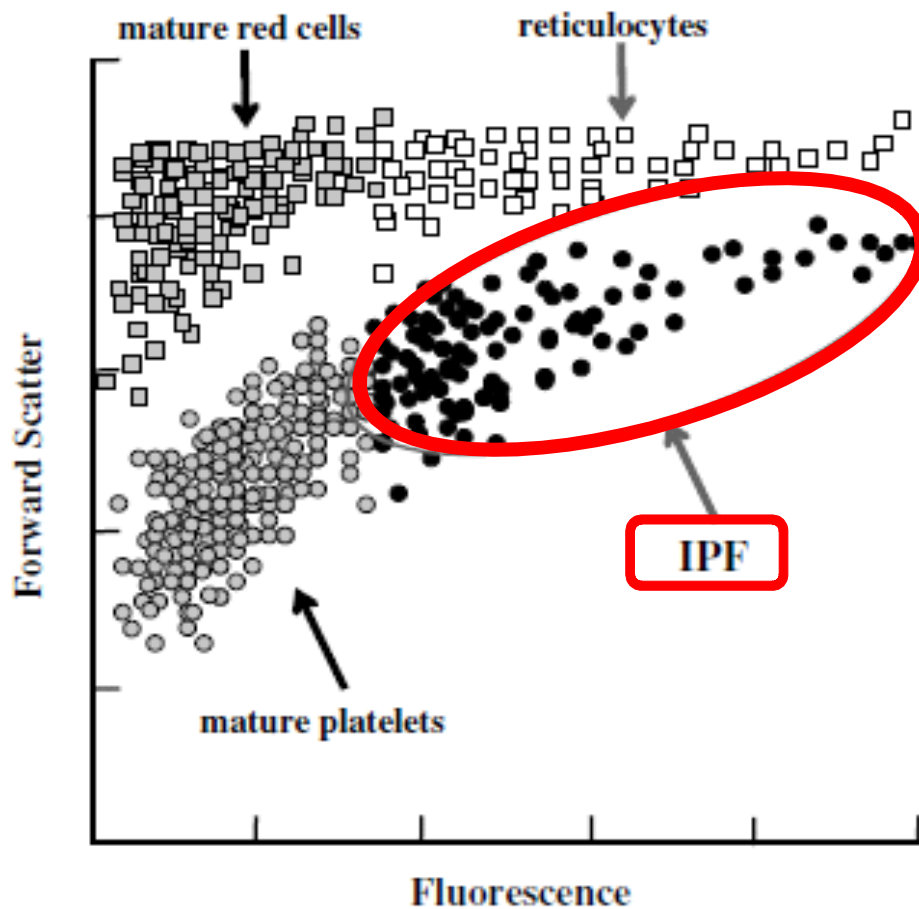


Figure n°15 : Graphique représentant le canal RET sur le XE 2100 d'après Saigo *et al.*, Transfusion and Apheresis Science, 2008 (38).

Les différentes populations cellulaires sont séparées en fonction de la lumière transmise aux petits angles (forward scatter) proportionnelle à leur taille (en ordonnées) et de l'intensité de fluorescence relative au contenu en ADN/ARN (en abscisses).

De nombreuses études ont ainsi été mises en place afin de déterminer les intervalles de référence à utiliser pour ce paramètre.

3- Intervalles de références de l'IPF

Les valeurs de référence de l'IPF ont été étudiées dans de nombreuses publications (tableau n°4). Cependant on peut noter que les effectifs de ces publications sont le plus souvent assez limités. Seul Jung présente un effectif extrêmement important de la population coréenne

(n=2039) avec des valeurs normales d'IPF plus faibles que celles retrouvées dans la plupart des autres études (moyenne=1.7%) (48). Une autre étude coréenne a retrouvé des intervalles de référence semblables à ceux de Jung, laissant penser qu'il peut exister des variations de l'IPF selon l'ethnie (50).

Tableau n°4 : Valeurs de référence de l'IPF (en %) dans les populations de sujets témoins de la littérature (50)(48)(51)(52)(53)(54)(55)(56)(49)(57)(58).

Auteur, Pays, Année	Effectif	Moyenne	Minimum	Maximum
Ko, Corée du Sud, 2011	2152	1,3	0,2	4,1
Jung, Corée du Sud, 2010	2039	1,2	0,3	5,9
Abe, Japon, 2005	129	3,3	1	10,3
Nomura, Japon, 2009	114	3,02	0,7	7,3
Bat, USA, 2013	107	2,6	0,9	7,2
Strauss, Berlin, 2010	100 (péd)	2,7	0,7	5,7
Kickler, USA, 2006	80	3,1	1	7
Cannavo France, 2010	52	2,2	1	4,5
Briggs, UK, 2004	50	3,4	1,1	6,1
Albanyan, UK, 2008	30	3,5	0,83	6,17
Pons, Espagne, 2007	14	2,56	1,7	3,43

péd : effectif pédiatrique, USA : *United States of America*, UK : *United Kingdom*

De plus il semble exister des variations de l'IPF selon l'âge chez l'enfant : avant quatre ans les valeurs normales de l'IPF semblent en moyenne plus élevées que chez les cinq à dix-sept ans. Cependant la cohorte d'enfants prélevés reste limitée (n=100), il est en effet difficile d'effectuer des prélèvements sur un grand nombre de sujets sains en pédiatrie. Chez l'adulte en revanche, il ne semble pas y avoir de variation de l'IPF selon l'âge, Ko ne retrouve pas de différence significative sur la valeur moyenne de l'IPF entre le groupe âgé de moins de 65 ans et celui âgé de 65 ans et plus (50).

Les valeurs normales de l'IPF selon le sexe varient en fonction des publications, certaines études n'ont pas retrouvé de différence entre les deux sexes, alors que d'autres ont observé des valeurs normales d'IPF légèrement plus élevées chez l'homme que chez la femme (48)(50).

Ainsi, les nombreuses études menées sur ce paramètre n'ont pas permis de trouver un consensus sur les valeurs normales de l'IPF, celles-ci étant assez variables d'une étude à l'autre. Il n'existe donc pas à ce jour de valeurs de référence officielles concernant ce paramètre.

4- Stabilité

Une étude a observé les effets sur l'IPF d'une conservation des prélèvements à +4°C de 4 à 24 heures chez 29 patients (59). Dans ces conditions, une augmentation des valeurs de l'IPF dès les premières heures a été observée. Les auteurs formulent différentes hypothèses pour expliquer cette hausse. Une dégradation des plaquettes au froid entraînant une libération d'ARN à l'origine d'une fausse augmentation de l'IPF et un phénomène de division plaquettaire in vitro sont évoqués (59).

A l'inverse, les études portant sur la conservation des échantillons à température ambiante semblent se rejoindre sur la stabilité des valeurs de l'IPF jusqu'à 8 heures chez les patients sains (49)(56). Les études s'accordent moins concernant une conservation plus longue du prélèvement. Briggs ne retrouve pas de variation significative entre 30 minutes et 48 heures après le prélèvement (49) tandis que Nomura décrit une augmentation constante de l'IPF avec une différence significative à 48 heures (52). Cependant cette dernière étude a porté sur un nombre extrêmement faible de prélèvements, limité à seulement trois. Par ailleurs, il est intéressant de noter que l'IPF était également stable à 24h à température ambiante chez les patients présentant un PTI (60).

Ainsi, les valeurs de l'IPF semblent stables jusqu'à 24 heures après le prélèvement lorsque celui-ci a été conservé à température ambiante.

5- Reproductibilité

Le coefficient de variabilité (CV) obtenu dans les différentes études de reproductibilité chez des sujets sains est très variable. Selon les études, les valeurs moyennes varient de 6.3% à 18% (23)(49)(52)(62)(56)(55). Cependant les méthodes d'analyse diffèrent en fonction des études et les valeurs numériques de l'IPF étant faibles, cela induit inévitablement des CV assez élevés.

6- Intérêt clinique de l'IPF

De nombreuses études sur la mesure des plaquettes réticulées ont été effectuées, initialement par la méthode de cytométrie en flux et ensuite grâce à l'IPF. Les principales applications

cliniques étudiées étaient l'évaluation diagnostique et prédictive de ce marqueur dans les thrombopénies. L'IPF a ensuite été étudié dans diverses pathologies.

6.1- IPF et thrombopénies périphériques

Plusieurs études ont montré une augmentation significative de l'IPF allant de 7,7% jusqu'à 17,4%, dans les situations de thrombopénie par destruction périphérique, que ce soit lors d'un PTI ou d'un PTT (48)(49) (56)(51). Il n'était pas retrouvé de différence significative entre les valeurs d'IPF entre les enfants et les adultes et entre les femmes et les hommes présentant un PTI (48). Une étude chez les enfants a différencié les PTI nouvellement diagnostiqués des PTI chroniques. L'IPF était retrouvé augmenté dans les 2 groupes avec des valeurs plus importantes dans le groupe PTI chronique (54).

Une étude s'est penchée sur les cinétiques des paramètres plaquettaires notamment de la numération plaquettaire et de l'IPF. Une corrélation inverse de la cinétique de la numération plaquettaire et de l'IPF a été observée (49). Ainsi lorsque le taux d'IPF diminuait, la numération plaquettaire remontait. De plus, les valeurs de l'IPF étaient normales chez les patients présentant un PTT ou un PTI en rémission (36). L'IPF pourrait donc être un bon marqueur de suivi pour le PTI et le PTT.

Une étude des valeurs d'IPF chez les patients présentant une CIVD a montré une augmentation significative de ces valeurs par rapport au groupe contrôle, avec une moyenne à 9.5% (2.3-18.6) (55). Cependant l'étude de Cannavo n'a retrouvé une augmentation de l'IPF que chez 9 patients sur les 16 présentant une CIVD (56).

L'étude globale de patients présentant une thrombopénie par destruction périphérique des plaquettes comprenant le PTI, la CIVD, le PTT, le syndrome de Evans, retrouvait une augmentation significative de l'IPF par rapport au groupe contrôle et par rapport aux autres groupes de l'étude soit un groupe de thrombopénie centrale et un groupe de thrombopénie périphériques non immunologiques par distribution anormale des plaquettes (splénomégalie et hypersplénisme) (57).

L'étude des thrombopénies périphériques liées à une distribution anormale des plaquettes par splénomégalie et hypersplénisme (cirrhose, hypertension portale) a montré une augmentation significative de l'IPF par rapport au groupe contrôle. L'IPF était, par contre, significativement plus bas que dans les thrombopénies par destruction périphérique. En revanche, il n'a pas été démontré de différence significative par rapport au groupe de patients présentant des

thrombopénies d'origine centrale (hémopathie maligne, aplasie médullaire, infiltration médullaire par une tumeur solide) (57).

Ainsi, un certain nombre d'observations peuvent être faites :

- L'IPF de l'ensemble des thrombopénies périphériques apparaît comme significativement augmenté par rapport à celui des groupes contrôles.

- L'IPF des thrombopénies par destruction périphérique des plaquettes est significativement plus élevé que celui des autres groupes.

- En revanche, l'IPF des thrombopénies par consommation ou distribution anormale des plaquettes n'est pas significativement différent de celui du groupe des thrombopénies centrales.

Finalement, ce paramètre semble être un bon marqueur du renouvellement plaquettaire lors des thrombopénies par destruction périphérique mais ne permet pas de distinguer une thrombopénie centrale des autres causes de thrombopénies périphériques.

6.2- IPF et thrombopénies centrales

Des études ont été menées chez des patients présentant une aplasie médullaire idiopathique (AM). L'IPF y était retrouvé augmenté par rapport au groupe de patients contrôle. Cependant cette augmentation n'était pas toujours significative (48)(51). En revanche, des comparaisons de l'IPF des patients présentant un PTI à celui des patients avec une aplasie médullaire donnaient à observer une différence significative avec des taux plus bas lors des AM (48),(51). Un cut-off de l'IPF a été établi par Jung à 7.3% afin de différencier l'AM du PTI, dont la sensibilité était de 54% avec une spécificité de 92.2% (48).

L'IPF a également été étudié dans un ensemble de pathologies responsables de thrombopénies centrales : les hémopathies malignes, l'aplasie médullaire et l'infiltration médullaire par une tumeur solide. L'IPF des thrombopénies centrales était significativement augmenté par rapport au groupe contrôle, mais il était significativement plus bas que celui des thrombopénies périphériques par destruction. En revanche, il n'a pas été démontré de différence significative avec le groupe des thrombopénies périphériques par distribution anormale des plaquettes (57).

Ainsi à la différence des réticulocytes lors des anémies d'étiologies centrales dites arégénératives, on observe que l'IPF est significativement augmenté lors des thrombopénies

centrales, ce qui rend difficile son utilisation en pratique courante sous réserve d'identifier clairement un seuil de significativité pour chaque groupe de thrombopénie.

6.3- IPF et thrombopénie du VIH

Les patients atteints du VIH présentant une thrombopénie avaient un IPF significativement plus élevé que les patients VIH sans thrombopénie. Cela suggère que la thrombopénie du VIH pourrait être associée à une augmentation du renouvellement plaquettaire (63).

6.4- IPF et pathologies diverses

L'IPF a également été étudié dans certaines pathologies retrouvées fréquemment dans les antécédents des patients hospitalisés, telles que le diabète, le tabagisme. Cependant les études ne s'accordent pas toutes sur les résultats. Ainsi, Grove retrouve un IPF plus élevé chez les patients fumeurs et diabétiques tandis que Gonzales ne met pas en évidence de corrélation entre l'IPF et le tabac ou le diabète (64)(65).

Ainsi, l'IPF qui mesure au niveau des plaquettes la fraction de celles immatures, pourrait être considéré comme l'équivalent des réticulocytes pour les globules rouges. Néanmoins, des différences existent entre ces deux paramètres. En effet, il apparaît que l'IPF est aussi augmenté lors des thrombopénies centrales et que cette augmentation n'est pas significativement différente par rapport à celle observée lors des thrombopénies périphériques liées à une distribution anormale des plaquettes.

L'utilisation des réticulocytes lors du diagnostic d'une anémie ne peut donc pas être transposée à l'IPF. Une approche diagnostique doit donc être trouvée afin de définir la place de l'IPF dans la différenciation des thrombopénies périphériques et centrales.

Buts de l'étude

L'IPF est un paramètre biologique facilement mesurable en routine car disponible sur les automates de cytologie XE 5000. Dans la littérature, les études ont été nombreuses à s'intéresser à ce paramètre, cependant toutes ne s'accordent pas en ce qui concerne ses valeurs normales. De plus, peu d'études se sont intéressées à l'évaluation de la stabilité de ce paramètre. Dans un premier temps, nous avons donc souhaité évaluer au Laboratoire d'Hématologie du CHU de Rouen, les valeurs normales et la stabilité de l'IPF chez des sujets témoins.

La thrombopénie est une anomalie sanguine fréquemment rencontrée. Elle peut de plus, engager le pronostic vital du patient à court terme, selon sa profondeur et son étiologie. L'exploration d'une thrombopénie peut donner lieu à de nombreuses investigations mais le seul examen complémentaire permettant de faire une distinction entre une origine périphérique ou centrale de la thrombopénie est le myélogramme. Néanmoins, il s'agit d'un geste invasif, nécessitant une réalisation parfaite pour être interprété par un biologiste expert. De nombreuses études s'accordent à dire que l'IPF est un bon reflet de la production plaquettaire. Les plaquettes réticulées sembleraient donc pouvoir jouer le même rôle que les réticulocytes pour les globules rouges et ainsi être utilisées de la même manière que ceux-ci dans le diagnostic des thrombopénies. Cependant, comme nous l'avons signalé précédemment certains auteurs ont mis en évidence qu'une équivalence du rôle des plaquettes réticulées et des réticulocytes n'a pas pu être clairement établie jusqu'à présent. Il nous est apparu ainsi intéressant d'évaluer d'une part ce paramètre chez des patients présentant des thrombopénies périphériques et des thrombopénies centrales et d'autre part d'essayer de mettre en place une stratégie diagnostique utilisant ce paramètre lors de l'exploration des thrombopénies.

Matériels et méthodes

I) Valeurs normales de l'IPF

Les échantillons sanguins de 35 adultes volontaires sains (12 hommes et 23 femmes) ont été utilisés pour établir les valeurs normales de l'IPF. Les sujets étudiés étaient des employés du CHU de Rouen. Le prélèvement nécessaire a été obtenu alors qu'ils participaient à une collecte de sang afin de constituer des prélèvements témoins pour des examens d'hémostase spécialisée. Il s'agissait de personnes ne présentant pas de pathologies connues et n'ayant pas pris de traitement les jours précédants le prélèvement. Une numération plaquettaire et la mesure de l'IPF ont été effectuées.

II) Stabilité de l'IPF

Dans un second temps, nous avons étudié la stabilité de l'IPF à partir de prélèvements sanguins de patients : 11 patients avec un taux de plaquettes normal (150 à 400 G/l), 11 patients présentant une thrombopénie avec un taux de plaquettes entre 50 et 150 G/l et enfin 10 autres patients avec un taux entre 0 et 50 G/l. Ainsi 32 prélèvements sanguins ont été testés à la réception de l'échantillon (H0), à 8 heures (H8) puis à 24 heures (H24). Les échantillons ont été gardés à température ambiante entre chaque passage. La réception de l'échantillon avait lieu dans l'heure suivant le prélèvement veineux.

II) Groupes thrombopénies

L'étude a été effectuée de façon rétrospective entre juin 2011 (date d'installation des automates XE 5000 dans notre laboratoire d'hématologie du CHU de Rouen) et mai 2015.

A partir de l'analyse des myélogrammes reçus durant cette période, deux groupes ont été constitués (figure n°16) :

- Le premier comprenant les patients dont le myélogramme concluait à une thrombopénie d'origine périphérique (n=156).

- Le deuxième regroupait les thrombopénies centrales, sur la base d'une sélection d'étiologies de ces thrombopénies : les aplasies médullaires (non chimio-induites), les envahissements médullaires par des cellules de métastases de cancers solides, les carences vitaminiques (anémies mégaloblastiques et carences aiguës en folates) et le syndrome d'activation macrophagique (n=78).

Pour l'ensemble des patients, une analyse des numérations au moment du diagnostic a été effectuée afin de retrouver une mesure des réticulocytes pour pouvoir obtenir l'IPF.

Ainsi à partir des 156 myélogrammes concluant à une thrombopénie d'origine périphérique, nous avons pu obtenir une mesure de l'IPF chez 71 patients. Pour tous ces patients, une étude du dossier médical clinique et biologique a été effectuée afin de retrouver la cause de cette thrombopénie. Celle-ci pouvait consister en une destruction périphérique des plaquettes (PTI, médicamenteuse) ou une consommation des plaquettes (MAT, CIVD) ou encore une distribution anormale des plaquettes (hypersplénisme). Les patients ont ainsi pu être classés en sous-groupe, le premier comprenant les thrombopénies liées à un PTI (n=38) et un autre contenant les autres étiologies (n=29). Quatre patients étiquetés de thrombopénie périphérique par le myélogramme ont été exclus de ce groupe car une étiologie constitutionnelle a été retrouvée lors de l'étude de leur dossier clinique. Un patient présentait un syndrome MYH9, pour les autres patients l'étiologie constitutionnelle n'avait pas confirmée. Ces patients ont été mis dans un groupe à part : les thrombopénies constitutionnelles. Ce groupe a été complété par des patients présentant un syndrome MYH9, recrutés grâce à un listing du Centre de Référence de Traitement de l'Hémophilie (CRTH) : 5 patients ont été inclus en plus dans ce groupe. Le groupe des thrombopénies constitutionnelles se compose ainsi de 9 patients. Le nombre de patients dans ce groupe étant limité, une simple étude descriptive sera effectuée.

De la même façon, 78 myélogrammes concluaient à une cause centrale de la thrombopénie et l'étude des numérations a finalement permis d'inclure 46 patients dans ce groupe des thrombopénies centrales. De manière comparable, une étude du dossier clinique et biologique de ces patients a été effectuée afin de ne pas méconnaître une éventuelle origine mixte de la thrombopénie. Les patients ont également pu être classés en sous-groupe, le premier comprenait les thrombopénies secondaires à une carence vitaminique (n=17) et un autre contenant les autres étiologies (n=29).

Pour l'ensemble des sujets, l'étude des dossiers a permis de relever les caractéristiques générales des patients (âge, sexe, services d'hospitalisation) ainsi que leur hémogramme au moment du diagnostic (thrombopénie isolée, bicytopenie, pancytopenie).

Au total, l'étude a porté sur 107 patients dont 67 présentaient une thrombopénie périphérique, 46 une thrombopénie d'origine centrale et 9 une thrombopénie constitutionnelle.

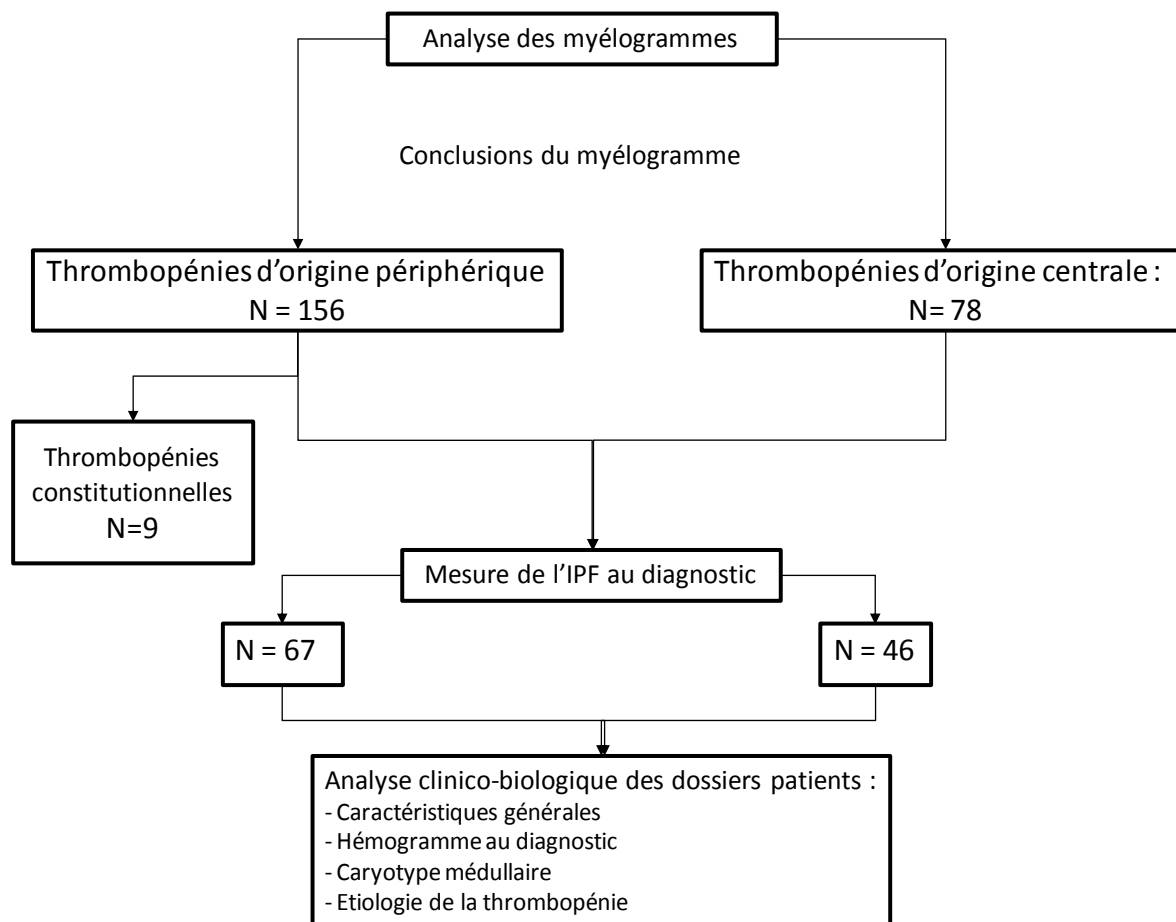


Figure n°16 : Schéma descriptif de l'étude

III) Mesure de l'IPF

Les prélèvements de sang veineux périphériques ont été réalisés dans un tube contenant de l'éthylène diamine tétra-acétique (EDTA-K2, Beckton Dickinson, Rutherford, Etats-Unis et Venosafe, Terumo Europe, Leuven, Belgium). Un seul et même tube a été utilisé pour effectuer

la numération plaquettaire et la mesure de l'IPF. Tous les tubes ont été conservés à température ambiante jusqu'à analyse.

Ces prélèvements ont été analysés sur l'automate Sysmex XE 5000 (Kobe, Japon) du laboratoire d'hématologie du Centre Hospitalier Universitaire de Rouen. La mesure de l'IPF a été effectuée sur le canal "réticulocytes" de l'automate selon la méthode décrite en introduction de cette étude, à l'aide du logiciel software IPF Master Sysmex. Le paramètre étudié était l'IPF% qui donne le pourcentage de plaquettes réticulées par rapport au nombre total de plaquettes.

IV) Analyse statistique

Les analyses statistiques ont été réalisées en utilisant le site internet Biostatgv. Le seuil de significativité p a été fixé à 0,05. Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes \pm écarts types pour les variables quantitatives ou de pourcentages pour les variables qualitatives. Pour la comparaison des groupes appariés, le test des rangs signés de Wilcoxon a été utilisé. Lorsque la comparaison concernait des groupes indépendants, le test non paramétrique de Mann-Whitney a été employé. Les graphiques de comparaison de données ont été réalisés sous la forme de Box plot en utilisant le logiciel R 3.1.2 pour Windows. Les courbes ROC avec l'estimation de l'AUC de la courbe, des sensibilités et spécificités optimales ont été obtenues par ce même logiciel, afin de déterminer la valeur « cut-off » de l'IPF permettant de différencier les seuil d'IPF pour les thrombopénies périphériques de celui des thrombopénies centrales et celui des PTI de celui des autres thrombopénies (centrales et périphériques non PTI).

Résultats

I) Valeurs normales de l'IPF

Dans notre groupe de volontaires sains, un sujet présentait une thrombopénie avec un taux de plaquettes à 145 G/l, celui-ci a donc été exclu de l'étude. Le groupe comportait donc 34 sujets : 11 hommes et 23 femmes, soit un *sex ratio* à 0,33. L'âge moyen des sujets était 37 ans (21-62ans). La numération plaquettaire moyenne était 245 ± 48 G/l (155-338G/l). Concernant l'IPF, la valeur moyenne retrouvée était $1,8 \pm 1,2\%$ et les valeurs normales étaient comprises entre 0,4 et 6,8%.

II) Stabilité de l'IPF

Le tableau n°5 reprend les valeurs de la numération plaquettaire et de l'IPF à H0, H8 et H24 de la réception du prélèvement veineux, chez des patients présentant un chiffre de plaquettes normal (n=11) et une thrombopénie entre 50 et 150 G/l (n = 11) ou 0 et 50 G/l (n = 10). Les échantillons étaient conservés à température ambiante entre chaque passage. Lorsque les plaquettes étaient normales des différences significatives de numération d'IPF étaient observées entre H0 et H8 ($3,4 \pm 2,6$ et $2,9 \pm 2,6$; $p=0,009$) et entre H0 et H24 ($3,4 \pm 2,6$ et $4,2 \pm 3,8$; $p=0,03$). Pour les thrombopénies entre 50 et 150 G/l, il n'y avait pas différence significative entre H0 et H8 ($8,2 \pm 6$ et $7,7 \pm 6,1$; $p=0,17$), en revanche une différence significative existait entre H0 et H24 ($8,2 \pm 6$ et $9,4 \pm 7,1$; $p=0,02$). Concernant les thrombopénies entre 0 et 50 G/l, il n'y avait pas de différence significative de l'IPF entre H0 et H8 (9 ± 5 et 10 ± 7 ; $p=0,61$) et entre H0 et H24 (9 ± 5 et $9,8 \pm 7,1$; $p=0,85$)

Ainsi selon nos données, la mesure de l'IPF est d'autant plus stable que la thrombopénie est sévère, les chiffres d'IPF étant plus élevés. On peut donc considérer que le paramètre est stable jusqu'à 8 heures après le prélèvement. Cependant lors des thrombopénies sévères, ce paramètre peut être ajouté un peu plus tardivement après discussion avec le biologiste.

Tableau n° 5 : Valeurs de la numération plaquettaire et de l'IPF à H0, H8, H24 de la réception du prélèvement au laboratoire.

	PLAQUETTES (G/l)			IPF (%)		
	H0	H8	H24	H0	H8	H24
Plaquettes normales (n = 11)	260 ± 42	262 ± 43	265 ± 38	3,4 ± 2,6	2,9 ± 2,6	4,2 ± 3,8
Thrombopénie 50-150 G/l (n = 11)	87 ± 26	86 ± 27	90 ± 28	8,2 ± 6	7,7 ± 6,1	9,4 ± 7,1
Thrombopénie 0-50 G/l (n = 10)	25 ± 11	25 ± 11	26 ± 15	9 ± 5	10 ± 7	9,8 ± 7,1

Les données sont rendues en moyennes ± écarts type. IPF = *Immature Platelet Fraction*.

III) Définition des groupes thrombopéniques

1- Caractéristiques de la population analysée

L'étude a porté sur 117 patients : 67 dans le groupe des thrombopénies périphériques et 46 dans celui des thrombopénies centrales (tableau n°6).

1.1- Groupe des thrombopénies périphériques

Le groupe de thrombopénies périphériques comprenait 27 femmes et 40 hommes soit un *sex ratio* de 1,5. La moyenne d'âge des patients était de 57 ans (1 an à 93 ans). Ce groupe comprenait 5 patients âgés de moins de 15 ans (n=5/67, 7%) et 32 patients âgés de 65 ans et plus (n=32/67, 47%). La majorité des patients (n=52/67, 77%) provenaient de 4 services : la médecine interne (n=25/67, 38%), la réanimation médicale (n=16/67, 24%), l'hémato-oncologie pédiatrique (HOP) (n=5/67, 7%) et l'hépto-gastro-entérologie (HGE) (n=6/67, 8%).

1.2- Groupe des thrombopénies centrales

Le groupe de thrombopénies centrales comprenait 12 femmes et 34 hommes soit un *sex ratio* de 2,8. La moyenne d'âge des patients était de 55 ans (2 ans à 93 ans), ce groupe comprenait 4 patients âgés de moins de 15 ans (n=4/46, 9%) et 21 patients âgés de 65 ans et plus (n=21/46, 46%).

Les patients provenaient principalement des services de médecine interne (n=11/46, 24%), d'autres services de médecine (pneumologie, dermatologie,...) (n=8/46, 17%), du centre de lutte contre le cancer Henri Becquerel (CLCCHB) (n=5/46, 11%), de la réanimation médicale (n=4/46, 9%), de l'HGE (n=4/46, 9%) et de l'HOP (n=3/46, 7%).

Tableau n°6 : Caractéristiques de la population de l'étude

	Groupe TP	Groupe TC
Nombre de patients	67	46
Sexe, <i>sex ratio</i>	27 femmes / 40 hommes, 1,5	12 femmes / 34 hommes, 2,8
Age, année : moyenne (min-max)	57 (1-93)	55 (2-93)

TP : thrombopénies périphériques; TC : thrombopénies centrales

Au total, nos deux groupes étaient équivalents en termes d'âge des patients mais le groupe des thrombopénies centrales comportait une prédominance d'hommes.

2- Les étiologies des thrombopénies

2.1- Groupe des thrombopénies périphériques

Diverses étiologies de thrombopénies périphériques ont été retrouvées : 15 patients présentaient un hypersplénisme (n=15/67, 22%), une MAT a été diagnostiquée chez 4 patients (n=4/67, 6%). Chez 5 patients (n=5/67, 8%), une cause médicamenteuse a été retrouvée, un PTI a été diagnostiqué chez 38 patients (n=38/67, 57%) et un seul patient présentait une CIVD (n=1/67, 1%). Chez 3 patients, l'étiologie de la thrombopénie périphérique n'a pas été déterminée (n=3/67, 5%) et pour un patient de réanimation, l'étiologie de la thrombopénie était multifactorielle (n=1/67, 1%) (Figure n°17).

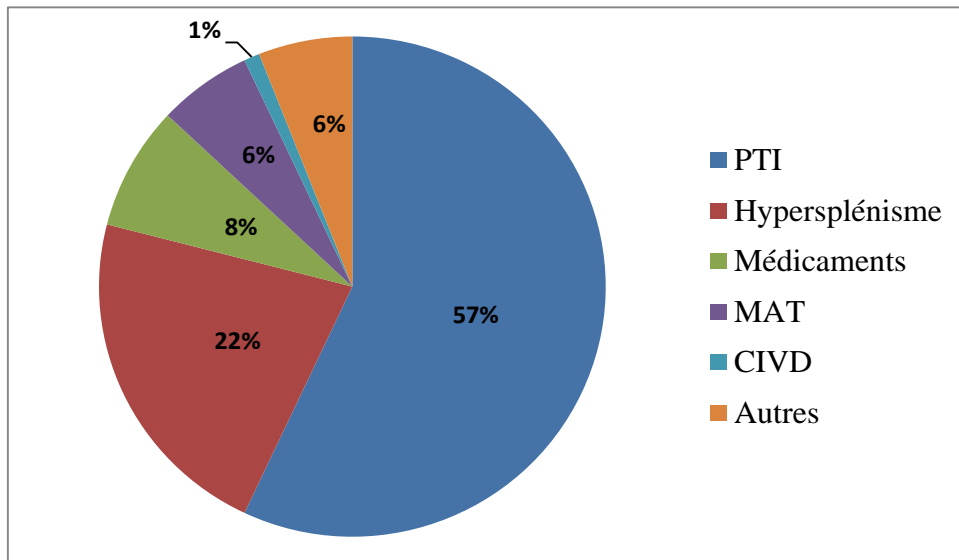


Figure n°17 : Répartition des patients selon l'étiologie de la thrombopénie périphérique.

Au total, on retrouvait une nette prédominance du PTI dans ce groupe des thrombopénies périphériques, puisqu'il représente plus d'une thrombopénie sur deux. L'étude des thrombopénies périphériques équivaut donc principalement à étudier le PTI.

2.2- Groupe des thrombopénies centrales

Les étiologies des thrombopénies centrales étaient chez 19 patients (n=19/46, 42%) l'envahissement médullaire par les métastases d'un cancer solide. Chez 17 patients (n=17/46, 37%) il s'agissait d'une carence vitaminique (vitamine B12 ou folates). Huit patients (n=8/46, 17%) présentaient une aplasie médullaire. Enfin chez 2 patients (n=2/46, 4%), un syndrome d'activation macrophagique avait été diagnostiqué (figure n°18).

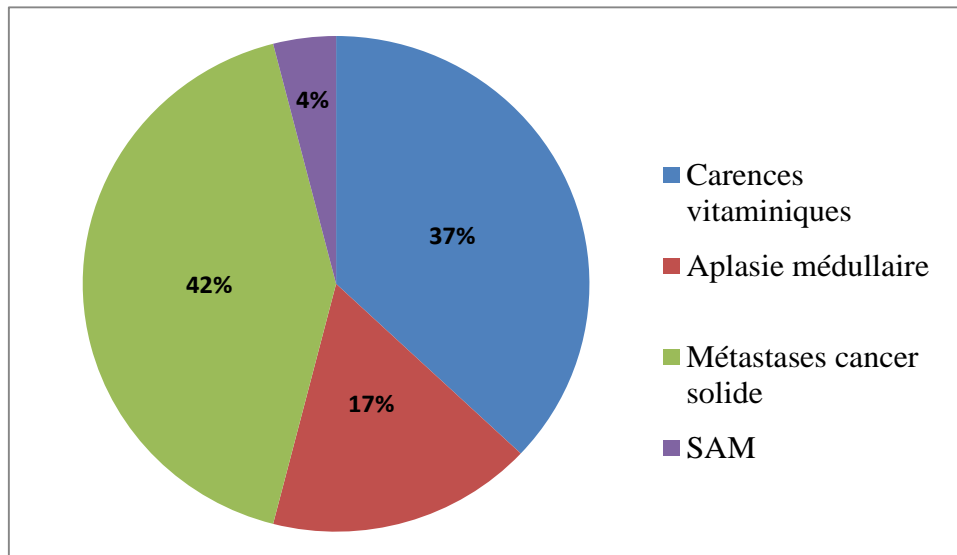


Figure n°18 : Répartition des patients selon les étiologies de la thrombopénie centrale.

Ainsi les étiologies des thrombopénies centrales sont plus équilibrées, puisqu'on a retrouvé environ 1/3 de cancers, 1/3 de carences vitaminiques et 1/3 d'autres étiologies. L'étude des thrombopénies centrales nécessite donc de s'intéresser à ses différentes étiologies.

3- Caractéristiques de l'hémogramme

3.1- Groupe des thrombopénies périphériques

La thrombopénie était isolée chez 31 patients (n=31/67, 46%). Une bicytopenie était retrouvée chez 32 patients (n=32/67, 48%) dans la majorité des cas (27 patients) il s'agissait d'une anémie associée à la thrombopénie. Enfin une pancytopenie était observée chez 4 patients (n=4/67, 6%) présentant tous un hypersplénisme (figure n°19).

Ainsi les thrombopénies périphériques sont dans la moitié des cas des thrombopénies isolées.

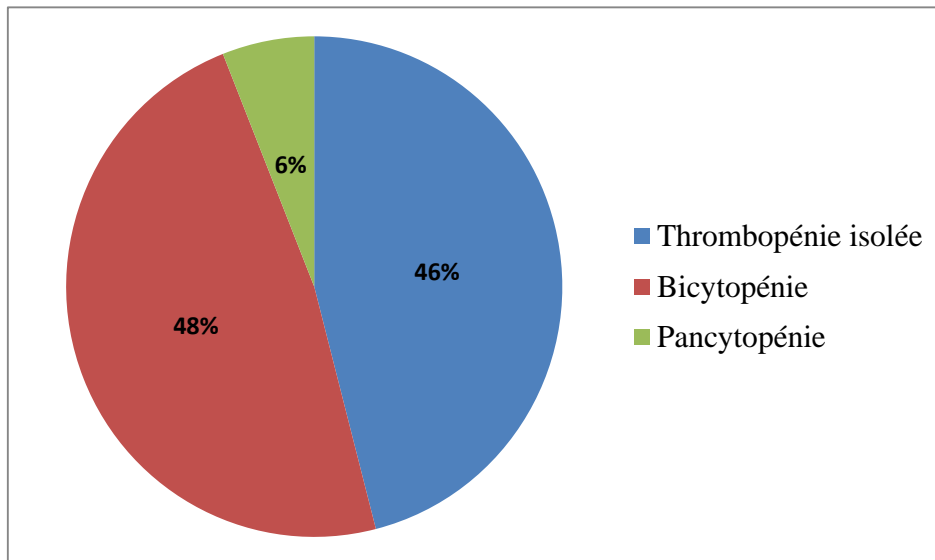


Figure n°19 : Répartition des patients du groupe des thrombopénies périphériques selon les cytopénies retrouvées à l'hémogramme. Bicytopénie correspond à la présence d'une thrombopénie associée à une anémie ou une neutropénie. Pancytopénie correspond à l'association d'une thrombopénie, d'une anémie et d'une neutropénie.

3.2- Groupe des thrombopénies centrales

Chez les patients du groupe des thrombopénies centrales, la thrombopénie était isolée chez seulement 3 patients ($n=3/46$, 6%), 2 patients présentaient des métastases médullaires de cancers solides et un patient avait un syndrome d'activation macrophagique.

Une bicytopénie était retrouvée chez 34 patients ($n=34/46$, 73%), il s'agissait d'une anémie associée à une thrombopénie chez 33 patients, une thrombopénie avec une neutropénie était mise en évidence chez seulement un patient. Enfin une pancytopénie était retrouvée chez 10 patients ($n=10/46$, 21%) (figure n°20).

Ainsi les thrombopénies centrales sont le plus souvent associées à une anémie et ne sont que rarement retrouvées isolées.

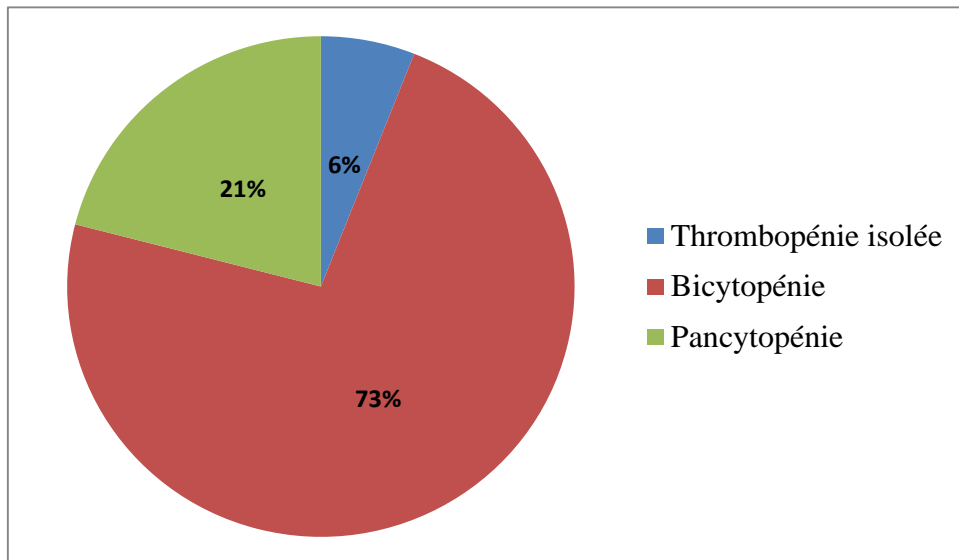


Figure n° 20 : Répartition des patients du groupe des thrombopénies centrales selon les cytopénies retrouvées à l'hémogramme.

Bicytopénie correspond à la présence d'une thrombopénie associée à une anémie ou une neutropénie. Pancytopénie correspond à l'association d'une thrombopénie, d'une anémie et d'une neutropénie.

VI) Valeur de la numération plaquettaire et de l'IPF

1- Groupe contrôle

Pour rappel, dans le groupe des patients contrôle, la numération plaquettaire moyenne était 245 ± 48 G/l (155-338G/l). Concernant l'IPF, la valeur moyenne retrouvée était $1,8 \pm 1,2\%$ et les valeurs normales étaient comprises entre 0,4 et 6,8%.

2- Groupe thrombopénies périphériques

La numération plaquettaire moyenne des patients présentant une thrombopénie périphérique était 42 ± 36 G/l (6-141G/l). La valeur moyenne de l'IPF était alors de $11,9 \pm 8,7\%$ (1,8-43,3%). Dans le sous-groupe PTI, la numération plaquettaire moyenne était de 22 ± 21 G/l (6-98G/l) et la numération moyenne de l'IPF était de $14 \pm 9,8$ (3,6-43,3%). Dans le second sous-groupe

contenant les autres étiologies de thrombopénie périphérique, la numération plaquettaire moyenne était de 66 ± 37 G/l (6-141G/l) et de l'IPF : $9 \pm 5\%$ (1,8-25,6%).

3- Groupe thrombopénies centrales

La numération plaquettaire moyenne des patients présentant une thrombopénie centrale était 54 ± 34 G/l (6-136G/l). La valeur moyenne de l'IPF était alors de $6,9 \pm 4,8\%$ (1,1-18,5%). Dans le sous-groupe des carences vitaminiques la numération plaquettaire moyenne était de 73 ± 33 G/l (23-136G/l) et l'IPF moyen de $5,8 \pm 2,8\%$ (2,4-13,2%). Dans le deuxième sous-groupe contenant les autres étiologies de thrombopénie centrale, la numération plaquettaire moyenne était de 42 ± 31 G/l (6-115G/l) et l'IPF moyen de $7,5 \pm 5,6$ (1,1-18,5) (tableau n°7).

Tableau n°7 : Valeurs de la numération plaquettaire et de l'IPF dans les groupes contrôle, thrombopénies centrales et thrombopénies périphériques.

	PLAQUETTES (G/l)	IPF (%)
Groupe Contrôle	245 ± 48	1,8 ± 1,2
Groupe TC	54 ± 34	6,9 ± 4,8
Sous-groupe carences vitaminiques	73 ± 33	5,8 ± 2,8
Sous-groupe autres étiologies centrales	42 ± 31	7,5 ± 5,6
Groupe TP	42 ± 36	11,9 ± 8,7
Sous-groupe PTI	22 ± 21	14 ± 9,8
Sous-groupe autres étiologies périphériques	66 ± 37	9 ± 5

TC : Thrombopénies centrales; TP : Thrombopénies périphériques. PTI : Purpura thrombopénique immunologique

V) Analyse comparative des numérations plaquettaires selon les groupes de patients

La moyenne des numérations plaquettaires est significativement plus haute dans le groupe des thrombopénies centrales par rapport à celle des thrombopénies périphériques (54 ± 34 vs 42 ± 31 G/l; $p=0,01$).

Dans le groupe des thrombopénies centrales, le sous-groupe des carences vitaminiques a une moyenne de numérations plaquettaires significativement plus haute que celle du sous-groupe des autres étiologies centrales (73 ± 33 vs 42 ± 31 ; $p=0,003$). Le sous-groupe des carences vitaminiques a également une moyenne de numérations plaquettaires significativement plus haute que le groupe des thrombopénies périphériques (73 ± 33 vs 42 ± 36 ; $p<0,001$). En revanche, il n'existe pas de différence significative de numérations plaquettaires entre le sous-groupe des autres étiologies centrales et le groupe des thrombopénies périphériques.

Dans le groupe des thrombopénies périphériques, le sous-groupe PTI a une moyenne de numérations plaquettaires significativement plus basse que celle du sous-groupe des autres étiologies périphériques (22 ± 21 vs 66 ± 37 ; $p<0,001$). Le sous-groupe PTI a également une moyenne de numérations plaquettaires significativement plus basse que celle du groupe thrombopénies centrales (22 ± 21 vs 54 ± 34 ; $p<0,001$). En revanche, il n'existe pas de différence significative entre la moyenne des numérations plaquettaires du sous-groupe des autres étiologies périphériques et celle du groupe des thrombopénies centrales (66 ± 37 vs 54 ± 34 ; $p=0,13$).

VI) Analyse comparative de l'IPF selon les groupes de patients

Les moyennes de l'IPF des groupes thrombopénies centrales et périphériques sont significativement plus hautes que celle du groupe contrôle (respectivement $6,9 \pm 4,8$ et $11,9 \pm 8,7$ vs $1,8 \pm 1,2$; $p<0,001$ et $p<0,001$). La moyenne de l'IPF du groupe des thrombopénies périphériques est également significativement plus haute que celle du groupe des thrombopénies centrales ($11,9 \pm 8,7$ vs $6,9 \pm 4,8$; $p<0,001$) (figure n°21).

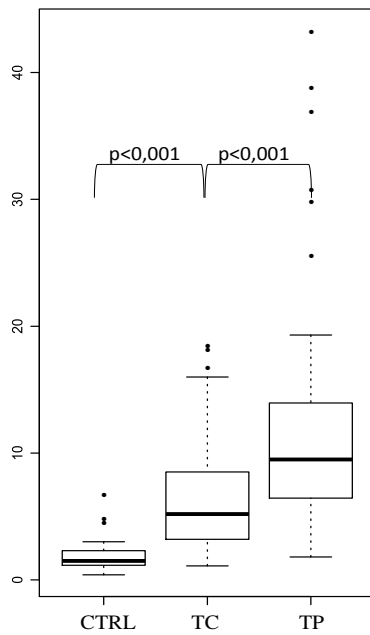


Figure n°21 : Box plot représentant l'IPF dans les groupes contrôles, thrombopénies centrales et thrombopénies périphériques.

CTRL: contrôle; TC : thrombopénies centrales; TP : thrombopénies périphériques.

Dans le groupe des thrombopénies centrales, il n'existe pas de différence significative entre la moyenne de l'IPF du sous-groupe des carences vitaminiques et celle des autres étiologies centrales ($5,8 \pm 2,8$ et $7,5 \pm 5,6$; $p= 0,88$). Ces deux sous-groupes ont une moyenne d'IPF significativement plus basse que celle du groupe des thrombopénies périphériques ($5,8 \pm 2,8$ et $7,5 \pm 5,6$ vs $11,9 \pm 8,7$; $p<0,001$ et $p=0,003$) (figure n°22).

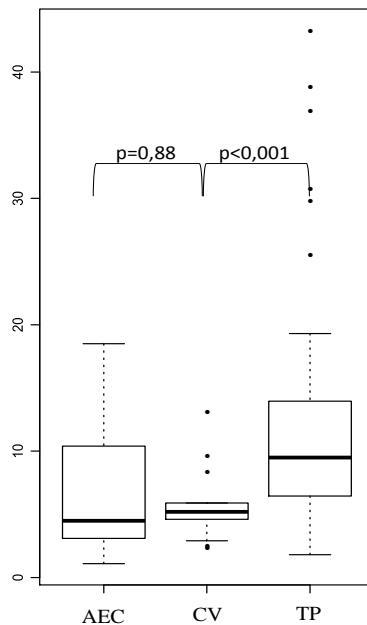


Figure n°22 : Box plot représentant l'IPF des sous-groupes des carences vitaminiques et des autres étiologies centrales et du groupe thrombopénies périphériques.

AEC : autres étiologies centrales; CV : carences vitaminiques; TP : thrombopénies périphériques.

Dans le groupe des thrombopénies périphériques, la moyenne de l'IPF du sous-groupe PTI est significativement plus haute que celle du sous-groupe des autres étiologies périphériques ($14 \pm 9,8$ vs 9 ± 5 ; $p=0,01$). Ces deux sous-groupes ont une moyenne d'IPF significativement plus haute que celle du groupe des thrombopénies centrales ($14 \pm 9,8$ et 9 ± 5 vs $6,9 \pm 4,8$; $p<0,001$ et $p=0,02$) (figure n°23).

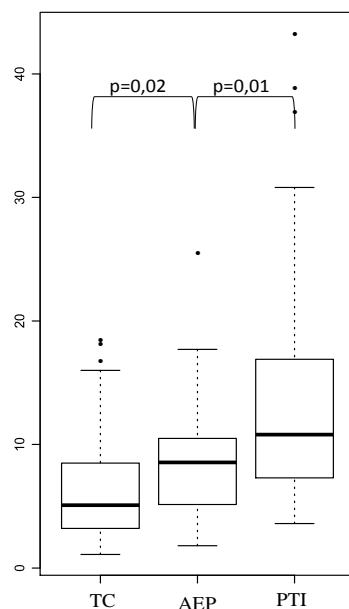


Figure n°23 : Box plot représentant l'IPF des sous-groupes du PTI et des autres étiologies périphériques et du groupe thrombopénies centrales.

AEP : autres étiologies périphériques; PTI : purpura thrombopénique immunologique; TC: thrombopénies centrales.

VIII) Analyse comparative des groupe de patients en fonction de la numération plaquettaire

Nous avons ensuite voulu étudier si les différences significatives entre les groupes, retrouvées précédemment dépendaient de la numération plaquettaire de chaque groupe. Nous avons donc analysé les groupes en les séparant en fonction de leur numération plaquettaire.

- Ainsi lorsque la numération plaquettaire était inférieure à 50G/l : le groupe des thrombopénies centrales comprenait 24 patients, celui des thrombopénies périphériques 49 patients et le sous-groupe PTI comprenait 35 patients.

→ La moyenne des numérations plaquettaires n'était pas significativement différente entre les groupes thrombopénies centrales et périphériques (26 ± 13 vs 22 ± 14 ; $p= 0,14$). En

revanche la moyenne des numérations plaquettaires du sous-groupe PTI était significativement plus basse que celle du groupe des thrombopénies centrales (17 ± 12 vs 26 ± 13 ; $p=0,007$).

→ La moyenne de l'IPF du groupe des thrombopénies périphériques restait significativement plus haute que celle des thrombopénies centrales ($13,6 \pm 8,7$ vs $8,3 \pm 5,8$; $p=0,003$). De la même façon celle du sous-groupe PTI restait significativement plus haute que celle des thrombopénies centrales ($14,6 \pm 10$ vs $8,3 \pm 5,8$; $p=0,005$) (figure n°24).

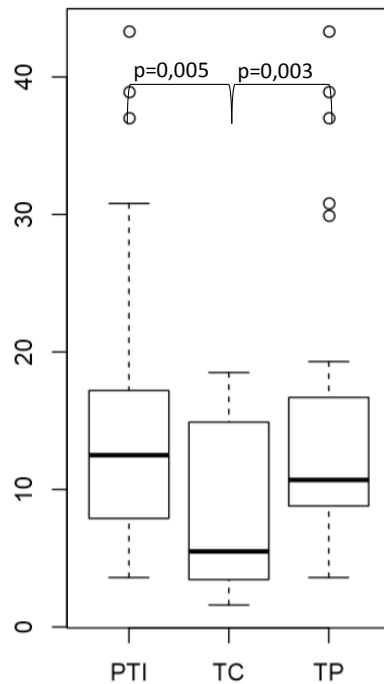


Figure n°24 : Box plot représentant l'IPF dans les groupes des thrombopénies centrales et périphériques et du sous-groupe PTI lorsque la numération plaquettaire est inférieure à 50G/l.

PTI : purpura thrombopénique immunologique ; TC : thrombopénies centrales; TP : thrombopénies périphériques.

- Lorsque les plaquettes étaient supérieures à 50G/l : le groupe des thrombopénies centrales comprenait 22 patients et celui des thrombopénies périphériques 18 patients. Le sous-groupe PTI ne contenant alors seulement que 2 patients, n'a pas pu être étudié.

→ Il n'a pas été mis en évidence de différence significative entre les moyennes de la numération plaquettaire des groupes thrombopénies centrales et périphériques (83 ± 25 vs 92 ± 24 ; $p=0,24$), ni entre les moyennes de l'IPF ($5,3 \pm 2,9$ vs 7 ± 5 ; $p=0,3$) (figure n°25).

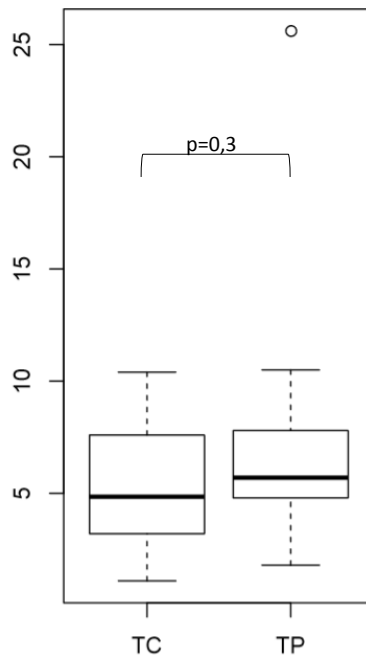


Figure n°25 : Box plot représentant l'IPF dans les groupes des thrombopénies centrales et périphériques lorsque la numération plaquettaire est supérieure à 50G/l.

TC : thrombopénies centrales; TP : thrombopénies périphériques.

IX) Valeurs optimales de l'IPF pour distinguer l'origine de la thrombopénie

Nous avons ensuite voulu déterminer la valeur seuil optimale permettant de distinguer les thrombopénies centrales des thrombopénies périphériques et les PTI des autres thrombopénies. Pour cela nous avons utilisé des courbes ROC de sensibilité et spécificité.

Un IPF à 9,8% a été retrouvé comme le seuil optimal permettant de distinguer les thrombopénies d'origine périphérique, de celles d'origine centrale avec une sensibilité de 46% et une spécificité de 80%, et une aire sous la courbe (AUC) de 0,73 (IC95=[0,62 ; 0,82]; $p < 0,0001$) (figure n°26). Ainsi un IPF supérieur ou égal à 9,8% oriente vers une étiologie périphérique de la thrombopénie.

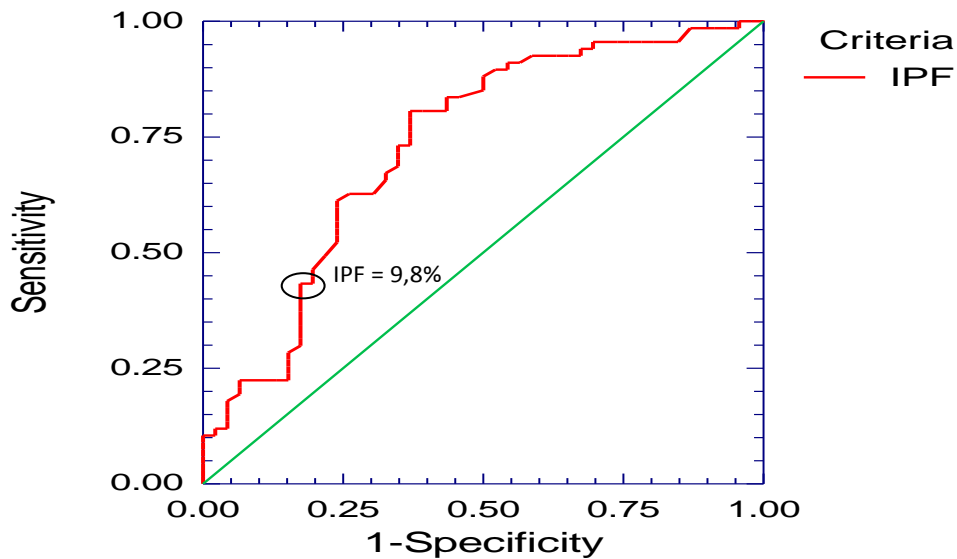


Figure n°26 : Courbe ROC de sensibilité et spécificité permettant de distinguer une thrombopénie d'origine périphérique, d'une thrombopénie d'origine centrale. La valeur cut-off de l'IPF (indiquée par un cercle) est 9,8%, avec une sensibilité de 46% et une spécificité de 80%.

Un IPF à 10,7% a été retrouvé comme la valeur optimale permettant de distinguer les PTI des autres thrombopénies (thrombopénies centrales et autres étiologies périphériques) avec une sensibilité à 55%, une spécificité à 81% et une aire sous la courbe (AUC) à 0,74 (IC95=[0,64 ; 0,82]; $p < 0,0001$) (figure n°27). Ainsi un IPF supérieur ou égal à 10,7% est en faveur d'un PTI.

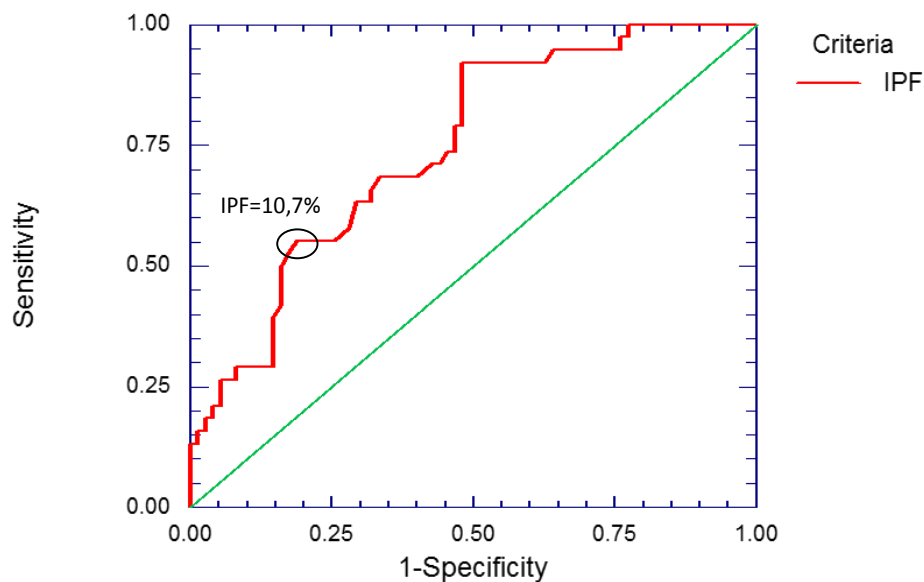


Figure n°27 : Courbe ROC de sensibilité et spécificité pour distinguer le PTI des autres thrombopénies (thrombopénies centrales et autres étiologies des thrombopénies périphériques). La valeur cut-off de l'IPF (indiquée par un cercle) est 10,7%, avec une sensibilité de 55% et une spécificité de 81%.

IX) Groupe des thrombopénies constitutionnelles

Ce groupe se compose de 9 patients : 3 femmes et 6 hommes, soit un sex ratio à 2. Il s'agissait de 3 patients présentant des thrombopénies constitutionnelles non étiquetées et de 6 patients présentant un syndrome MYH9. La numération plaquettaire moyenne était de 59 G/l (34-104 G/l) et la moyenne de l'IPF était de 30% (2,8-70,1%). Lorsqu'on ne prend en compte que les cas présentant un syndrome MYH9, soit 6 patients, la moyenne de l'IPF augmente à 44,5% avec une valeur minimale à 17,9% et maximale à 70,1%.

Ainsi dans le groupe des thrombopénies constitutionnelles et principalement lors du diagnostic de syndrome MYH9, la moyenne de l'IPF est retrouvée considérablement augmentée. Celle-ci est plus de 3 fois supérieure à celle du PTI.

Au total, nous avons donc mis en évidence une augmentation significative de l'IPF lors des thrombopénies, l'importance de cette augmentation dépend de l'origine de la thrombopénie. Lors des thrombopénies d'origine périphérique, l'augmentation de l'IPF est significativement plus importante que lors de celles d'origine centrale. Un IPF supérieur à 9,8% permet d'orienter vers une origine périphérique avec une sensibilité de 46% et une spécificité de 80% alors qu'un IPF supérieur à 10,7% est en faveur d'un PTI avec une sensibilité de 55% et une spécificité de 81%. De plus, l'IPF est retrouvé fortement augmenté lors des thrombopénies constitutionnelles de type MYH9. Celui-ci pourrait donc être utilisé comme un argument de plus dans la stratégie diagnostique de cette pathologie.

Discussion

La mesure de l'IPF, proposée sur l'automate Sysmex XE 5000, est apparue comme une avancée biologique prometteuse car elle permet une évaluation de la fraction immature des plaquettes de façon simple, rapide et standardisée, en même temps que la numération des paramètres de l'hémogramme.

Ces dernières années, de nombreux travaux ont été publiés sur l'intérêt de l'IPF dans différentes circonstances cliniques. Cependant, aucun consensus n'existe concernant ses valeurs de référence dans la population générale.

Ainsi dans notre étude, nous avons défini une moyenne normale de l'IPF à 1,8% avec des valeurs allant de 0,4 à 6,8%. Notre résultat correspond à ce qui a été retrouvé dans les différentes études sur l'IPF, les moyennes allant de 1,2 à 3,5% avec des valeurs allant de 0,2 à 10,3%. Notre chiffre est assez proche de celui retrouvé dans l'étude française menée par Cannavo *et al*, de 2,2% (56). Cette moyenne se rapproche également des résultats retrouvés dans les deux études Coréennes menées par Ko et Jung qui étaient respectivement de 1,3 et 1,2% pour des effectifs de plus de 2000 sujets (respectivement 2152 et 2039) (50)(48). Cependant la population utilisée pour effectuer nos valeurs normales était assez limitée (N=30 personnes) et elle contenait une importante majorité de femmes (23 femmes sur 34). Néanmoins, toutes les études ne s'accordent cependant pas sur l'influence du sexe sur les valeurs de l'IPF (48)(50).

Concernant la stabilité de ce paramètre, notre étude a permis de mettre en évidence des variations de stabilité de l'IPF en fonction de la numération plaquettaire et donc du taux d'IPF. La mesure de l'IPF était d'autant plus stable que la thrombopénie était sévère, les chiffres d'IPF étant alors plus élevés. Lors d'une thrombopénie, on peut considérer que le paramètre est stable jusqu'à 8 heures après le prélèvement, ce qui correspond aux données de la littérature (48)(56). Cela suggère donc que l'analyse doit être effectuée rapidement après le prélèvement, dans un délai de 8 heures. Cependant lors des thrombopénies sévères, ce paramètre peut être ajouté un peu plus tardivement après discussion avec le biologiste. Le prélèvement doit de plus, être conservé à température ambiante. En effet, une conservation des prélèvements à basse température entraînerait une augmentation importante de l'IPF probablement en lien avec une libération d'ARNm par dégradation des plaquettes (66). En pratique, le biologiste désirant ajouter la recherche d'IPF à une analyse doit donc s'assurer du délai entre le prélèvement et la détermination de l'IPF. Ce délai d'analyse est beaucoup plus court que pour les réticulocytes, puisque dans notre laboratoire, la détermination des réticulocytes peut être ajoutée jusqu'à 24h

après le prélèvement. De la même façon la numération plaquettaire peut être faite jusqu'à 12 heures après le prélèvement. L'élévation de l'IPF au cours du temps peut être reliée à la nature instable de l'ARNm des plaquettes ainsi qu'au fait que le fluorochrome polyméthine ne se fixerait pas alors de façon spécifique à l'ARNm des plaquettes. En effet, il est possible que celui-ci se fixe également à d'autres éléments plaquettaires (66), cependant ceci n'a pas été clairement établi et nécessiterait des études complémentaires.

En tenant compte de ces données sur les valeurs normales et de la stabilité de ce paramètre, nous avons évalué celui-ci dans deux groupes de patients présentant des thrombopénies selon leur origine : périphérique ou centrale.

Nos deux groupes étaient assez similaires en termes de population, bien que celui des thrombopénies d'origine centrale comptait une majorité plus importante d'hommes.

Concernant l'hémogramme, nous retrouvons logiquement que le groupe des thrombopénies centrales présentait moins de thrombopénies isolées et plus de pancytopénies par rapport au groupe périphérique. En effet les étiologies centrales entraînent le plus fréquemment une atteinte de l'ensemble des lignées sanguines. Les numérations plaquettaires des thrombopénies centrales étaient en moyenne plus hautes que celles du groupe périphérique et du sous-groupe PTI.

Pour le groupe des thrombopénies centrales, la moyenne de l'IPF a été retrouvée à 6,9%, ce qui semble un peu en dessous des données de la littérature. L'étude menée par Pons retrouvait une moyenne à 8,64% pour un groupe de thrombopénies centrales mais comprenant de nombreuses étiologies (toxicité de chimiothérapies, syndromes myélodysplasiques, infiltrations médullaires d'une hémopathie maligne ou d'une tumeur solide et aplasies médullaires) (57). Par ailleurs, Cannavo retrouvait 11,9% dans un groupe composé uniquement de leucémies aiguës (56) et dans la cohorte pédiatrique de Strauss, la moyenne de l'IPF des patients atteints de leucémie aiguë lymphoblastique était de 10% (54). Jung a, quant à lui, retrouvé une moyenne de l'IPF plus basse à 3,5%, cependant son étude portait uniquement sur les aplasies médullaires (48) et Abe avait une moyenne d'IPF de 6,4% pour un groupe composé également d'aplasie médullaire (51). Notre population de thrombopénies centrales se distingue ainsi de celles des différentes études effectuées puisque nous n'avons pas pu inclure de leucémies aiguës et que les aplasies médullaires représentaient moins de 20% de notre population. Notre groupe comprenait également 1/3 de cancers et 1/3 de carences vitaminiques avec notamment des carences aiguës en folates, provenant du service de réanimation, qui n'ont jusqu'à présent pas fait l'objet d'étude concernant l'IPF.

Pour les thrombopénies périphériques, la moyenne de l'IPF retrouvée dans notre étude était de 11,9%, avec pour le sous-groupe PTI, une moyenne à 14%. Celle-ci atteignait 14,6% lorsqu'on ne prenait en compte que les patients présentant une thrombopénie inférieure à 50G/l. Concernant les autres étiologies périphériques, la moyenne était de 9%. Nos chiffres sont inférieurs à ce qui a été mis en évidence dans la majorité des publications. Briggs obtenait une moyenne de l'IPF à 16,8% lors de PTI (49), tandis que Cavanno retrouvait 15,8% (56). Pons, quant à lui, a mis en évidence une moyenne à 16,8% pour son groupe de thrombopénies par destruction périphérique comprenant les PTI, les syndromes d'Evans, les thrombopénies auto-immunes secondaires et les CIVD (57). Abe a retrouvé, pour sa part, une moyenne de 17,4% dans son groupe PTI (51). En revanche l'étude de Jung retrouvait une moyenne d'IPF plus basse à 7,7% dans son groupe PTI (48).

Nous avons donc par la suite, évalué l'IPF dans les groupes de thrombopénies centrales et périphériques par rapport à notre groupe contrôle utilisé pour les valeurs normales afin de valider les différences de moyennes obtenues entre les groupes.

Ainsi l'IPF était significativement augmenté dans les deux groupes des thrombopénies par rapport au groupe contrôle ($6,9 \pm 4,8$ et $11,9 \pm 8,7$ vs $1,8 \pm 1,2$; $p < 0,001$ et $p < 0,001$). Ce résultat concorde avec les données de la littérature. Ainsi, cela suggère que la variation de l'IPF est assez différente de celle des réticulocytes. Car contrairement aux réticulocytes, l'IPF est augmenté aussi bien dans les causes centrales que périphériques de thrombopénie (figure n°28). Cependant, l'IPF dans le groupe de thrombopénies périphériques était significativement plus élevé que celui du groupe des thrombopénies centrales ($11,9 \pm 8,7$ vs $6,9 \pm 4,8$; $p < 0,001$). Cette différence persiste lorsque l'on compare ces deux groupes en fonction de la numération plaquettaire lorsque celle-ci est inférieure à 50G/l ($13,6 \pm 8,7$ vs $8,3 \pm 5,8$; $p = 0,003$). En revanche lorsque les plaquettes étaient supérieures à 50G/l, il n'y avait plus de différence significative ($5,3 \pm 2,9$ vs 7 ± 5 ; $p = 0,3$). Il semblerait donc que ce paramètre soit surtout intéressant à utiliser en cas de thrombopénie franche voire sévère.

Enfin, pour le sous-groupe PTI, la moyenne de l'IPF était statistiquement plus haute que celle du groupe des thrombopénies centrales et du sous-groupe des autres thrombopénies périphériques ($6,9 \pm 4,8$ et 9 ± 5 vs $14 \pm 9,8$; $p = 0,01$ et $p < 0,001$). Ces différences significatives correspondent à ce qui est retrouvé dans la littérature (57)(51)(49)(54)(48).

Cette différence entre le sous-groupe PTI et le groupe des thrombopénies centrales est d'autant plus importante lorsqu'on ne considère que les patients présentant une numération plaquettaire inférieure à 50G/l ($14,6 \pm 10$ vs $8,3 \pm 5,8$; $p = 0,005$).

Ainsi l'IPF apparaît comme un bon marqueur pour le diagnostic étiologique des thrombopénies car il permet de différencier celles d'origine centrale par rapport à celles périphériques et surtout il permet de conforter le diagnostic de PTI lorsque sa valeur est fortement élevée. Ce paramètre permet une première orientation diagnostique, notamment en cas de thrombopénie profonde à sévère lorsque le diagnostic doit être fait rapidement. Par contre, son utilisation semble plus discutable en cas de thrombopénie modérée puisque nous n'avons pas retrouvé dans notre étude de différence significative entre les groupes des thrombopénies centrales et les périphériques. Néanmoins, son utilisation semble limitée pour les patients hospitalisés en réanimation présentant de multiples pathologies. En effet, dans notre étude, un patient de réanimation médicale transplanté rénal présentait de multiples étiologies à sa thrombopénie : une hémolyse mécanique, un SHU atypique, une toxicité médicamenteuse. Ce patient présentait un IPF normal à 2,7% avec une thrombopénie à 45G/l. Ce paramètre ne semble donc pas pouvoir être discriminant lorsque la pathologie présentée par le patient est multifactorielle.

Cette étude nous a également permis de définir un seuil à 9,8% permettant de différencier les thrombopénies périphériques, des centrales. Ainsi un IPF supérieur à 9,8%, nous oriente vers une origine périphérique de la thrombopénie. Selon la même démarche, nous avons ensuite également essayé de trouver une valeur optimale de l'IPF pour différencier le diagnostic de PTI des autres étiologies. Un IPF à 10,7% a été retrouvé comme valeur seuil. Ainsi un IPF supérieur à 10,7% est en faveur d'un PTI. Seulement deux études dans la littérature se sont intéressées à la mise en place de seuil, il s'agit de celles de Jung et Abe qui retrouvaient respectivement une valeur de l'IPF optimale à 7,3% et 7,7% (48)(51). Cependant ces cut-off permettaient dans ces études de différencier le diagnostic de PTI, de celui des thrombopénies centrales par aplasie médullaire, ce qui ne correspond pas totalement à notre population d'étude.

Enfin, l'étude du groupe des thrombopénies constitutionnelles nous a permis de mettre en évidence une importante augmentation de l'IPF, principalement lors des syndromes MYH9. Dans notre étude, la moyenne de l'IPF des patients MYH9 était de 44,5% (17,9-70,1%), soit une moyenne plus de 3 fois supérieure à celle des patients atteints de PTI (14%). Ces résultats corroborent ceux d'une étude parue en Juin 2015 du japonais Miyazaki qui s'intéressait aux valeurs de l'IPF lors des macrothrombocytopenies par rapport à celles lors de PTI (67). En comparaison à celle retrouvée lors de PTI, la moyenne de l'IPF est retrouvée plus élevée chez les patients présentant un syndrome MYH9 et une macrothrombocytopenie, respectivement multipliée par 5 et 2. Cette forte augmentation de l'IPF peut s'expliquer par le défaut de

maturation des plaquettes qui peut exister dans le syndrome MYH9. Ainsi l'IPF pourrait être un très bon marqueur pour le dépistage des thrombopénies constitutionnelles à macroplaquettes et principalement pour le syndrome MYH9. Une étude prospective avec un nombre plus important de patients pourrait permettre de trouver une place à ce marqueur dans la stratégie diagnostic des syndromes MYH9, en complément des analyses morphologiques (morphologie plaquettaire et recherche de corps de Döhle).

Ainsi, notre travail a permis de mettre en évidence une différence de variation de l'IPF lors des thrombopénies par rapport à celle des réticulocytes lors des anémies. En effet, lors d'une anémie, les réticulocytes sont retrouvés augmentés (>100 G/l) quand celle-ci est d'origine périphérique (hémolyse, hémorragie) alors qu'ils sont diminués (<100 G/l) lorsque l'anémie est d'origine centrale (carences vitaminiques, aplasie médullaire, envahissement médullaires,...). L'IPF est donc, quant à lui, augmenté lors de toutes thrombopénies et c'est l'intensité de cette augmentation qui variera en fonction de l'origine de la thrombopénie (figure n°28).

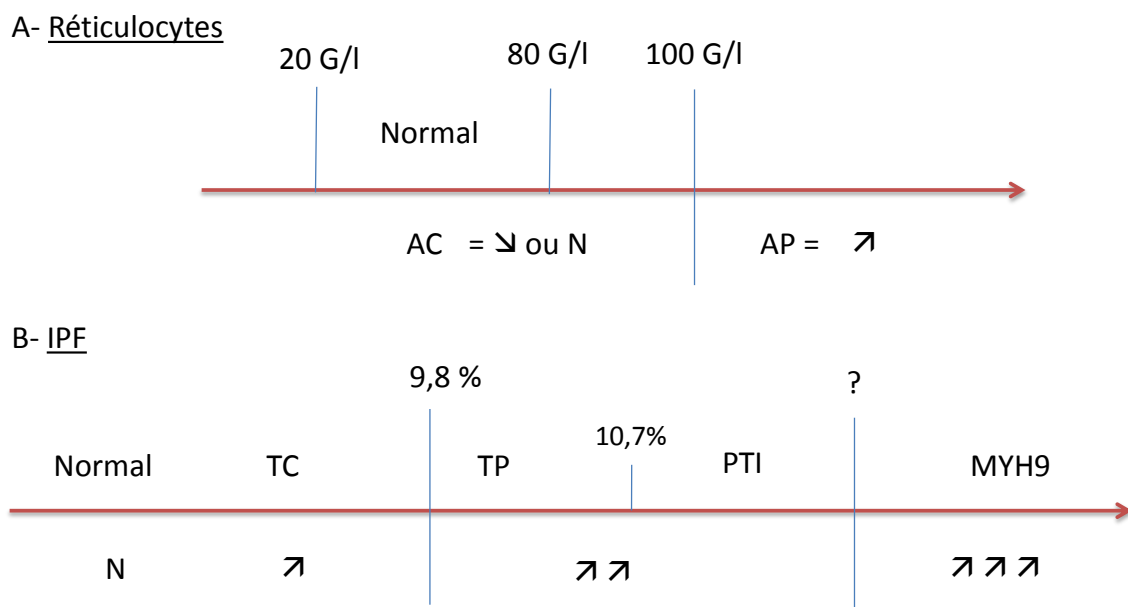


Figure n°28 : Représentation de la variation des réticulocytes en fonction de l'origine de l'anémie (A) et de l'IPF en fonction de l'origine de la thrombopénie (B).

AC : anémie d'origine centrale ; AP : anémie d'origine périphérique ; N : Normal ; PTI : purpura thrombopénique immunologique ; TC : thrombopénie d'origine centrale ; TP : thrombopénie d'origine périphérique.

Cependant notre étude présente quelques limites. Il s'agit d'une étude rétrospective dans laquelle, les patients ont donc été inclus a posteriori, ce qui a entraîné une perte importante de l'effectif analysable. En effet, tous n'avaient pas bénéficié de l'analyse « réticulocyte » nous

permettant de récupérer le résultat de l'IPF. Notre cohorte est donc assez limitée en termes d'effectif.

De même, les pathologies que nous avons étudiées ont été limitées par le fait que le centre de lutte contre le cancer Henri Becquerel possède son propre laboratoire de biologie médicale. De ce fait, les hémopathies malignes n'ont pas pu être incluses dans notre étude car nous ne possédions pas de bilan sanguin pour ces patients.

De plus, nos deux groupes de patients thrombopéniques présentaient des numérations plaquettaires significativement différentes. Ceci a possiblement entraîné un biais dans nos résultats. En effet, les numérations plaquettaires du groupe des thrombopénies périphériques étaient plus basses que celles du groupe des thrombopénies centrales. On peut supposer que la régénération plaquettaire était donc plus importante dans ce premier groupe entraînant de fait la présence accrue de plaquettes immatures et augmentant ainsi notre paramètre. Cette augmentation de l'IPF en lien avec la numération plaquettaire a donc probablement participé à la différence significative observée entre nos deux groupes.

Enfin, notre étude a été effectuée sur l'automate à numération Sysmex XE-5000 tandis que la plupart des publications de la littérature ont porté sur la génération d'automates précédente : le XE-2100. Cependant ces deux générations d'automates ne présentent pas de différence concernant le principe de mesure de la numération plaquettaire, ni concernant la mesure de l'IPF. Une nouvelle génération d'automate Sysmex, le XN-2000 est mise en service depuis quelques années. Cet automate possède un nouveau canal de mesure spécifiquement dédié à la numération des plaquettes; il s'agit du canal des plaquettes fluorescentes (PLT-F). Le principe de mesure utilisé est celui de la cytométrie de flux et ce canal utilise un fluorochrome (Fluorocell) développé pour ne marquer que les plaquettes. Celui-ci se fixe spécifiquement aux structures riches en acides nucléiques des plaquettes (ribosomes et mitochondries), ce qui élimine tout risque d'interférence avec d'autres cellules de même taille (notamment lors d'anomalies de taille des globules rouges). De plus le temps de comptage est prolongé (5 fois plus long) ce qui permet l'analyse d'un volume plus important de cellules diminuant ainsi l'imprécision des numérations notamment lors des thrombopénies sévères (68). L'IPF est mesuré dans ce nouveau canal et peu d'études ont été faites sur ce nouvel automate concernant ce paramètre. Le plus souvent celui-ci était comparé aux anciennes générations d'automates. Des études restent donc à faire afin de définir des valeurs normales sur cet automate et sur son utilisation lors des thrombopénies.

Conclusion

Ce travail a permis de définir localement les valeurs normales de l'IPF et le délai maximum d'évaluation de ce paramètre après prélèvement. Il reste néanmoins souhaitable de valider ces valeurs normales sur une plus grande cohorte.

D'un point de vue clinique, nous avons mis en évidence une augmentation systématique de l'IPF lors de toute thrombopénie. Cette augmentation est significativement plus importante lorsque la thrombopénie est d'origine périphérique en comparaison à une origine centrale. Une valeur de l'IPF supérieure à 9,8% orienterait vers une origine périphérique de la thrombopénie avec une sensibilité de seulement 46% mais une spécificité de 80%, ce qui pourrait en faire une analyse facilement disponible pour l'exploration étiologique des thrombopénies.

Le syndrome MYH9 est une entité rare mais probablement sous diagnostiquée. L'IPF est retrouvé très augmenté lors de cette pathologie, de 3 à 5 fois supérieur à celui des thrombopénies périphériques. Celui-ci pourrait donc être utilisé dans la stratégie de dépistage de ce syndrome. L'IPF semble ainsi être un bon marqueur du renouvellement plaquettaire. Cependant il faudrait effectuer d'autres études sur un plus grand nombre de patients et sur des populations ciblées afin de définir plus précisément des valeurs de référence et de déterminer les valeurs d'IPF les plus discriminantes pour aider au diagnostic étiologique des thrombopénies.

De la même façon, des études doivent être faites sur des cohortes plus importantes de patients présentant un syndrome MYH9, afin de mettre en place une stratégie d'aide au diagnostic de cette pathologie.

Au terme de ce travail, il apparaît donc que l'utilisation de ces nouveaux paramètres « recherches » est à définir plus précisément dans l'exploration des anomalies de l'hémogramme en raison de leur disponibilité immédiate, sans réel surcout, et de leur intérêt désormais démontré.

Bibliographie

1. Mullier F, Lainey E, Fenneteau O, Da Costa L, Schillinger F, Bailly N, et al. Additional erythrocytic and reticulocytic parameters helpful for diagnosis of hereditary spherocytosis: results of a multicentre study. *Ann Hematol.* juill 2011;90(7):759-68.
2. Furundarena JR, Araiz M, Uranga M, Sainz MR, Agirre A, Trassorras M, et al. The utility of the Sysmex XE-2100 analyzer's NEUT-X and NEUT-Y parameters for detecting neutrophil dysplasia in myelodysplastic syndromes. *Int J Lab Hematol.* 1 juin 2010;32(3):360-6.
3. Luo Y, Lin J, Chen H, Zhang J, Peng S, Kuang M. Utility of neut-X, neut-Y and neut-Z parameters for rapidly assessing sepsis in tumor patients. *Clin Chim Acta.* 25 juin 2013;422:5-9.
4. Kaushansky K. Determinants of platelet number and regulation of thrombopoiesis. *ASH Educ Program Book.* 1 janv 2009;2009(1):147-52.
5. Ingram M, Coopersmith A. Reticulated platelets following acute blood loss. *Br J Haematol.* sept 1969;17(3):225-9.
6. Hématologie clinique et biologique - Gérard Sébahoun -Editios Arnette-2^{ème} édition-02/2006
7. Cramer-Bordé E. Production plaquettaire : régulation cellulaire et moléculaire. *EMC - Hématologie.* janv 2008;3(1):1-10.
8. Patel SR, Hartwig JH, Italiano JE. The biogenesis of platelets from megakaryocyte proplatelets. *J Clin Invest.* déc 2005;115(12):3348-54.
9. Debili N, Kieffer N, Nakazawa M, Guichard J, Titeux M, Cramer E, et al. Expression of platelet glycoprotein Ib by cultured human megakaryocytes: ultrastructural localization and biosynthesis. *Blood.* 15 juill 1990;76(2):368-76.
10. Lepage A, Leboeuf M, Cazenave JP, de la Salle C, Lanza F, Uzan G. The alpha(IIb)beta(3) integrin and GPIb-V-IX complex identify distinct stages in the maturation of CD34(+) cord blood cells to megakaryocytes. *Blood.* 15 déc 2000;96(13):4169-77.
11. Kuter null. Thrombopoietin: Biology and Clinical Applications. *The Oncologist.* 1996;1(1 & 2):98-106.
12. Zandecki. Laboratoire d'Hématologie Cellulaire du CHU d'Angers [Internet]. [cité 28 août 2015]. Disponible sur: <http://hematocell.univ-angers.fr/index.php/enseignement-de-lhematologie-cellulaire/plaquettes-sanguines-et-leur-pathologie/24-physiologie-de-la-megacaryopoiese>
13. Zucker-Franklin D, Philipp CS. Platelet production in the pulmonary capillary bed: new ultrastructural evidence for an old concept. *Am J Pathol.* juill 2000;157(1):69-74.

14. Kaushansky K. Thrombopoietin: the primary regulator of platelet production. *Blood*. 15 juill 1995;86(2):419-31.
15. Kuter DJ. The physiology of platelet production. *Stem Cells Dayt Ohio*. 1996;14 Suppl 1:88-101.
16. Kuter DJ, Rosenberg RD. Appearance of a megakaryocyte growth-promoting activity, megapoietin, during acute thrombocytopenia in the rabbit. *Blood*. 1 sept 1994;84(5):1464-72.
17. Leverger G, Petit A, Fasola S, Landman-Parker J, Favier R. Les thrombopénies génétiques. *Arch Pédiatrie*. août 2010;17(8):1185-91.
18. Heath KE, Campos-Barros A, Toren A, Rozenfeld-Granot G, Carlsson LE, Savige J, et al. Nonmuscle myosin heavy chain IIA mutations define a spectrum of autosomal dominant macrothrombocytopenias: May-Hegglin anomaly and Fechtner, Sebastian, Epstein, and Alport-like syndromes. *Am J Hum Genet*. nov 2001;69(5):1033-45.
19. Schleinitz N, Favier R, Mazodier K, Difeo A, Ebbo M, Veit V, et al. Le syndrome MYH9 : à propos d'une nouvelle observation et de la mise en évidence d'une nouvelle mutation du gène MYH9. *Rev Médecine Interne*. oct 2006;27(10):783-6.
20. Canobbio I, Noris P, Pecci A, Balduini A, Balduini CL, Torti M. Altered cytoskeleton organization in platelets from patients with MYH9-related disease. *J Thromb Haemost JTH*. mai 2005;3(5):1026-35.
21. Althaus K, Greinacher A. MYH-9 Related Platelet Disorders: Strategies for Management and Diagnosis. *Transfus Med Hemotherapy Off Organ Dtsch Ges Transfusionsmedizin Immunhamatologie*. 2010;37(5):260-7.
22. Karras A, Hermine O. Hemophagocytic syndrome. *Rev Médecine Interne Fondée Par Société Natl Francaise Médecine Interne*. sept 2002;23(9):768-78.
23. Gruel Y, Rollin J, Leroux D, Pouplard C. Les thrombocytopénies induites par l'héparine : données récentes. *Rev Médecine Interne*. mars 2014;35(3):174-82.
24. Herbaux C. *KB Onco Hématologie*. Editions VG.
25. Aster RH, Bougie DW. Drug-induced immune thrombocytopenia. *N Engl J Med*. 9 août 2007;357(6):580-7.
26. Marret E, Ohana M, Gestion d'une thrombopénie en anesthésie. Disponible sur: http://www.sfar.org/acta/dossier/archives/ca06/html/ca06_06/ca06_06.htm
27. Kaplan C. Le purpura post-transfusionnel. *Hématologie*. 1 janv 2006;12(1):61-5.
28. Gernsheimer T. Chronic idiopathic thrombocytopenic purpura: mechanisms of pathogenesis. *The Oncologist*. janv 2009;14(1):12-21.
29. Rodeghiero F, Stasi R, Gernsheimer T, Michel M, Provan D, Arnold DM, et al. Standardization of terminology, definitions and outcome criteria in immune

- thrombocytopenic purpura of adults and children: report from an international working group. *Blood*. 12 mars 2009;113(11):2386-93.
30. Godeau B. Purpura thrombopénique immunologique : physiopathologie et traitement. *Transfus Clin Biol*. mai 2009;16(2):101-5.
 31. Audia S, Lorcerie B, Godeau B, Bonnotte B. [Pathophysiology of immune thrombocytopenia]. *Rev Médecine Interne Fondée Par Société Natl Française Médecine Interne*. juin 2011;32(6):350-7.
 32. Cines DB, Blanchette VS. Immune thrombocytopenic purpura. *N Engl J Med*. 28 mars 2002;346(13):995-1008.
 33. Kosugi S, Kurata Y, Tomiyama Y, Tahara T, Kato T, Tadokoro S, et al. Circulating thrombopoietin level in chronic immune thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol*. juin 1996;93(3):704-6.
 34. Levy GG, Nichols WC, Lian EC, Foroud T, McClintick JN, McGee BM, et al. Mutations in a member of the ADAMTS gene family cause thrombotic thrombocytopenic purpura. *Nature*. 4 oct 2001;413(6855):488-94.
 35. Microangiopathies thrombotiques [Internet]. [cité 22 juin 2015]. Disponible sur: http://www.srlf.org/rc/org/srlf/htm/Article/2011/20110816-093227-791/src/htm_fullText/fr/20110812_Coppo_P_RFE_Thrombopenie_MAT.pdf
 36. Veyradier A, Coppo P. [ADAMTS13, von Willebrand factor specific cleaving protease]. *Médecine Sci MS*. déc 2011;27(12):1097-105.
 37. François, B. CIVD et Sepsis. Disponible sur: http://www.srlf.org/rc/org/srlf/htm/Article/2013/20130419_090659_826/src/htm_fullText/fr/20110812_Francois_B_RFE_Thrombopenie_sepsis_CIVD.pdf
 38. Saigo K, Sakota Y, Masuda Y, Matsunaga K, Takenokuchi M, Nishimura K, et al. Automatic detection of immature platelets for decision making regarding platelet transfusion indications for pediatric patients. *Transfus Apher Sci Off J World Apher Assoc Off J Eur Soc Haemapheresis*. avr 2008;38(2):127-32.
 39. Guide-Affection longue durée. Purpura thrombopénique immunologique de l'enfant et de l'adulte. Protocole national de diagnostic et de soins. Octobre 2009. Disponible sur: http://www.has_sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2009_12/ald_2_pnds_pti_im_une_enft_adulte_web.pdf
 40. Scully M, Hunt BJ, Benjamin S, Liesner R, Rose P, Peyvandi F, et al. Guidelines on the diagnosis and management of thrombotic thrombocytopenic purpura and other thrombotic microangiopathies. *Br J Haematol*. août 2012;158(3):323-35.
 41. Kiefel V, Santoso S, Weisheit M, Müller-Eckhardt C. Monoclonal antibody--specific immobilization of platelet antigens (MAIPA): a new tool for the identification of platelet-reactive antibodies. *Blood*. déc 1987;70(6):1722-6.

42. Dale GL, Friese P, Hynes LA, Burstein SA. Demonstration that thiazole-orange-positive platelets in the dog are less than 24 hours old. *Blood*. 1 avr 1995;85(7):1822-5.
43. Rowan RM, Cavill I, Corberand JX. The reticulocyte count: progress towards the resurrection of a useful clinical test. *Clin Lab Haematol*. déc 1996;18 Suppl 1:3-8.
44. Lee LG, Chen CH, Chiu LA. Thiazole orange: a new dye for reticulocyte analysis. *Cytometry*. nov 1986;7(6):508-17.
45. Harrison P, Robinson MS, Mackie IJ, Machin SJ. Reticulated platelets. *Platelets*. 1997;8(6):379-83.
46. Ogata H. Measurement of reticulated platelets in thrombocytopenia--methodology and clinical utility. *Kurume Med J*. 1998;45(2):165-70.
47. Robinson MS, Mackie IJ, Khair K, Liesner R, Goodall AH, Savidge GF, et al. Flow cytometric analysis of reticulated platelets: evidence for a large proportion of non-specific labelling of dense granules by fluorescent dyes. *Br J Haematol*. févr 1998;100(2):351-7.
48. Jung H, Jeon H-K, Kim H-J, Kim S-H. Immature platelet fraction: establishment of a reference interval and diagnostic measure for thrombocytopenia. *Korean J Lab Med*. oct 2010;30(5):451-9.
49. Briggs C, Kunka S, Hart D, Oguni S, Machin SJ. Assessment of an immature platelet fraction (IPF) in peripheral thrombocytopenia. *Br J Haematol*. juill 2004;126(1):93-9.
50. Ko YJ, Kim H, Hur M, Choi SG, Moon H-W, Yun Y-M, et al. Establishment of reference interval for immature platelet fraction. *Int J Lab Hematol*. oct 2013;35(5):528-33.
51. Abe Y, Wada H, Tomatsu H, Sakaguchi A, Nishioka J, Yabu Y, et al. A simple technique to determine thrombopoiesis level using immature platelet fraction (IPF). *Thromb Res*. 2006;118(4):463-9.
52. Nomura T, Kubota Y, Kitanaka A, Kurokouchi K, Inage T, Saigo K, et al. Immature platelet fraction measurement in patients with chronic liver disease: a convenient marker for evaluating cirrhotic change. *Int J Lab Hematol*. juin 2010;32(3):299-306.
53. Bat T, Leitman SF, Calvo KR, Chauvet D, Dunbar CE. Measurement of the absolute immature platelet number reflects marrow production and is not impacted by platelet transfusion. *Transfusion (Paris)*. juin 2013;53(6):1201-4.
54. Strauss G, Vollert C, von Stackelberg A, Weimann A, Gaedicke G, Schulze H. Immature platelet count: a simple parameter for distinguishing thrombocytopenia in pediatric acute lymphocytic leukemia from immune thrombocytopenia. *Pediatr Blood Cancer*. oct 2011;57(4):641-7.
55. Kickler TS, Oguni S, Borowitz MJ. A clinical evaluation of high fluorescent platelet fraction percentage in thrombocytopenia. *Am J Clin Pathol*. févr 2006;125(2):282-7.

56. Cannavo I, Ferrero-Vacher C, Sudaka I, Aquaronne D, Berthier F, Raynaud S. Assessment of an immature platelet fraction (IFP%) in the diagnosis of thrombocytopenia. *Ann Biol Clin (Paris)*. août 2010;68(4):415-20.
57. Pons I, Monteagudo M, Lucchetti G, Muñoz L, Perea G, Colomina I, et al. Correlation between immature platelet fraction and reticulated platelets. Usefulness in the etiology diagnosis of thrombocytopenia. *Eur J Haematol*. août 2010;85(2):158-63.
58. Albanyan A, Murphy MF, Wilcock M, Harrison P. Changes in the immature platelet fraction within ageing platelet concentrates. *J Thromb Haemost JTH*. déc 2008;6(12):2213-5.
59. Osei-Bimpong A, Saleh M, Sola-Visner M, Widness J, Veng-Pedersen P. Correction for effect of cold storage on immature platelet fraction. *J Clin Lab Anal*. 2010;24(6):431-3.
60. Ruisi MM, Psaila B, Ward MJ, Villarica G, Bussel JB. Stability of measurement of the immature platelet fraction. *Am J Hematol*. août 2010;85(8):622-4.
61. Takami A, Shibayama M, Orito M, Omote M, Okumura H, Yamashita T, et al. Immature platelet fraction for prediction of platelet engraftment after allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. avr 2007;39(8):501-7.
62. Yamaoka G, Kubota Y, Nomura T, Inage T, Arai T, Kitanaka A, et al. The immature platelet fraction is a useful marker for predicting the timing of platelet recovery in patients with cancer after chemotherapy and hematopoietic stem cell transplantation. *Int J Lab Hematol*. déc 2010;32(6 Pt 1):e208-16.
63. Garibaldi B, Malani R, Yeh H-C, Lipson E, Michell D, Bennett M, et al. Estimating platelet production in patients with HIV-related thrombocytopenia using the immature platelet fraction. *Am J Hematol*. déc 2009;84(12):852-4.
64. Grove EL, Hvas A-M, Kristensen SD. Immature platelets in patients with acute coronary syndromes. *Thromb Haemost*. janv 2009;101(1):151-6.
65. Gonzalez-Porras JR, Martin-Herrero F, Gonzalez-Lopez TJ, Olazabal J, Diez-Campelo M, Pabon P, et al. The role of immature platelet fraction in acute coronary syndrome. *Thromb Haemost*. janv 2010;103(1):247-9.
66. Osei-Bimpong A. The effect of storage on the clinical utility of the immature platelet fraction. *Hematol Amst Neth*. avr 2009;14(2):118-21.
67. Miyazaki K, Koike Y, Kunishima S, Ishii R, Danbara M, Horie R, et al. Immature platelet fraction measurement is influenced by platelet size and is a useful parameter for discrimination of macrothrombocytopenia. *Hematol Amst Neth*. 2 juin 2015;
68. Tanaka Y, Tanaka Y, Gondo K, Maruki Y, Kondo T, Asai S, et al. Performance evaluation of platelet counting by novel fluorescent dye staining in the XN-series automated hematology analyzers. *J Clin Lab Anal*. sept 2014;28(5):341-8.

Résumé

Introduction : La fraction des plaquettes immatures (IPF) mesure les plaquettes réticulées. La mesure de l'IPF est disponible sur l'automate à numération XE 5000 Sysmex, utilisé en routine dans les laboratoires d'hématologie cytologique. Cette mesure peut donc être réalisée de façon simple, rapide et standardisée, en même temps que la numération des paramètres de l'hémogramme. Le but de notre étude a été d'évaluer ce paramètre dans le diagnostic des thrombopénies centrales, périphériques et constitutionnelles.

Matériels et Méthodes : Nous avons, dans un premier temps, établi des valeurs normales de ce paramètre sur un groupe de patients témoins (N=35), puis nous avons étudié sa stabilité à 8 heures et 24 heures. Nous avons ensuite évalué l'IPF dans deux groupes : le premier composé de patients présentant des thrombopénies d'origine centrale (TC) (N=46) et un autre de thrombopénies d'origine périphérique (TP) (N=67). Nous avons comparé ces groupes entre eux et à notre groupe témoin (N=35). Enfin, nous avons fait une étude descriptive d'un troisième groupe comprenant des thrombopénies constitutionnelles notamment 5 syndromes MYH9 (N=8).

Résultats : Les valeurs normales de l'IPF étaient comprises entre 0,4 et 6,8% avec une moyenne de 1,8%. Ce paramètre était stable 8 heures après le prélèvement, conservé à température ambiante, il ne l'était plus à 24 heures du prélèvement. Les moyennes de l'IPF étaient de 6,9% et 11,9% respectivement dans les groupes TC et TP. L'analyse statistique a révélé une différence significative d'IPF entre le groupe contrôle et les TC ($p < 0,001$) et les TP ($p < 0,001$), et des TC et des TP entre elles ($p < 0,001$). Une valeur de l'IPF à 9,8% a été retrouvée comme seuil pour permettre de différencier une TP, d'une TC. Le groupe des thrombopénies constitutionnelles avait la moyenne la plus élevée avec un IPF à 30%.

Conclusion : L'IPF doit être effectué dans les 8 heures sur un prélèvement conservé à température ambiante. Il s'agit d'un bon marqueur du renouvellement plaquettaire qui permet de distinguer de façon simple l'origine d'une thrombopénie. De plus, il peut être un outil efficace dans le dépistage des thrombopénies constitutionnelles notamment les macrothrombocytopenies de type MYH9.

Mots-clés : Fraction des plaquettes immatures (IPF), Thrombopénies, Sysmex XE 5000, Purpura thrombopénique immunologique