



HAL
open science

Les thrombocytopénies à médiation immune - Mise au point d'un test par cytométrie en flux pour détecter la présence d'anticorps anti-plaquettes canines

Sébastien Bernard

► **To cite this version:**

Sébastien Bernard. Les thrombocytopénies à médiation immune - Mise au point d'un test par cytométrie en flux pour détecter la présence d'anticorps anti-plaquettes canines. Médecine vétérinaire et santé animale. 2022. dumas-03978561

HAL Id: dumas-03978561

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03978561v1>

Submitted on 8 Feb 2023

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.

Année 2022

**LES THROMBOCYTOPÉNIES À MÉDIATION IMMUNE -
MISE AU POINT D'UN TEST PAR CYTOMÉTRIE EN FLUX
POUR DÉTECTER LA PRÉSENCE D'ANTICORPS ANTI-
PLAQUETTES CANINES**

THÈSE

pour obtenir le diplôme d'État de

DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

présentée et soutenue publiquement devant

la Faculté de Médecine de Créteil (UPEC)

le 21 Octobre 2022

par

Sébastien, Florent BERNARD

sous la direction de

Delphine LE ROUX

JURY

Président du jury :	M. Sylvain BELLIER	Professeur à l'EnvA
Directrice de thèse :	Mme Delphine LE ROUX	Maître de Conférences à l'EnvA
Examineur :	M. Pierre DESHUIILLERS	Maître de Conférences à l'EnvA
Examinatrice :	Mme Ghita BENCHEKROUN	Maître de Conférences à l'EnvA

Liste des enseignants intervenant dans l'encadrement des thèses de Doctorat vétérinaire



Version du 8 février 2022

Liste des Professeurs et Maîtres de conférences titulaires de l'HDR

M	Adjou	Karim	Professeur	DPASP
M	Audigié	Fabrice	Professeur	DEPEC
M	Bellier	Sylvain	Professeur	DSBP
M	Blaga	Radu	Maître de conférences HDR	DPASP
M	Blot	Stephane	Professeur	DEPEC
M	Boulouis	Henri-Jean	Professeur émérite	DSBP
Mme	Chahory	Sabine	Professeur	DEPEC
M	Chateau	Henry	Professeur	DSBP
Mme	Chetboul	Valerie	Professeur	DEPEC
Mme	Crevier-Denoix	Nathalie	Professeur	DSBP
M	Degueurce	Christophe	Professeur	DSBP
M	Denoix	Jean-Marie	Professeur	DEPEC
M	Desquilbet	Loïc	Professeur	DSBP
Mme	Dufour	Barbara	Professeur émérite	DPASP
M	Eloit	Marc	Professeur	DSBP
M	Fayolle	Pascal	Professeur émérite	DEPEC
M	Fédérighi	Michel	Professeur	DPASP
M	Fontbonne	Alain	Professeur	DEPEC
Mme	Gilbert	Caroline	Professeur	DSBP
M	Grandjean	Dominique	Professeur	DEPEC
Mme	Grimard-Ballif	Bénédicte	Professeur	DPASP
Mme	Haddad-Hoang Xuan	Nadia	Professeur	DPASP
M	Jouvion	Gregory	Professeur	DSBP
M	Kohlhauer	Matthias	Maître de conférences HDR	DSBP
Mme	Le Poder	Sophie	Professeur	DSBP
M	Manassero	Mathieu	Professeur	DEPEC
Mme	Maurey-Guéneç	Christelle	Maître de conférences HDR	DEPEC
M	Millemann	Yves	Professeur	DPASP
M	Perrot	Sébastien	Maître de conférences HDR	DSBP
Mme	Pilot-Storck	Fanny	Professeur	DSBP
M	Ponter	Andrew	Professeur	DPASP
Mme	Rivière	Julie	Maître de conférences HDR	DPASP
Mme	Robert	Céline	Professeur	DSBP
M	Tiret	Laurent	Professeur	DSBP
M	Tissier	Renaud	Professeur	DSBP
M	Verwaerde	Patrick	Professeur	DEPEC
Mme	Viateau	Véronique	Professeur	DEPEC

Liste des Maîtres de conférences et Ingénieurs de recherche DMV

M	Arné	Pascal	Maître de conférences	DPASP
Mme	Barassin	Isabelle	Maître de conférences	DPASP
Mme	Benckroun	Ghita	Maître de conférences	DEPEC
Mme	Bertoni	Lelia	Maître de conférences	DEPEC
M	Bolnot	Francois	Maître de conférences	DPASP
Mme	Canonne-Guibert	Morgane	Maître de conférences	DEPEC
Mme	Chevallier	Lucie	Maître de conférences	DSBP
Mme	Cochet-Faivre	Noëlle	Maître de conférences	DEPEC
Mme	Constant	Fabienne	Maître de conférences	DPASP
Mme	Cordonnier-Lefort	Nathalie	Maître de conférences	DSBP
Mme	Crepeaux	Guillemette	Maître de conférences	DSBP
Mme	De Paula Reis	Alline	Maître de conférences	DPASP
Mme	Decambron	Adeline	Maître de conférences	DEPEC
M	Delsart	Maxime	Maître de conférences associé	DPASP
M	Desbois	Christophe	Maître de conférences	DEPEC
M	Deshuillers	Pierre	Maître de conférences	DSBP
M	Gauthier	Michel	Maître de conférences associé	DPASP
Mme	Guétin-Poirier	Valentine	Maître de conférences	DPASP
Mme	Jacquet	Sandrine	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
Mme	Lagrée	Anne-Claire	Maître de conférences	DSBP
Mme	Le Roux	Delphine	Maître de conférences	DSBP
Mme	Legrand	Chantal	Maître de conférences associé	DSBP
Mme	Marignac	Genevieve	Maître de conférences	DSBP
M	Mauffré	Vincent	Maître de conférences	DPASP
Mme	Mimmet	Narjès	Maître de conférences	DPASP
Mme	Mespouhès-Rivière	Céline	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
M	Mortier	Jérémy	Maître de conférences associé	DEPEC
M	Nudelmann	Nicolas	Maître de conférences	DEPEC
M	Pignon	Charly	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
M	Polack	Bruno	Maître de conférences	DSBP
Mme	Ravary-Plumioën	Bérangère	Maître de conférences	DPASP
M	Reyes-Gomez	Edouard	Maître de conférences	DSBP
Mme	Risco-Castillo	Véronica	Maître de conférences	DSBP
Mme	Rose	Hélène	Maître de conférences associé	DSBP

Remerciements

Au Président du Jury de cette thèse, M Sylvain BELLIER, Professeur à l'EnvA,

Pour m'avoir fait l'honneur d'assurer la présidence de notre jury de thèse et pour ses conseils avisés. Mes très sincères remerciements.

À Mme Delphine LE ROUX, Maitre de conférences à l'EnvA,

Pour m'avoir donné l'opportunité de travailler sur ce sujet de thèse captivant, m'avoir accompagné tout au long de ce travail et avoir fait preuve d'énormément de pédagogie et de bienveillance durant ces années. Mes plus sincères et profonds remerciements.

À Mme Ghita BENCHEKROUN, Maitre de conférences à l'EnvA,

Pour m'avoir fait l'honneur d'accepter le rôle d'examineur de cette thèse, m'avoir accompagné dans la réalisation de mes expériences à l'hôpital des animaux de compagnie. Pour sa précieuse aide apportée à ce travail. Mes très sincères et respectueux remerciements.

À M Pierre DESHUIILLERS, Maitre de conférences à l'EnvA,

Pour m'avoir fait l'honneur d'accepter le rôle d'examineur de cette thèse. Pour ses nombreux et précieux conseils et son implication dans le perfectionnement de ce travail. Mes très sincères remerciements.

Table des matières

Liste des figures.....	3
Liste des tableaux	5
Liste des abréviations.....	7
Introduction	9
Première partie : Les thrombopénies à médiation immune chez le chien.....	11
1. Généralités sur les thrombocytes.....	11
A. <i>Structure des thrombocytes</i>	11
a. Membrane plasmique.....	11
b. Structures cytoplasmiques	11
B. <i>La thrombopoïèse</i>	13
a. Formation des mégacaryocytes	13
b. L'endoréplication	14
c. La formation des proplaquettes.....	14
d. La thrombopoïétine (TPO)	15
C. <i>Rôle des thrombocytes dans le mécanisme d'hémostase</i>	16
a. Hémostase primaire	17
b. Hémostase secondaire	18
D. <i>Destruction physiologique des thrombocytes</i>	20
E. <i>Troubles de la numération plaquettaire</i>	20
2. Généralités sur les thrombopénies à médiation immune	21
A. <i>Etiopathogénie</i>	21
a. Intervention de facteurs génétiques	21
b. Dysrégulation du système immunitaire	21
c. Une thrombopoïèse inadaptée	25
d. TMI secondaires	26
B. <i>Épidémiologie</i>	27
C. <i>Diagnostic</i>	27
a. Présentation clinique.....	28
b. Diagnostic de la thrombopénie.....	28
c. Diagnostic du caractère primaire de la thrombopénie à médiation immune.....	28
d. Examens complémentaires.....	29
D. <i>Traitement</i>	32
a. Utilisation de la vincristine et d'immunoglobulines par voie intraveineuse	32
b. Traitement immunosuppresseur : monothérapie ou bithérapie ?	33
c. Procédure de splénectomie	34
d. Objectifs du traitement	34
E. <i>Pronostic</i>	35
Deuxième partie : étude expérimentale.....	37
1. Introduction	37
2. Généralités sur la cytométrie en flux.....	38
A. <i>Principe de cytométrie en flux</i>	38
a. Fonctionnement général	38
b. Données recueillies.....	38
B. <i>Appareil utilisé</i>	40
3. Matériels et méthodes.....	40
A. <i>Sélection de la cohorte</i>	40
a. Chiens sains	40
b. Chiens atteints de thrombopénie	41
c. Procédure de prélèvement.....	41

<i>B. Détection des anticorps dirigés contre les plaquettes par cytométrie de flux</i>	41
a. Isolement et fixation des plaquettes.....	41
b. Marquage des plaquettes.....	42
<i>C. Détection des anticorps dirigés contre les plaquettes par ELISA</i>	42
4. Résultats	44
<i>A. Étude caractéristique des cohortes</i>	44
a. Cohorte des chiens sains.....	44
b. Cohorte des chiens thrombopéniques.....	45
<i>B. Validation du protocole d'obtention du PRP par cytométrie en flux</i>	46
<i>C. Mise en évidence des anticorps liés aux plaquettes</i>	47
a. Détection des anticorps liés spécifiquement aux plaquettes	47
b. Résultats chez les chiens sains	49
c. Résultats des chiens atteints de TMI primaire	49
d. Résultats chez les chiens atteints de thrombopénies	54
<i>D. Concordance des résultats de cytométrie en flux comparés aux résultats du test ELISA</i>	56
a. Résultats chez les chiens sains	57
b. Résultats chez les chiens atteints de TMI primaire	59
5. Discussion.....	61
Conclusion	65
Liste des références bibliographiques	69

Liste des figures

Figure 1 : Schéma de l'organisation structurale d'une plaquette humaine. D'après Themes (2017)	13
Figure 2 : Schéma simplifié récapitulatif la production des plaquettes, d'après Léon <i>et al.</i> , (2015) 13	
Figure 3 : Différenciation des cellules précurseurs des plaquettes d'après Léon <i>et al.</i> (2015)	14
Figure 4 : Schéma récapitulatif des étapes de la mégacaryopoïèse et de la thrombopoïèse. D'après « MHEMO - Filière de santé maladies hémorragiques rares » (2018).....	15
Figure 5 : Schéma récapitulatif des principaux mécanismes de l'hémostase. D'après Jackson (2013)	17
Figure 6 : Schéma des voies intrinsèques, extrinsèques et communes de la coagulation, d'après Robertson et Miller (2018).....	19
Figure 7 : Formation des complexes et production de facteurs de coagulations par la membrane activée d'après Brooks <i>et al.</i> (2022).....	19
Figure 8 : Schéma simplifié de la destruction physiologique des plaquettes. D'après LeVine et Brooks (2019).....	20
Figure 9 : Mécanismes de dégradation des plaquettes liées aux anticorps selon la spécificité des anticorps, d'après LeVine et Brooks (2019b)	22
Figure 10 : Mécanismes de production des anticorps et de dégradation des plaquettes, d'après Cines et Blanchette (2002)	24
Figure 11 : Bilan des réactions immunitaires en cause dans la TMI primaire, d'après Brooks <i>et al.</i> (2022).....	26
Figure 12 : Approche diagnostique de la TMI primaire, schéma modifié d'après Brooks <i>et al.</i> (2022)	30
Figure 13 : Mode d'action de la vincristine, d'après Škubník <i>et al.</i> (2021)	32
Figure 14 : Mode d'action de l'hIVIG, d'après Lünemann <i>et al.</i> (2015)	33
Figure 15 : Principe général de la cytométrie en flux, d'après Zafrani et Monneret (2017).....	38
Figure 16 : Histogramme taille/granularité (à gauche) associé à un histogramme montrant le nombre de cellules émettrices en fonction l'intensité de fluorescence pour le marqueur CD4 (à droite) (Zafrani et Monneret, 2017).....	39
Figure 17 : Photographie du cytomètre BD Accuri C6Plus (BD, 2016).....	40
Figure 18 : Schéma personnel explicatif du protocole ELISA de compétition.....	43

Figure 19 : Cytogrammes illustrant la stratégie de « <i>gating</i> » utilisée pour identifier les plaquettes dans les échantillons de PRP	47
Figure 20 : Cytogrammes comparant la détection d'anticorps anti IgG canins et d'anti IgG équins.	48
Figure 21 : Diagramme en boîte montrant le pourcentage de plaquettes fluorescentes (FITC+) des chiens sains marquées avec l'anticorps anti-IgG canins.....	49
Figure 22 : Représentation de l'évolution de la numération plaquettaire et du traitement corticoïde en fonction du temps	51
Figure 23 : Représentation de l'évolution de la numération plaquettaire et du traitement corticoïde en fonction du temps	54
Figure 24 : Résultats individuels chez les chiens thrombopéniques d'origine immune primaire ou secondaire, ou non immune	55
Figure 25 : Diagrammes en boîte montrant le pourcentage de plaquettes fluorescentes (FITC+) des chiens atteints de thrombopénie marquées avec l'anticorps anti-IgG canins.....	55
Figure 26 : Courbe étalon construite à partir des sérums étalons.....	56
Figure 27 : Diagramme en boîte présentant les concentrations en anticorps anti plaquettes présents dans les sérums des patients sains calculés par méthode ELISA	57
Figure 28 : Graphique représentant les concentrations calculées en anticorps par méthode ELISA par rapport au pourcentage de fluorescence au cytomètre en flux	58

Liste des tableaux

Tableau 1 : Nouvel outil d'évaluation du score de saignement chez le chien, d'après Makielski <i>et al.</i> (2018).....	36
Tableau 2 : Caractéristiques des chiens sains.....	44
Tableau 3 : Caractéristiques des chiens thrombopéniques	45
Tableau 4 : Affections présentées par les chiens thrombopéniques.....	46
Tableau 5 : Valeurs statistiques associées à la figure 21	49
Tableau 6 : Caractéristiques du chien atteint de TMI primaire n°1	50
Tableau 7 : Caractéristiques du chien atteint de TMI primaire n°2	51
Tableau 8 : Caractéristiques du chien atteint de TMI primaire n°3	52
Tableau 9 : Caractéristiques du chien atteint de TMI primaire n°4	53
Tableau 10 : Valeurs statistiques correspondant à la figure 27	57
Tableau 11 : Tableau de contingence entre la positivité des résultats en cytométrie et en ELISA, sur la base d'une positivité du résultat en ELISA à 40 ng/ml	58
Tableau 12 : Tableau de contingence entre la positivité des résultats en cytométrie et en ELISA, sur la base d'une positivité du résultat en ELISA 20 ng/ml	58
Tableau 13 : Résultats de cytométrie et de méthode ELISA des chiens atteints de TMI primaire..	59

Liste des abréviations

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

ADP : Adénosine diphosphate

AMPc : Adénosine Monophosphate Cyclique

ATP : Adénosine Triphosphate

CD : Cellules Dendritiques

CD : Cluster de Différenciation

CHUVA : Centre Hospitalier Universitaire Vétérinaire d'Alfort

CHUV-AC : Centre Hospitalier Universitaire Vétérinaire des Animaux de Compagnie

CIVD : Coagulation IntraVasculaire Disséminée

CPA : Cellule Présentatrice d'Antigènes

EDTA : Acide Ethylène-Diamine-TétraAcétique

ELISA : Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

EnvA : École Nationale Vétérinaire d'Alfort

Fc : Fragment cristallisable

FITC : Fluoresceine IsoThiocyanate

FSC : Forward SCatter

FV : Facteur de coagulation V

FVIII : Facteur de coagulation VIII

FXI : Facteur de coagulation XI

GP : Glycoprotéine

hIVIG : humain Intraveinouse Immunoglobuline G

IFN : interféron

IgG : Immunoglobulines G

IL : Interleukine

MAIPA : Monoclonal Antibody-specific Immobilization of Platelet Antigen

MPLV : Myéloproliférative Leukemia Virus

NO : Monoxyde d'azote

PABA : Platelet Antibody Bead Array

pCDs : Cellules Dendritiques plasmacytoïdes

PCR : Polymerase Chain Reaction

PRP : Plasma riche en plaquettes

Rpm : rotations par minute

SIRS : Syndrome Inflammatoire à Réponse Systémique

SSC : Side SCatter

TNF : Facteur de Nécrose Tumoral

TMI : Thrombopénie à médiation immune primaire

TMI : Thrombopénie à médiation immune

TPO : Thrombopoïétine

VPM : Volume Plaquettaire Moyen

VWF : Facteur de Von Willebrand

Introduction

Les plaquettes sont les plus petits éléments figurés du sang. Produites dans la moelle osseuse par les mégacaryocytes, elles jouent un rôle clé dans les mécanismes de coagulation et un trouble de la numération plaquettaire peut ainsi entraîner la survenue de saignements spontanés. La diminution de la numération plaquettaire peut faire suite à des phénomènes de consommation, de destruction ou bien à des anomalies de production des plaquettes.

Cette étude s'intéresse aux thrombopénies à médiation immune, et plus particulièrement aux thrombopénies à médiation immune primaire. La thrombopénie à médiation immune est caractérisée par une réponse immunitaire en défaveur des plaquettes, pouvant être primaire ou bien secondaire à une infection, une néoplasie, un processus inflammatoire, ou une réaction médicamenteuse. Sa pathogénie n'est pas entièrement connue à ce jour et elle peut représenter un défi diagnostique et thérapeutique pour le clinicien. Les connaissances actuelles mettent en cause l'existence d'une réponse immunitaire inadaptée provoquant une destruction des plaquettes, aggravée par une production défectueuse. Les plaquettes expriment à leur surface des glycoprotéines impliquées dans les mécanismes de la coagulation et qui constituent des sites de fixation des anticorps produits lors de thrombopénie à médiation immune, entraînant la destruction des plaquettes par les cellules du système phagocytaire mononucléé et par les hépatocytes. Cette destruction fait principalement suite à la production d'anticorps dirigés contre les plaquettes mais des phénomènes de réponse immunitaire à médiation cellulaire sont également décrits. Ces phénomènes mènent à la diminution du nombre de plaquettes circulantes dans le compartiment sanguin, provoquant à terme l'expression de symptômes caractéristiques de troubles de la coagulation. Le diagnostic du caractère primaire de la maladie s'appuie sur la mise en évidence d'un faisceau d'éléments cliniques et paracliniques. La présentation clinique diffère d'un animal à l'autre et les anomalies hématologiques sont parfois les seuls signes de cette maladie. Lorsqu'une thrombopénie à médiation immune primaire est suspectée, il convient de réaliser les examens complémentaires divers permettant d'exclure les autres causes de thrombopénie (Brooks *et al.*, 2022).

La mise en évidence de la présence d'anticorps anti-plaquettaires présents dans le sang ou à la surface des plaquettes des patients permet d'orienter le diagnostic vers une thrombopénie à médiation immune. De nombreuses études se sont intéressées à l'intérêt de la cytométrie de flux dans la mise en évidence des anticorps liés aux plaquettes. Cette technique permet de caractériser individuellement les particules en suspension dans un échantillon selon divers critères comme la taille et la granularité, mais également selon l'expression de molécules de surface grâce à des anticorps couplés à un fluorochrome (Zafrani et Monneret, 2017). Le travail présenté ici vise à mettre au point un test de cytométrie en flux permettant de mettre en évidence la présence de ces anticorps liés aux plaquettes, grâce au cytomètre présent au Biopôle, laboratoire d'analyses vétérinaires de l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort (EnvA), en suivant les protocoles décrits dans de précédentes études, notamment celle de Shropshire *et al.* (2020).

La première partie de ce manuscrit est donc consacrée à une étude bibliographique des données actuelles concernant la physiologie des plaquettes et vise à établir un état des lieux des connaissances pathogéniques, diagnostiques et thérapeutiques de la thrombopénie à médiation immune primaire. La seconde partie est une description du travail expérimental réalisé au Biopôle,

étudiant la mise en évidence d'anticorps dirigés contre les plaquettes canines par la méthode de cytométrie en flux.

Première partie : Les thrombopénies à médiation immune chez le chien

1. Généralités sur les thrombocytes

Les plaquettes, également appelées thrombocytes, sont des cellules énucléées circulant dans le sang. Elles jouent un rôle-clé dans le mécanisme d'hémostase durant lequel elles s'organisent en un clou plaquettaire permettant la fermeture rapide d'une lésion d'un vaisseau sanguin.

A. Structure des thrombocytes

a. Membrane plasmique

La membrane plasmique plaquettaire est composée d'une double couche de phospholipides et de cholestérol. L'hémimembrane externe est riche en phosphatidylcholine et sphingomyéline tandis que l'hémimembrane interne est riche en phosphatidylsérine et phosphatidyléthanolamine. Lors de l'activation plaquettaire, ces cellules acquièrent un caractère pro-coagulant suite à la modification de la composition de ces hémimembranes, caractérisée principalement par un passage de phosphatidylsérine vers la couche extérieure. Lorsque les plaquettes sont inactives, la différence de composition des hémimembranes est maintenue grâce à un transporteur protéique (Day, 2012). La membrane plasmique est également composée de radeaux lipidiques formés de sphingolipides, de cholestérol, de protéines et de glycoprotéines qui participent à l'activation plaquettaire et à l'hémostase. Les glycoprotéines constituent des récepteurs membranaires permettant la liaison aux facteurs de coagulation. Les glycoprotéines IIb-IIIa (également appelé intégrines $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$) sont les glycoprotéines majoritaires. D'autres complexes sont retrouvés, comme les glycoprotéines Ib-IX-V (GPIb-IX-V) et les glycoprotéines VI (GPVI) (Brooks *et al.*, 2022).

b. Structures cytoplasmiques

- *Le cytosquelette*

Le squelette membranaire permet de maintenir la forme ovoïde des plaquettes. Lors de l'activation plaquettaire, le remodelage du cytosquelette permet l'étalement des plaquettes sur l'endothélium vasculaire ainsi que la libération des granules. Il est principalement constitué de microtubules et de microfilaments d'actine situés sous la membrane plasmique, et formant un réseau bidimensionnel. Les microtubules sont formés de protofilaments de dimères d'alpha et de beta tubulines et la β1 tubuline qui les constitue est uniquement retrouvée dans les mégacaryocytes (Day, 2012 ; Brooks *et al.*, 2022).

- *Le système canaliculaire ouvert (SCO)*

La membrane plasmique plaquettaire présente de nombreuses invaginations formant le système canaliculaire ouvert. Lors de l'activation plaquettaire, les granules cytoplasmiques (décrits ci-après) contenus dans les plaquettes fusionnent avec la membrane du SCO grâce aux protéines « N-ethylmaleimide- sensitive factor attachment receptors » (protéines SNARE) ; le contenu des granules est alors exocyté dans le milieu extracellulaire. Le SCO peut également être le siège de l'inclusion de bactéries et de virus, bien que les plaquettes n'appartiennent pas au groupe des phagocytes (Day, 2012 ; Brooks *et al.*, 2022).

- *Le système tubulaire dense*

Le système tubulaire dense est une structure intracellulaire correspondant à un vestige du réticulum endoplasmique lisse mégacaryocytaire et est présent dans les plaquettes au repos, proche des microtubules. Cette structure n'est pas en continuité avec les granules ou le plasma. Elle joue un rôle dans l'activation et plus particulièrement dans l'exocytose des granules en libérant du calcium. Ce calcium est stocké par transport actif dans le système tubulaire dense grâce à une pompe à calcium adénosine triphosphatase (ATPase), stimulée par l'adénosine monophosphate cyclique (AMPC) produite par l'adénylate cyclase (Day, 2012 ; Brooks *et al.*, 2022).

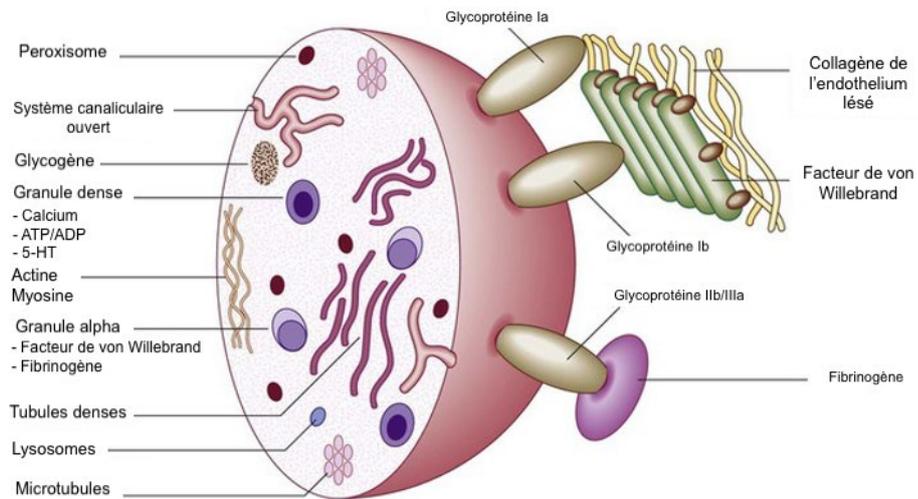
- *Les granules*

Les thrombocytes sont pourvus d'organites communs aux autres cellules : les mitochondries, les peroxyosomes et les lysosomes. Ils possèdent également deux types de granules spécifiques : les α -granules et les γ -granules (aussi appelés granules denses), qui sont produits au cours de la maturation des mégacaryocytes et des plaquettes par le réticulum endoplasmique.

Les α -granules contiennent de nombreuses protéines qui seront libérées lors de la phase d'activation des plaquettes et participeront à la production de thrombine et ainsi à la formation de fibrine. Certaines de ces protéines, comme le VWF, ont été produites par le mégacaryocyte dont ces cellules sont issues. Des protéines plasmatiques ont également été intégrées aux plaquettes, comme le fibrinogène ainsi que différents facteurs de coagulation dont le facteur XI (FXI), le facteur VIII (FVIII) et le facteur V (FV).

Les granules denses contiennent deux tiers des nucléotides d'adénine de la cellule, constituant une réserve non utilisable par celle-ci. La quantité d'adénosine diphosphate (ADP) y est une fois et demi plus élevée que celle d'adénosine triphosphate (ATP). Ce ratio est très différent de celui de la réserve métabolique dans lequel la quantité d'ADP est huit fois inférieure à celle d'ATP. Ces granules contiennent également de la sérotonine à une concentration 1000 fois supérieure à celle du plasma, ainsi que du calcium (Day, 2012). La structure générale d'une plaquette est représentée figure 1.

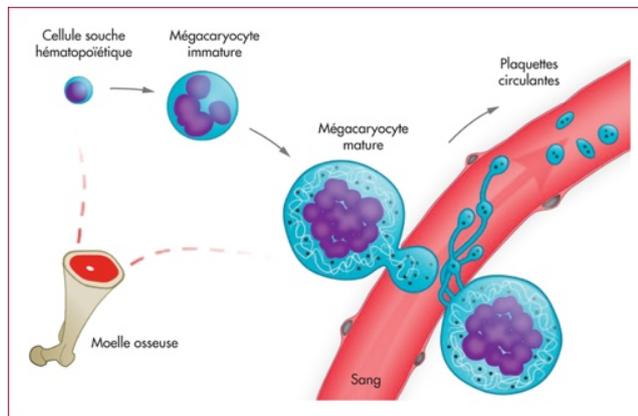
Figure 1 : Schéma de l'organisation structurale d'une plaquette humaine. D'après Themes (2017)



B. La thrombopoïèse

Toutes les cellules du sang, dont les plaquettes, sont issues de la différenciation des cellules hématopoïétiques. Cette différenciation mène, entre autres, à la formation de mégacaryocytes, cellules précurseurs des plaquettes. Les mégacaryocytes se situent principalement dans la moelle osseuse chez les carnivores domestiques comme chez l'homme (Brooks *et al.*, 2022) (Figure 2).

Figure 2 : Schéma simplifié récapitulant la production des plaquettes, d'après Léon *et al.*, (2015)

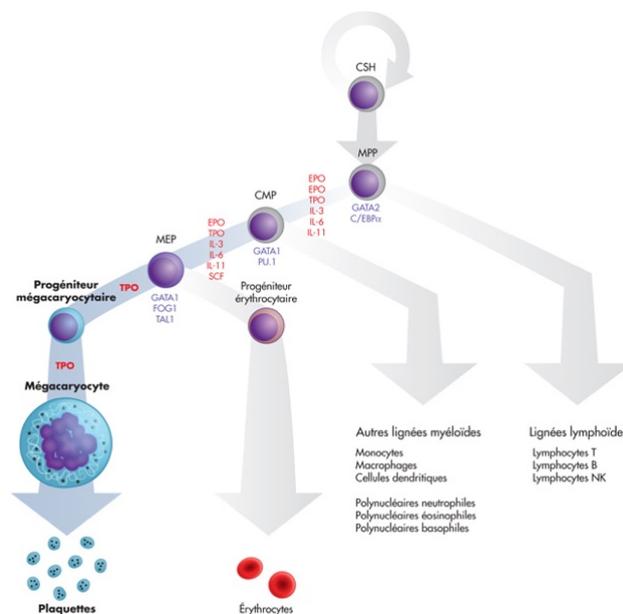


a. Formation des mégacaryocytes

Les cellules souches hématopoïétiques se divisent jusqu'à la formation de promégacaryoblastes, qui sont les premières cellules pouvant être morphologiquement reconnues au microscope, caractérisées par un rapport nucléo-cytoplasmique élevé, un cytoplasme bleu foncé et une taille d'environ dix micromètres (Figure 3). La différenciation cellulaire se poursuit jusqu'à l'obtention de mégacaryocytes. Lorsqu'ils sont matures, les mégacaryocytes migrent au sein de la moelle osseuse vers les vaisseaux sinusoides dans lesquels ils émettront des proplaquettes. Au cours de la différenciation, les cellules de cette lignée acquièrent progressivement l'expression

des classes (ou cluster) de différenciation 61, 42 et 41 (respectivement CD61, CD42 et CD41) (Brooks et al., 2022).

Figure 3 : Différenciation des cellules précurseurs des plaquettes d'après Léon et al. (2015)



MPP : Progéniteur Multipotent ; CMP : Progéniteur Commun Myéloïde ; MEP : Progéniteur mégacaryocytaire-érythroïde; EPO : Erythropoïétine ; TPO : Thrombopoïétine

b. L'endoréplication

Les premières phases du développement des mégacaryocytes consistent en une succession de plusieurs endoréplifications, c'est-à-dire que l'acide désoxyribonucléique (ADN) cellulaire connaît une répllication sans division cellulaire associée. Ce phénomène est dû à un déficit de cytokinèse et de caryocinèse qui empêche la cellule de connaître une mitose complète, permettant une multiplication de la quantité d'ADN sans séparation des chromosomes et du cytoplasme. La ploïdie peut ainsi atteindre une valeur de 128 N. La quantité d'ADN contenue dans la cellule après ces réplifications, conditionne le nombre de plaquettes produites par le mégacaryocyte. La durée de ce processus, de la croissance du mégacaryocyte à la production de plaquettes, est d'environ quatre à cinq jours, permettant la production de plusieurs milliers de plaquettes par mégacaryocyte. Le cytosquelette des mégacaryocytes joue un rôle central dans ce mécanisme car les microtubules permettent l'extension des proplaquettes et constituent le réseau sur lequel les protéines motrices transportent les organites (Brooks et al., 2022).

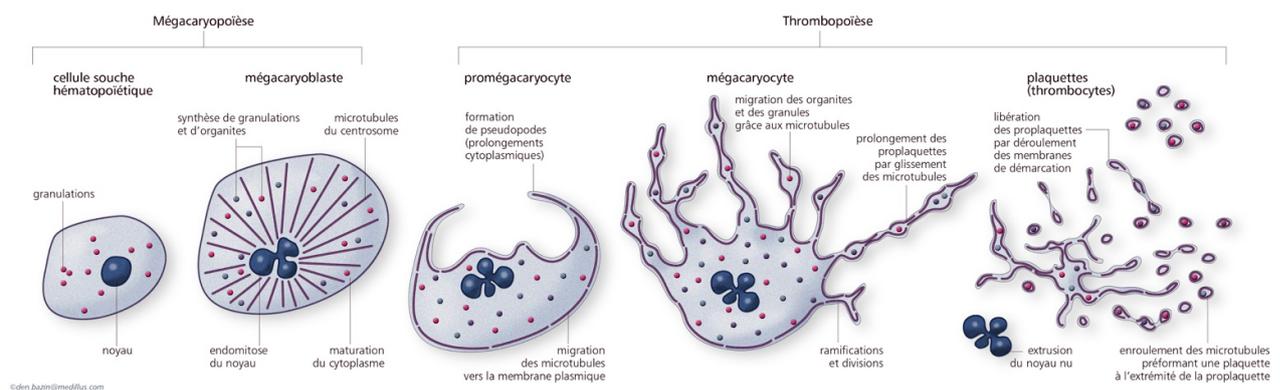
c. La formation des proplaquettes

Les mégacaryocytes émettent des pseudopodes, appelés proplaquettes, à l'intérieur des vaisseaux sanguins sinusoides situés à proximité. Cette intravasation est possible grâce à des protéines motrices, la dynéine et la kinésine, qui permettent aux microtubules de coulisser les uns par rapport aux autres, permettant le franchissement de la barrière endothéliale. Les microtubules,

grâce aux kinésines, assurent également le transport d'organites et de granules du centre de la cellule vers les pseudopodes. Les proplaquettes possèdent ainsi, dans leur cytoplasme, des organites ainsi que des splicéosomes et de l'acide ribonucléique (ARN) pré-messager. Ce contenu permettra à la plaquette formée de réaliser la synthèse de protéines. Afin de produire un grand nombre de proplaquettes, les mégacaryocytes utilisent une réserve de membrane située dans leur cytoplasme et qui constitue une prolongation de leur membrane plasmique, appelée « système de démarcation membranaire ». Les hypothèses concernant sa formation supposent qu'il serait le résultat d'une combinaison entre l'invagination de la membrane plasmique et la production d'une nouvelle membrane par l'appareil de Golgi et le réticulum endoplasmique (Brooks *et al.*, 2022).

La formation des proplaquettes se fait de manière centripète de la périphérie du mégacaryocyte vers son noyau jusqu'à épuisement du cytoplasme. Le noyau restant du mégacaryocyte entre alors en apoptose. Les proplaquettes émises dans la circulation périphérique continuent d'évoluer en formant des préplaquettes, plus fines et plus petites. Ces préplaquettes se divisent pour former des plaquettes discoïdes qui se diviseront à leur tour en plaquettes. Ces étapes sont résumées figure 4 (Brooks *et al.*, 2022).

Figure 4 : Schéma récapitulatif des étapes de la mégacaryopoïèse et de la thrombopoïèse.
D'après « MHEMO - Filière de santé maladies hémorragiques rares » (2018)



d. La thrombopoïétine (TPO)

La thrombopoïétine (TPO) est l'hormone principale de la régulation de la production de plaquettes en stimulant les progéniteurs de la lignée myéloïde et en stimulant la croissance des précurseurs de la mégacaryopoïèse. Sa production est principalement assurée par le foie et également par les reins et les cellules stromales de la moelle osseuse mais dans une moindre mesure. Les plaquettes vieillissantes reconnues par les hépatocytes (et plus particulièrement par le récepteur d'Ashwell-Morell décrit plus bas), et ainsi détruites, participent également à la régulation de la production de TPO (Brooks *et al.*, 2022).

- *Action de la TPO en situation physiologique*

La TPO se fixe sur son récepteur Myeloproliferative Leukemia Protein (MLP ou CD110) codé par l'oncogène MPL (Myeloproliferative Leukemia virus) et situé à la surface des mégacaryocytes et des plaquettes. En absence de thrombopénie, les taux circulants de TPO ne stimulent pas la thrombopoïèse. En effet, dans cette condition physiologique, lorsqu'elle se fixe sur les récepteurs à

la surface des mégacaryocytes et des plaquettes, elle est internalisée par ces cellules puis détruite. Un pool important de récepteurs à la TPO est également situé à la surface des endothéliums mais ces récepteurs ne participent pas à la régulation des taux de TPO dans l'organisme (Brooks *et al.*, 2022).

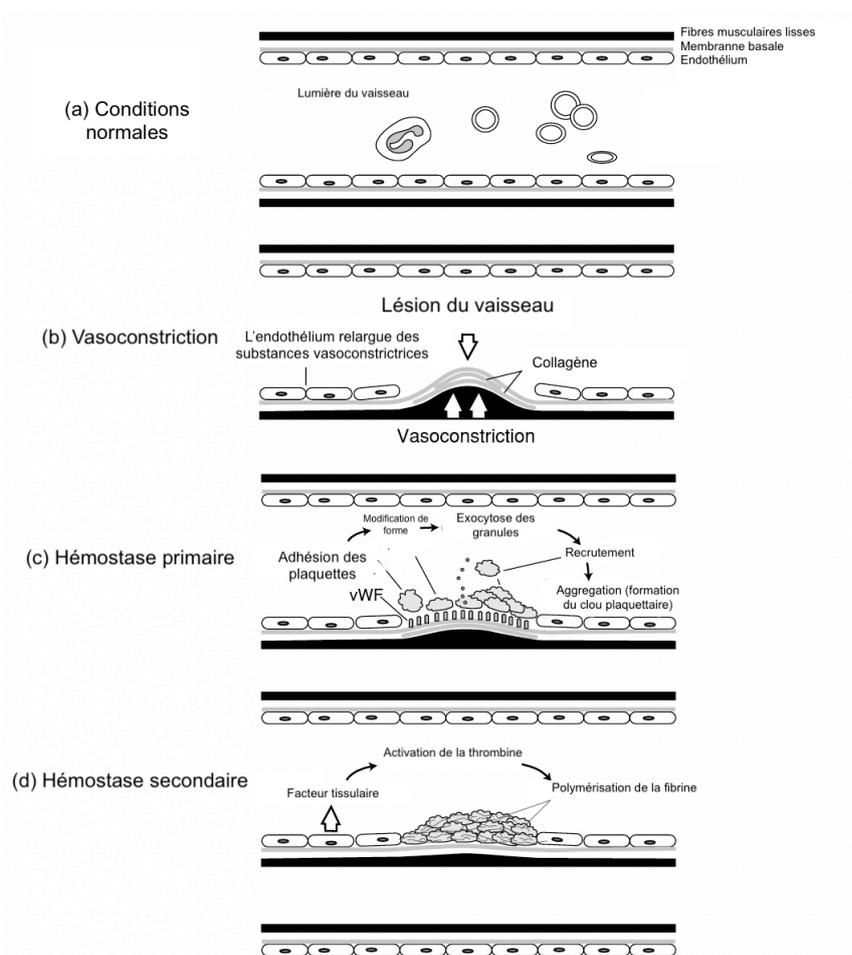
- *Réponse en cas de thrombopénie*

Une thrombopénie s'accompagne d'une diminution de la quantité de récepteurs MPL (présents à la surface des plaquettes). Ainsi, l'internalisation de la TPO diminue et sa concentration dans le sang augmente, provoquant une stimulation de la thrombopoïèse. Lors de processus inflammatoire, la production d'interleukines (IL) active la production hépatique de TPO. La réponse des mégacaryocytes à la TPO est modifiée en fonction de l'âge de ces cellules. Les mégacaryocytes les plus anciens répondent moins fortement à la TPO, c'est-à-dire que leur capacité d'endoréplication est inférieure aux jeunes cellules, engendrant une production moindre de plaquettes (Brooks *et al.*, 2022).

C. Rôle des thrombocytes dans le mécanisme d'hémostase

Le mécanisme d'hémostase est artificiellement divisé en deux étapes ayant lieu simultanément dans l'organisme : l'hémostase primaire et l'hémostase secondaire. Les plaquettes jouent un rôle clé durant ces deux phases. Lorsqu'un vaisseau est lésé, on observe une vasoconstriction associée à l'agrégation de plaquettes au site de lésion. Les plaquettes recrutent davantage de plaquettes jusqu'à ce qu'un clou plaquettaire se forme, permettant d'arrêter le saignement. Ce mécanisme correspond à l'hémostase primaire. Au cours de l'hémostase secondaire, on observe une cascade de réactions enzymatiques grâce au relargage, par les plaquettes activées, de facteurs de coagulations dans le plasma. La formation de thrombine et de fibrine en résultant, permet la stabilisation du clou plaquettaire. Usuellement, la fonction des plaquettes durant l'hémostase est divisée en plusieurs étapes : l'adhésion, l'agrégation, l'exocytose et l'activité plaquettaire procoagulante (Day, 2012 ; Jackson, 2013). Ces différentes étapes sont présentées figure 5 et décrites ci-dessous.

Figure 5 : Schéma récapitulatif des principaux mécanismes de l'hémostase. D'après Jackson (2013)



(A) Situation normale. (B) Vasoconstriction du vaisseau lésé. (C) Hémostase primaire : adhérence des plaquettes à l'endothélium du vaisseau lésé grâce au VWF, à leur changement de forme et à l'exocytose des granules, permettant la formation du clou plaquettaire. (D) : Hémostase secondaire. Transformation du fibrinogène en fibrine, permettant de stabiliser le clou plaquettaire

a. Hémostase primaire

- *L'adhésion et l'agrégation*

En conditions physiologiques, la paroi des vaisseaux sanguins secrète du monoxyde d'azote (NO) et des prostacyclines, inhibant l'agrégation plaquettaire. Lorsque la paroi est lésée, les récepteurs membranaires des plaquettes entrent en contact avec les ligands présents dans la matrice sous endothéliale, permettant aux plaquettes d'y adhérer. Ces récepteurs correspondent à des glycoprotéines de surface dont les plus importantes sont les complexes GPIb-IX et GPIIb-IIIa. Les ligands diffèrent en fonction des forces de cisaillement auxquelles les plaquettes sont soumises. Lorsque la vitesse du sang est faible, comme dans les veines, les plaquettes adhèrent au collagène (insoluble), à la laminine et à la fibronectine. La liaison des plaquettes avec le collagène sous endothélial découvert par la lésion vasculaire provoque un changement de forme des plaquettes et l'émission de pseudopodes, entraînant l'exposition de protéines de liaison au fibrinogène (soluble) et au VWF. Lorsque les forces de cisaillement sont élevées comme dans les artérioles et la

microcirculation, un changement de conformation du VWF au contact du sous endothélium permet aux plaquettes de s'y lier et augmente ainsi leur adhérence au site de lésion.

L'action de la phospholipase A₂, enzyme présente dans les plaquettes, sur les phospholipides membranaires (en particulier la phosphatidylcholine) entraîne la production d'acide arachidonique. À partir de cette molécule, une série de réactions aboutit à la production d'eicosanoïdes (de la famille des prostaglandines), dont le plus important est le thromboxane A₂. Cette molécule, libérée par le système de tubules denses, permet le recrutement et l'agrégation de nombreux thrombocytes et participe à la vasoconstriction locale. La sérotonine et l'adrénaline sécrétées par les plaquettes et l'endothélium contribuent également à cette vasoconstriction (Day, 2012).

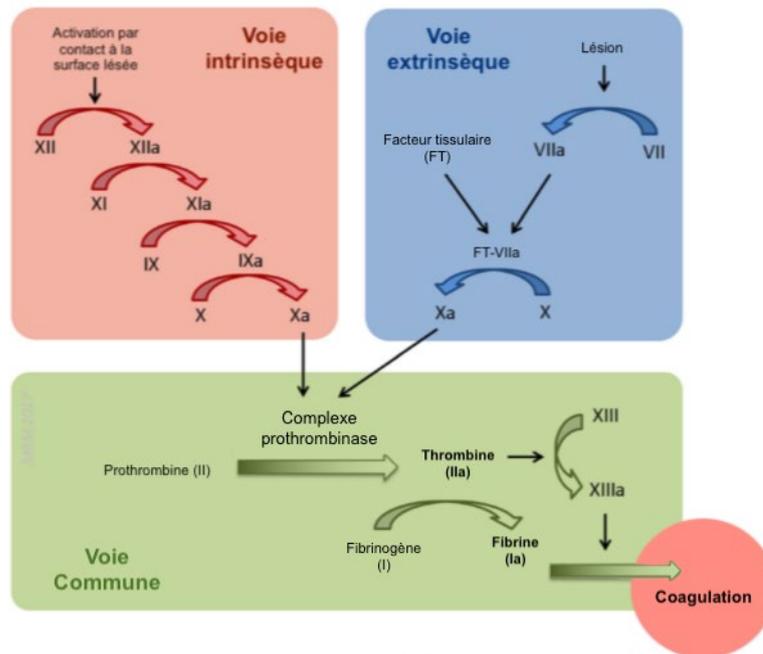
- *Exocytose*

En parallèle, l'activation des plaquettes au contact du tissu sous endothélial entraîne l'exocytose des granules denses et des α -granules présents dans leur cytoplasme. Les molécules libérées, dont le VWF, permettent le recrutement d'autres plaquettes et favorisent la formation du clou plaquettaire. Ce phénomène est suivi de la fusion des membranes des plaquettes (Day, 2012).

b. Hémostase secondaire

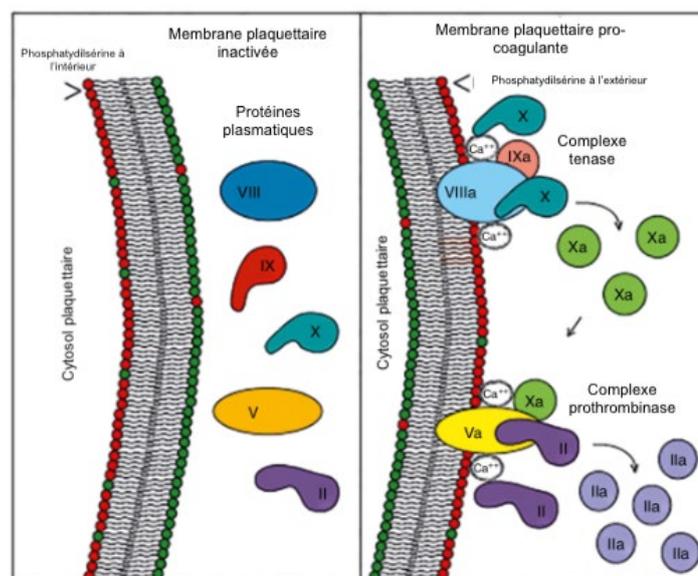
Le mécanisme d'hémostase secondaire (ou coagulation au sens strict) aboutit à la transformation du fibrinogène en fibrine, insoluble, permettant de renforcer le clou plaquettaire. Cette transformation résulte d'une suite de réactions entre les facteurs de coagulation, nommée cascade de coagulation et divisée en trois voies distinctes, représentées figure 6 : la voie intrinsèque, la voie extrinsèque et la voie commune. Les voies intrinsèque et extrinsèque interagissent entre elles et aboutissent toutes deux à l'activation du facteur X en facteur Xa, correspondant au point de départ de la voie commune. La voie intrinsèque possède pour point de départ la liaison du facteur XII avec des surfaces chargées négativement. Elle possède un rôle très important dans l'initiation de la coagulation. La voie extrinsèque est initiée par l'interaction entre les facteurs tissulaires et le facteur VII. Elle permet le maintien du mécanisme de coagulation. Le facteur Xa permet la transformation de la prothrombine en thrombine, qui permet à son tour la transformation du fibrinogène en fibrine. Des tests de laboratoire permettent d'explorer la fonctionnalité de ces deux voies : le temps de Quick (ou temps de prothrombine, abrégé PT) explore la voie extrinsèque tandis que le temps de Céphaline activé (abrégé aPTT pour activated partial thromboplastin time) explore la voie intrinsèque (Day, 2012).

Figure 6 : Schéma des voies intrinsèques, extrinsèques et communes de la coagulation, d'après Robertson et Miller (2018)



L'activation plaquettaire entraîne une modification de la composition des deux hémimembranes de la membrane plasmique (principalement un passage de phosphatidylsérine vers l'hémimembrane extérieure). Ce phénomène permet la formation de complexes procoagulants constitués de multiples facteurs de coagulation. Les complexes multiplient l'efficacité des réactions de formation de thrombine d'un facteur 100 000 à 300 000 (Brooks *et al.*, 2022) (Figure 7).

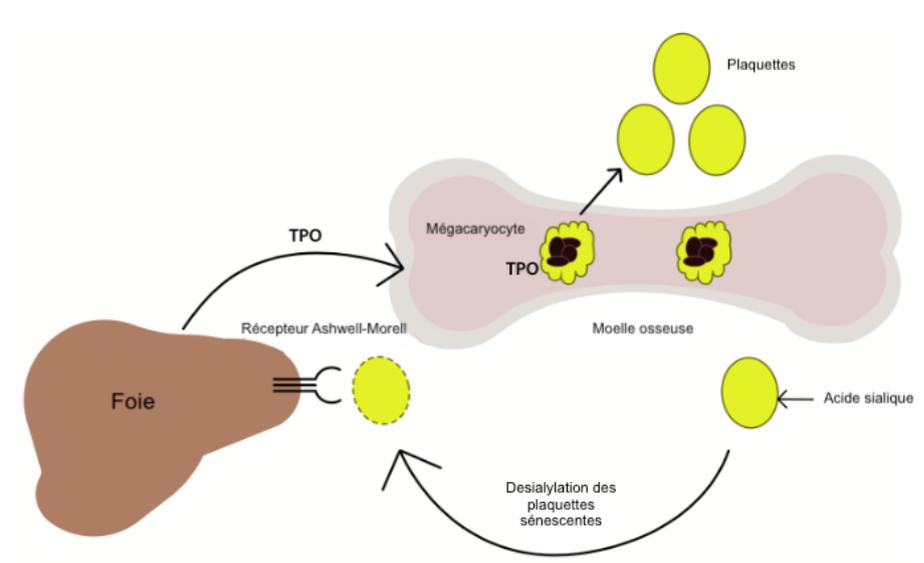
Figure 7 : Formation des complexes et production de facteurs de coagulations par la membrane activée Brooks et al. (2022)



D. Destruction physiologique des thrombocytes

Les plaquettes sénescents présentent à leur surface une quantité importante de phosphatidylsérine. Elles sont alors reconnues et détruites par les macrophages grâce à leurs récepteurs Axl, Tyro 3 et Mer, appartenant à la sous famille des récepteurs à activité tyrosine kinase nommée TAM (acronyme constitué des premières lettres de Axl, Tyro 3 et Mer) (Naeini *et al.*, 2020). En parallèle, la désialylation de la membrane plasmique des plaquettes facilite leur destruction hépatique après leur liaison avec le récepteur d'Ashwell-Morell situé sur les hépatocytes. Cette seconde méthode de destruction engendre une production de TPO par les hépatocytes. Lorsque les glycoprotéines de surface sont dénaturées ou endommagées, elles peuvent devenir le site de liaison d'anticorps entraînant également leur destruction (Figure 8) (LeVine et Brooks, 2019).

Figure 8 : Schéma simplifié de la destruction physiologique des plaquettes. D'après LeVine et Brooks (2019)



E. Troubles de la numération plaquettaire

Les troubles de la numération plaquettaire sont des anomalies hématologiques fréquemment diagnostiquées en médecine vétérinaire, de manière plus importante chez les chiens que chez les chats. La numération plaquettaire normale du chien est comprise entre 200 000 plaquettes/ μ L et 400 000 plaquettes/ μ L (Day, 2012). Une thrombocytopénie est définie par une diminution du nombre de thrombocytes circulant à un taux inférieur à 150 000 plaquettes/ μ L. Il est à noter que des races comme le Cavalier King Charles Spaniel, le Greyhound, et le Shiba Inu présentent une variation raciale du nombre de thrombocytes circulant. Chez le Greyhound, la limite inférieure permettant de détecter une thrombopénie est comprise entre 64 000 plaquettes/ μ L et 100 000 plaquettes/ μ L selon différentes études. La limite inférieure de numération plaquettaire chez le Shiba Inu est de 110 000 plaquettes/ μ L (Day, 2012 ; Brooks *et al.*, 2022).

Les thrombopénies peuvent avoir différentes origines. Elles peuvent être secondaires à une consommation excessive des plaquettes comme dans les cas de coagulations intravasculaires disséminées (CIVD), à une production insuffisante par la moelle osseuse mais peuvent également être dues à des mécanismes à médiation immunitaire. Ce phénomène immunitaire peut être secondaire

à un processus néoplasique ou à la présence d'un agent infectieux (ehrlichiose, piroplasmose...). Dans certains cas, une réaction auto-immune est à l'origine d'une thrombopénie, on parle alors de thrombopénie à médiation immunitaire primaire (TMI primaire). Cette maladie dysimmunitaire est caractérisée par une destruction des plaquettes et une diminution de la production de mégacaryocytes. Ces thrombopénies à médiation immunitaire seront détaillées dans les parties suivantes.

2. Généralités sur les thrombopénies à médiation immunitaire

A. Etiopathogénie

Les TMI primaires se caractérisent par une perte de tolérance au soi entraînant une destruction des plaquettes associée à une production insuffisante de plaquettes et de mégacaryocytes. La pathogénèse de cette maladie n'est pas encore tout à fait connue à ce jour et est peu décrite en médecine vétérinaire. Sauf mention contraire, cette sous-partie traitera donc des connaissances en médecine humaine.

a. Intervention de facteurs génétiques

En médecine humaine, une sensibilité génétique à l'apparition d'une réaction auto-immune est connue. La mise en évidence de gènes impliqués dans la TMI primaire est difficile, dû à la rareté des TMI primaires familiales. Cependant, des gènes intervenant dans les réponses immunitaires marquées aiguës ont été mis en cause, comme les gènes codant pour le TNF- β , l'IL4 ou IL10 (Consolini *et al.*, 2016). En médecine vétérinaire, une prédisposition chez les Cockers Spaniel et les bobtails est très souvent rapportée, supposant l'existence d'une prédisposition génétique chez le chien bien qu'aucun gène n'ait été mis en cause jusqu'à présent. L'apparition d'une TMI primaire résulterait probablement ainsi d'une combinaison entre une prédisposition génétique et un facteur environnemental ou infectieux déclencheur, dont la nature reste très souvent non identifiée (Brooks *et al.*, 2022).

b. Dysrégulation du système immunitaire

- **Perte de tolérance au soi**

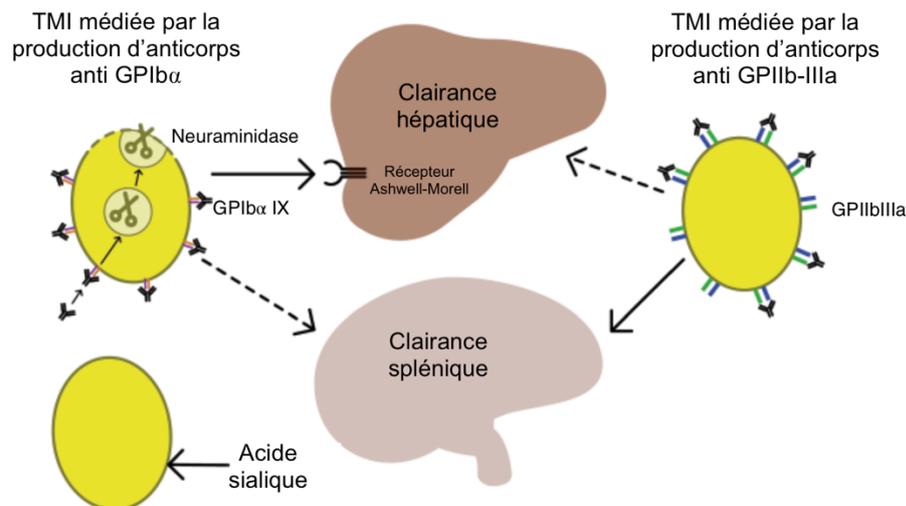
Les lymphocytes T sont constitués de différentes populations : les lymphocytes T cytotoxiques et les lymphocytes T auxiliaires. Parmi cette deuxième catégorie, il existe les lymphocytes Th1 et Th2. En situation physiologique, la balance Th1/Th2 est maintenue grâce à l'équilibre entre deux types de réponse, caractérisées par l'intervention de différentes cytokines. La réponse de type 1 est impliquée dans la réponse aux pathogènes intracellulaires par une réaction immunitaire à médiation cellulaire. Elle est caractérisée par la sécrétion d'IL2, d'interféron γ (IFN γ), du facteur de nécrose tumorale α (TNF α) et de TNF β . La réaction de type 2 est impliquée dans la réponse aux pathogènes extracellulaires et est caractérisée par la sécrétion d'IL4, d'IL5, d'IL6, d'IL10 et d'IL13. En cas de TMI primaire, la balance Th1/Th2 est déséquilibrée en faveur d'une réaction de type 1, favorisant le développement de lymphocytes B auto-réactifs (Consolini *et al.*, 2016).

- *Rôle des anticorps dirigés contre les plaquettes et les mégacaryocytes*

Chez l'homme, il a été démontré que la destruction plaquettaire était principalement médiée par des immunoglobulines G (IgG). L'intervention d'immunoglobulines M (IgM) et d'immunoglobulines A (IgA) peut être également mise en jeu. Ces immunoglobulines sont majoritairement dirigées contre les complexes glycoprotéines IIb/IIIa (GPIIb/IIIa), récepteurs au fibrinogène correspondant aux classes de différenciation CD41/CD61, et Ib/IX (GPIb/IX), récepteurs au VWF correspondant aux classes de différenciation CD42c/CD42a, mais peuvent également être dirigées contre les glycoprotéines Ia-IIa, IV et V (Consolini *et al.*, 2016). Environ 80% des patients humains présentent des anticorps dirigés contre GPIIb/IIIa et 20% à 40% des patients humains présentent des anticorps dirigés contre GPIb (Brooks *et al.*, 2022). Les glycoprotéines IIb (GPIIb) et les GPIb/IX sont présentes à la surface des mégacaryocytes et il a été montré *in vitro* que ces anticorps participent à la destruction de mégacaryocytes et inhibent leur production de proplaquettes. Il a également été démontré *in vitro* qu'un autoanticorps dirigé contre le récepteur à la TPO (le MPL) entraînait la suppression de la prolifération des mégacaryocytes (Consolini *et al.*, 2016). Chez le chien, une seule étude décrit les antigènes ciblés par les anticorps liés aux plaquettes lors de TMI primaire. Cette étude a identifié la présence d'anticorps dirigés contre GPIIb et GPIIIa (Brooks *et al.*, 2022). L'étude de Scott *et al.* (2002) a cependant montré chez un chien la présence d'anticorps dirigés contre la GPIb/IX dans le sérum.

Les conséquences de la liaison des anticorps aux plaquettes diffèrent selon la molécule contre laquelle ils sont dirigés. Les anticorps anti-GPIIb/GPIIIa sont reconnus par les macrophages grâce à leur récepteur à la partie Fc (Fragment cristallisable) des IgG, présent à leur surface. Les plaquettes recouvertes d'anticorps sont ainsi phagocytées puis dégradées. Le siège de cette dégradation réside en grande partie dans la rate (Day, 2012). Les anticorps anti-GPIb provoquent quant à eux une activation plaquettaire ainsi qu'une translocation de la neuraminidase 1 à la surface des plaquettes. Elle provoque une désialylation plaquettaire, entraînant la destruction des plaquettes suite à la liaison avec le récepteur Ashwell-Morell décrit plus haut (Li *et al.*, 2015) (Figure 9).

Figure 9 : Mécanismes de dégradation des plaquettes liées aux anticorps selon la spécificité des anticorps, d'après (LeVine et Brooks, 2019b)



- *Variabilités de la médiation immune*

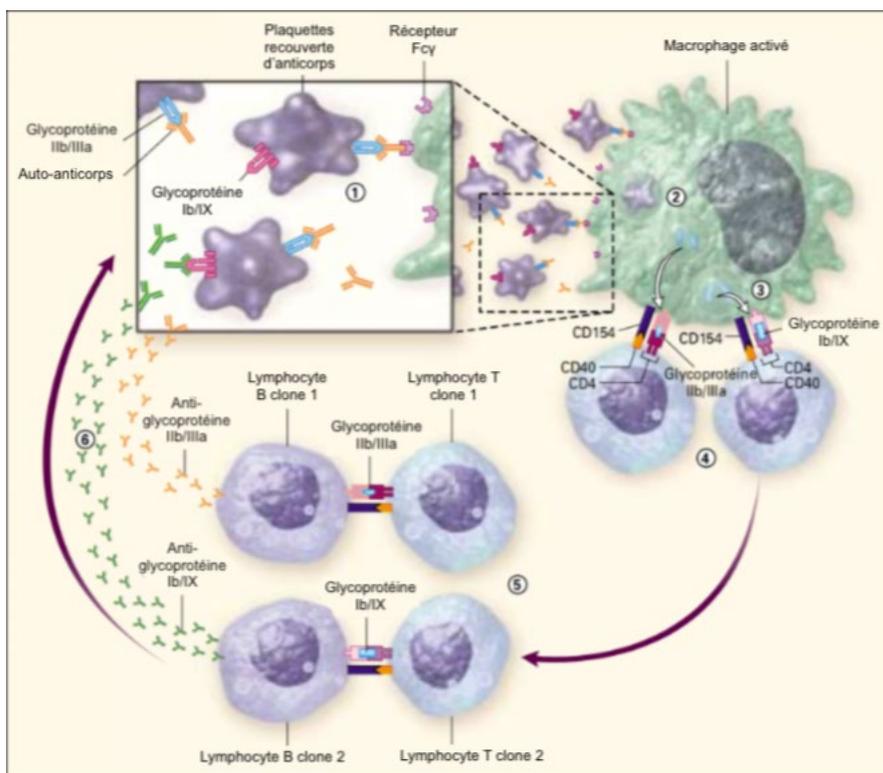
Comme vu précédemment, la médiation humorale par production d'anticorps dirigés contre les glycoprotéines situées à la surface de la membrane plasmique des thrombocytes et des mégacaryocytes, constitue la principale origine de la thrombopénie dans cette maladie. Chez l'homme, un dysfonctionnement de la régulation de cette réaction immunitaire par les lymphocytes B et T régulateurs permet la persistance du phénomène immun. Il a été mis en évidence que jusqu'à 40% des patients humains atteints de TMI primaire ne développaient pas d'anticorps dirigés contre les glycoprotéines plaquettaires. La thrombopénie fait alors suite à une réaction immunitaire à réponse cellulaire par production de cellules T cytotoxiques, induisant la destruction des plaquettes par apoptose et cytotoxicité médiée par la perforine et la granzyme (LeVine et Brooks, 2019).

- *Rôle des cellules présentatrices d'antigènes (CPA)*

Les CPA, comme les macrophages et les cellules dendritiques, reconnaissent, internalisent et dégradent les protéines antigéniques. Les peptides antigéniques forment un complexe avec les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) et sont présentées par la CPA aux lymphocytes T qui s'activent suite au contact avec la CPA via ce complexe peptide-CMH, et aux cytokines qu'elle produit. Le fonctionnement des CPA est influencé par le microenvironnement et dans certaines conditions, comme lors d'inflammation, des anomalies du nombre et de la fonction des CPA induisent une présentation anormale d'antigènes ou l'activation inappropriée de lymphocytes T. Lors de TMI primaire, l'exposition d'antigènes (dont l'origine n'est pas connue) entraîne l'apparition d'un large spectre de peptides pouvant induire la présentation par les CPA d'antigènes du soi, correspondant ici à des protéines plaquettaires. Ce phénomène est représenté figure 10 (Consolini et al., 2016).

Il existe deux catégories de cellules dendritiques (CDs) : les CDs myéloïdes et les CDs plasmacytoïdes (pCDs). Ces dernières produisent des IFN de type 1 (IFN- $\alpha/\beta/\omega$), des cytokines intervenant entre autres dans la survie et la différenciation des CDs et dans l'activation des lymphocytes B et des cellules tueuses naturelles, appelées aussi cellules « natural killer » (NK). Il a été montré une diminution du nombre circulant de pCDs chez les patients humains atteints de TMI primaire non traités. L'hypothèse expliquant ce phénomène suggère que ces cellules sont mobilisées dans les tissus inflammatoires périphériques, et principalement dans la rate. Un dysfonctionnement de ces cellules contribue également au développement de la maladie. Une autre étude *in vitro* a montré que les CDs des patients humains atteints de TMI primaire étaient capables de stimuler la prolifération des lymphocytes T de manière plus importante que chez des patients sains (Consolini *et al.*, 2016).

Figure 10 : Mécanismes de production des anticorps et de dégradation des plaquettes, d'après Cines et Blanchette (2002)



Des auto anticorps anti-GPIIb/IIIa (en orange) et anti-GPIb/IX (verts) se fixent sur leur épitope correspondant à la surface des plaquettes (1). Ceci mène à la reconnaissance de ces cellules par les CPA (ici un macrophage) grâce au récepteur à la partie Fc des IgG (récepteur Fc γ). Les plaquettes sont phagocytées puis dégradées (2). Les CPA génèrent des épitopes correspondant aux GPIIb/IIIa et GPIb/IX (3). Les CPA activées (4) expriment ces épitopes à leur surface et entraînent la prolifération de lymphocytes T CD4+ (T-cell clone 1 et 2) (5). Les lymphocytes B reconnaissent ces épitopes plaquettaires, entraînant leur multiplication et la production d'anticorps (6).

- *Rôle des lymphocytes T régulateurs (Tregs)*

Les Tregs constituent une sous population de lymphocytes T permettant le maintien de la tolérance du soi. Leur dysfonctionnement est impliqué dans de nombreuses maladies auto-immunes. Plusieurs études ont montré un dysfonctionnement et un déficit de ces cellules chez les patients humains atteints de TMI primaire. Une diminution de l'expression et/ou de l'activité d'une enzyme immunomodulatrice, la indoléamine 2,3-dioxygénase 1 (IDO), produit une diminution de la conversion de lymphocytes T en Tregs. Il a également été mis en évidence une diminution de la sécrétion d'IL10, une cytokine possédant des propriétés anti-inflammatoires, synthétisée par les cellules Th2 et les Treg, et qui inhibe la sécrétion de cytokines de la voie Th1. La mise en évidence d'un dysfonctionnement et d'un déficit en Treg associé à un déficit sécrétoire d'IL10, suppose une diminution de la capacité des Tregs à inhiber les lymphocytes T et expliquerait en partie la réponse disproportionnée par les lymphocytes T dans les cas de TMI primaire (Consolini *et al.*, 2016).

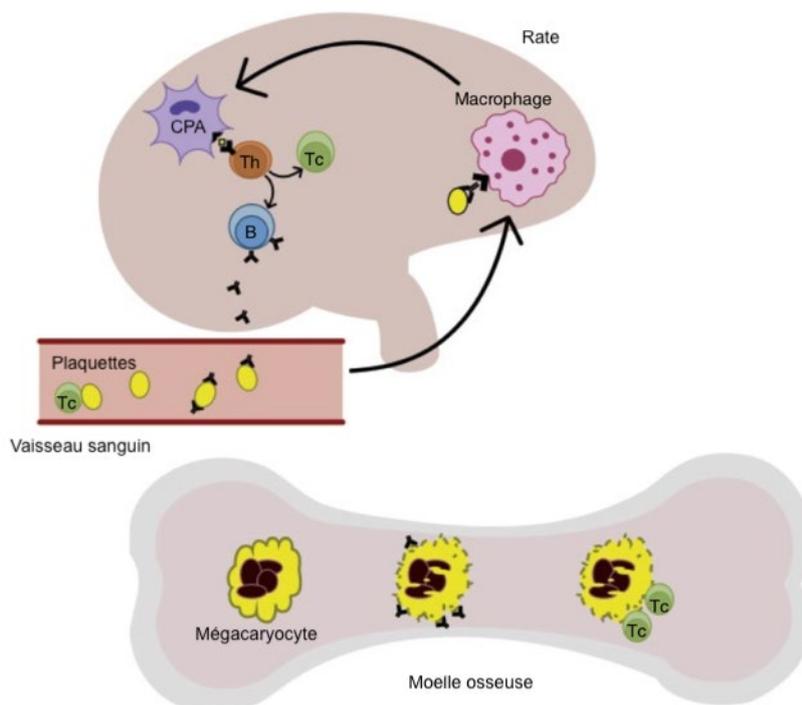
Une autre cytokine est mise en cause dans les cas de TMI primaire : l'IL17. Elle est produite par les lymphocytes Th17, en plus d'IL6, d'IL21 et de TNF. Ces cellules jouent un rôle opposé aux Tregs en induisant des réactions auto-immunes de manière plus importante que les lymphocytes Th1. Une quantité augmentée d'IL17 a été mise en évidence chez les patients humains atteints de TMI primaire ainsi qu'un déséquilibre de la balance Régulateurs/Th17. L'augmentation concomitante de l'expression de TNF γ et de l'IL17 chez certains patients humains suggère que les lymphocytes Th17 et Th1 sont impliqués simultanément dans le mécanisme dysimmunitaire. L'augmentation d'IL17 n'est cependant pas retrouvée chez tous les patients atteints de TMI primaire. L'IL 23 a également été étudiée et certaines études ont montré une augmentation de son taux lors de TMI primaire. Cette cytokine, principalement sécrétée par les CPA, est un médiateur de la différenciation des lymphocytes T naïfs en Th17. L'IL23 jouerait donc un rôle dans l'exacerbation de la réponse Th17 lors de TMI primaire (Consolini *et al.*, 2016).

c. Une thrombopoïèse inadaptée

Il a été prouvé chez l'homme que le taux de TPO lors de TMI primaire se trouvait dans les normes. Pourtant, dans un contexte de thrombopénie, il est attendu une augmentation de la concentration sanguine en TPO, permettant de corriger le manque de plaquettes. L'explication actuelle la plus acceptée met l'accent sur le lieu de dégradation des plaquettes. Comme indiqué auparavant, chez un patient sain, les plaquettes subissent une désialylation lorsqu'elles vieillissent. Ces plaquettes désialylées sont reconnues par le récepteur Ashwell-Morell, entraînant la production hépatique de TPO. Lors de TMI primaire, la destruction des plaquettes par le système phagocytaire mononucléé entraîne un « court-circuit » de ces récepteurs et empêche ainsi la production de TPO. La confirmation de cette hypothèse chez le chien n'est cependant pas réalisable car aucun test permettant de mesurer la TPO canine n'est aujourd'hui disponible (Krapf, 2016 ; LeVine et Brooks, 2019).

Pour conclure, la TMI primaire est une maladie dont la pathogénie est complexe et encore imparfaitement comprise. Les données actuelles mettent en cause une perte de la tolérance du soi caractérisée par la production de lymphocytes B auto réactifs et/ou de lymphocytes T cytotoxiques, associée à un dysfonctionnement des lymphocytes T régulateurs. Cette réaction immunitaire entraîne une destruction des plaquettes par des mécanismes différents selon le type de réponse. La thrombopénie induite est aggravée par l'absence d'une thrombopoïèse adaptée (Figure 11).

Figure 11 : Bilan des réactions immunitaires en cause dans la TMI primaire, d'après Brooks et al. (2022)



CPA : cellule présentatrice d'antigènes ; Th : lymphocyte T auxiliaire ; B : lymphocyte B ; Tc : lymphocyte T cytotoxique

d. TMI secondaires

Comme vu précédemment, les TMI primaires se caractérisent par une perte de tolérance du soi et une dysrégulation du système immunitaire. Cette maladie est à distinguer des TMI secondaires, dont la production d'anticorps dirigés contre la lignée thrombocytaire est secondaire à un phénomène infectieux, inflammatoire, néoplasique, à l'administration de médicaments ou encore à une réaction transfusionnelle. Il est à noter que lors de TMI primaire, la thrombopénie peut être la seule anomalie hématologique ou bien être associée à des atteintes d'autres lignées cellulaires sanguines. C'est par exemple le cas lors de syndrome d'Evans, de neutropénie à médiation immune concomitante ou bien de lupus érythémateux systémique (Day, 2012).

- *TMI secondaire d'origine infectieuse ou inflammatoire*

Les causes infectieuses représentent 20% à 60% des cas de TMI secondaires chez le chien. De nombreuses maladies infectieuses ont été mises en cause dans l'apparition d'une TMI secondaire, principalement des maladies vectorielles transmises par les tiques. Les microorganismes pathogènes rapportés sont les agents d'angiostrongylose, de la fièvre pourprée des montagnes rocheuses, de leishmaniose, d'anaplasmose, de babésiose, de dirofilariose et de leptospirose. Les chiens infectés par l'un de ces pathogènes ont 25% à 50% de risques de présenter une TMI secondaire (Day, 2012). Un phénomène inflammatoire peut également être à l'origine de TMI, c'est le cas de l'hépatite, de la prostatite, de la pancréatite, et du Syndrome Inflammatoire à Réponse Systémique (SIRS) (Brooks et al., 2022).

- *TMI secondaire à l'administration de médicaments*

Diverses molécules ont été mises en cause dans l'apparition d'une TMI secondaire chez le chien, comme les antibiotiques de la famille des sulfamides, la cefazedone (antibiotique de la famille des céphalosporines) et le carprofène (anti-inflammatoire non stéroïdien) (Brooks *et al.*, 2022). Cependant, toute administration de médicament peut engendrer une réaction d'hypersensibilité à l'origine d'une TMI. Le délai d'apparition de la réaction immunitaire est d'environ cinq à sept jours lors d'une première administration, correspondant au délai de mise en place d'une réaction immune primaire. Ce délai est réduit lors d'une seconde administration dû à la mémoire immunitaire de l'individu (Day, 2012).

Chez l'Homme, il a été démontré une association entre la vaccination et la survenue d'une TMI. Néanmoins, cette relation n'a pas été confirmée chez le chien. Une étude portant sur 48 chiens recherchant cette corrélation n'a pas réussi à mettre en évidence cette association (Huang *et al.*, 2012).

- *TMI associée à une néoplasie*

Certains chiens atteints de néoplasie présentent des anticorps liés aux plaquettes. Ces anticorps ont été retrouvés chez des chiens atteints de lymphomes, de leucémies, de sarcomes histiocytaires, d'hémangiosarcomes et de carcinomes mammaires (Brooks *et al.*, 2022). En cas d'atteinte néoplasique, une thrombopénie peut également être observée par consommation de plaquettes lors de phénomènes hémorragiques. Certaines maladies peuvent également provoquer une myéloptisie à l'origine d'une diminution de la production des plaquettes par diminution de la quantité de précurseurs de ces cellules.

- *TMI post transfusionnelle*

Cette réaction transfusionnelle correspond à une réactivation de lymphocytes mémoires spécifiques d'antigènes plaquettaires présents dans le sang du donneur. Ces lymphocytes ont été produits au cours d'une précédente confrontation à ces alloantigènes, lors de la gestation ou d'une précédente transfusion. Cette réaction induit des thrombopénies marquées, qui se développent entre cinq jours et deux semaines après la transfusion (Day, 2012 ; Brooks *et al.*, 2022).

B. Épidémiologie

La TMI primaire touche de manière plus fréquentes les chiens adultes, âgés de 4 à 8 ans, avec une plus grande représentativité des femelles. Des individus appartenant à n'importe quelle race peuvent être touchés mais une prédisposition est rapportée chez le Cocker Spaniel, le caniche (nain, miniature et standard), le bobtail et le berger allemand (Brooks *et al.*, 2022).

C. Diagnostic

La TMI primaire est définie comme la présence d'une numération plaquettaire diminuée en l'absence d'autres causes ou atteintes associées à une thrombocytopenie par consommation ou défaut de production de plaquettes. La TMI primaire doit également être différenciée d'une TMI

secondaire à une infection, une inflammation, une néoplasie ou à l'administration de médicaments. Un schéma récapitulatif d'une approche diagnostique proposée est présenté figure 12.

a. Présentation clinique

Lorsque la numération plaquettaire des animaux est inférieure à 30 000 plaquettes/ μL , des saignements spontanés peuvent apparaître. Les anomalies plaquettaires entraînent l'apparition de saignements de la microcirculation et rarement des saignements cavitaires. Ces saignements se caractérisent par des pétéchies, du purpura, des ecchymoses, du méléna, de l'hématurie, de l'épistaxis, de l'hématémèse, des hémorragies rétinienne et de l'hématochésie. Il est à noter que certains chiens atteints de TMI sont asymptomatiques (Day, 2012).

En plus de la destruction des plaquettes, un dysfonctionnement plaquettaire est observé chez les chiens atteints de TMI primaire. Ainsi, pour une même numération plaquettaire, certains chiens présentent des symptômes tandis que d'autres n'en présentent pas (Kristensen *et al.*, 1994). D'autres causes modifient la sévérité des saignements pour une numération plaquettaire identique : l'influence variable de l'activation par les anticorps, l'interférence des anticorps avec la fonction plaquettaire, l'altération de l'intégrité endothéliale secondaire à la thrombopénie et la présence de microparticules procoagulantes circulantes (LeVine et Brooks, 2019).

b. Diagnostic de la thrombopénie

La première étape du diagnostic consiste à objectiver la thrombopénie. La réalisation d'une numération formule sanguine doit être effectuée lors de suspicion de trouble de la coagulation chez un animal. Lorsque celle-ci est réalisée par un automate, elle doit toujours être vérifiée à l'aide d'un frottis. En effet, une agrégation des thrombocytes peut se former dans le tube de prélèvement et ainsi causer une thrombopénie artéfactuelle par lecture de l'automate. La réalisation du frottis sanguin permet de vérifier l'absence d'amas plaquettaires. Une ponction sanguine difficile ou un excédent de sang dans le tube de prélèvement sont des facteurs favorisant la formation de ces amas. Lors d'utilisation de tubes complémentés en acide éthylène-diamine-tétraacétique (EDTA), la captation du calcium peut déstabiliser les complexes protéiques des plaquettes qui exposent alors des épitopes, entraînant la fixation d'anticorps provoquant une agglutination, c'est pourquoi il est conseillé de prélever sur un tube complémenté en citrate lors d'exploration des temps de coagulation. Ces thrombopénies artéfactuelles se retrouvent néanmoins également avec l'utilisation de tubes complémentés en citrate. Lors de TMI, il est fréquent que les patients présentent une numération plaquettaire très basse, inférieure à 20 000 plaquettes/ μL . Dans ces conditions, les automates d'hématologie ne sont pas capables de fournir une valeur précise de numération, motivant d'autant plus la réalisation d'un comptage plaquettaire (Day, 2012 ; Brooks *et al.*, 2022).

c. Diagnostic du caractère primaire de la thrombopénie à médiation immune

À l'heure actuelle, il n'existe pas de consensus décrivant les tests à effectuer afin d'établir le diagnostic de TMI primaire (Kristiansen et Nielsen, 2021).

Le but de l'investigation est de déterminer si la thrombopénie est d'origine immune ou non, et si tel est le cas, de déterminer le caractère primaire ou secondaire de la thrombopénie à médiation immune. Plusieurs examens complémentaires peuvent permettre de mettre en évidence une cause pré existante de thrombopénie. Les investigations doivent inclure un bilan biochimique et hématologique complet, un dépistage des maladies vectorielles et des examens d'imagerie permettant d'exclure la présence de néoplasie. Lors de suspicion de maladie vectorielle, une recherche par biologie moléculaire (Polymerase Chain Reaction ou PCR) des agents infectieux peut être couplée à une sérologie afin d'augmenter la sensibilité des deux tests (LeVine et Brooks, 2019).

d. Examens complémentaires

- **Numération formule sanguine et comptage plaquettaire**

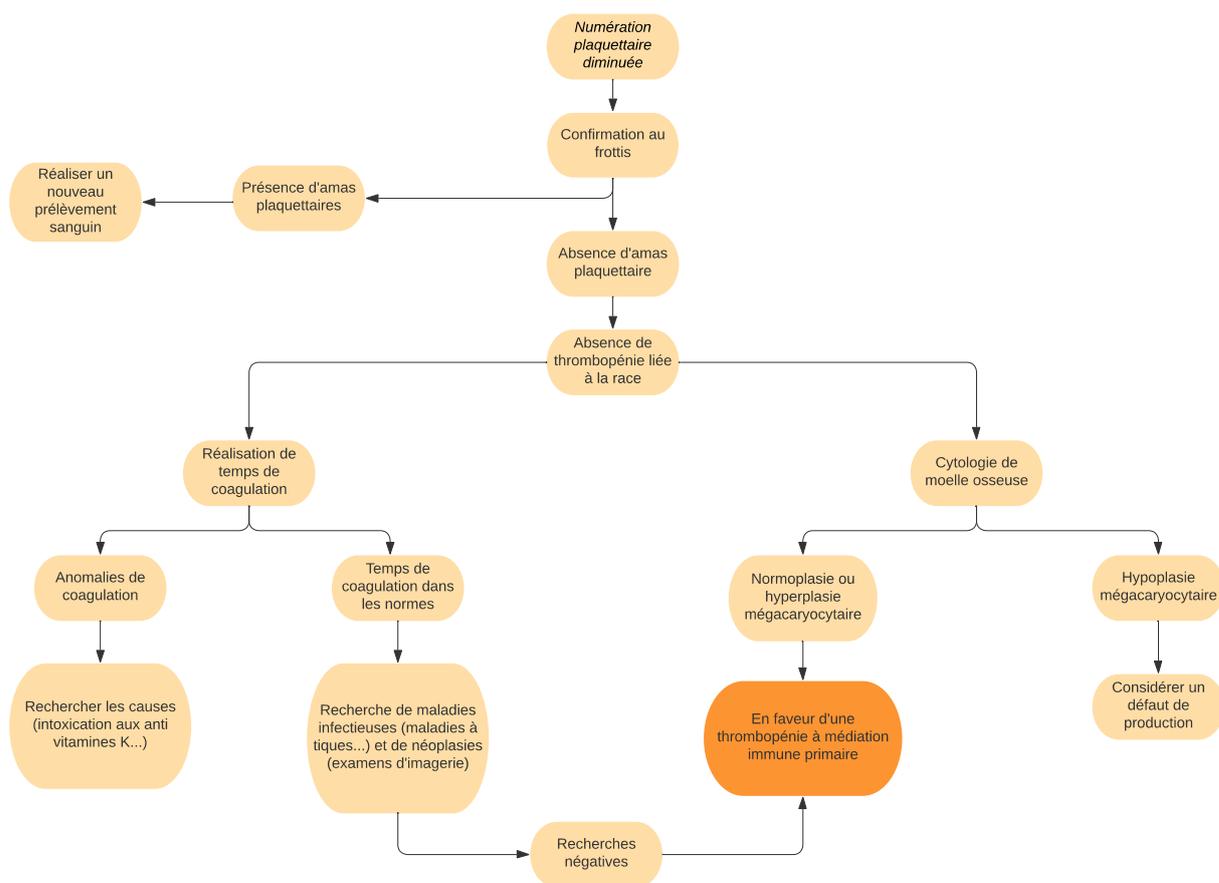
L'établissement de la numération plaquettaire, associée à une confirmation de la thrombopénie par frottis, permet de caractériser cette thrombopénie en informant le VPM (Volume Plaquettaire Moyen) et l'indice plaquettaire (ou plaquettocrite), représentant le pourcentage de volume sanguin occupé par les plaquettes. Ces paramètres peuvent être informatifs concernant l'origine de la thrombopénie. Lors de phénomène primaire, la numération plaquettaire est significativement plus basse que lors de phénomène secondaire : une numération en dessous de 20 000 plaquettes/ μL constitue un élément en faveur d'une TMI primaire (LeVine et Brooks, 2019). En médecine humaine, quelques études ont montré qu'une diminution du VPM orientait également le diagnostic vers une thrombopénie à médiation immune. Cette relation n'est cependant pas prouvée en médecine vétérinaire. Le VPM doit par ailleurs être analysé en prenant en compte les conditions de prélèvement et de stockage des échantillons. En effet, une augmentation artéfactuelle de ce paramètre peut survenir suite à une exposition prolongée à de l'EDTA ou si le prélèvement n'a pas été immédiatement mis en contact avec un anticoagulant, par exemple lorsque les échantillons ne sont pas suffisamment mélangés dans le tube de prélèvement (Brooks *et al.*, 2022).

L'indice plaquettaire se calcule de la manière suivante, permettant d'obtenir un résultat en pourcentage : $\text{Indice plaquettaire} = \text{VPM (en fL)} \times \text{numération plaquettaire (.}10^3/\mu\text{L)} \times 1000$. Chez le Cavalier King Charles, ce paramètre peut permettre d'identifier une pseudothrombopénie associée à la présence de macroplaquettes (Brooks *et al.*, 2022).

- **Analyse de la moelle osseuse**

Les analyses cytologiques de moelle osseuse permettent d'explorer la présence d'une maladie engendrant une diminution de la production de plaquettes par myélodysplasie. Sa réalisation est recommandée lors de multiples cytopénies et lors de faible réponse au traitement. Néanmoins, cet examen est rarement effectué en pratique (Brooks *et al.*, 2022).

Figure 12 : Approche diagnostique de la TMI primaire, schéma modifié d'après Brooks *et al.* (2022)



- **Développement de nouveaux tests à visée diagnostique de la TMI primaire**

La présence d'auto anticorps dirigés contre les plaquettes joue un rôle central dans la TMI primaire, entraînant une destruction des plaquettes liées à ces anticorps. Ils sont principalement dirigés contre les glycoprotéines GPIIb/IIIa (CD41/CD61, récepteurs aux fibrinogène), GPIb/IX (CD 42c/CD42a, récepteurs au facteur de von Willebrand) et GPV (CD42d). En médecine humaine, la spécificité des tests sérologiques pour détecter les anticorps spécifiques de plaquettes, est améliorée dans les tests « *Monoclonal Antibody-specific Immobilization of Platelet Antigen (MAIPA)* » et « *platelet antibody bead array (PABA)* » par rapport au test classique *Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA)*. Ces tests permettent de déterminer la spécificité des anticorps des patients humains atteints de TMI primaire (Metzner *et al.*, 2017). Ils sont basés sur la détection d'un complexe trimoléculaire composé d'un anticorps monoclonal dirigé contre une glycoprotéine plaquettaire définie, les anticorps du patient et la membrane plaquettaire exprimant les épitopes correspondant à ces anticorps. La spécificité du test MAIPA pour le diagnostic de la TMI primaire est de 98%, pour une sensibilité de 81%. Ce manque de sensibilité s'explique par l'absence d'anticorps dirigés contre les plaquettes chez certains patients. Il existe d'autres tests pour détecter les anticorps spécifiques de glycoprotéines plaquettares mais ceux-ci sont à l'heure actuelle, uniquement réalisés pour la recherche et non pour le diagnostic en médecine humaine et vétérinaire.

Il s'agit de la mesure de la désialylation plaquettaire et de la cytométrie en flux et (Brooks *et al.*, 2022).

Les tests de détection d'anticorps dirigés contre les plaquettes par cytométrie en flux chez le chien ont été décrits dans plusieurs études. Bachman *et al.*, (2015) ont réalisé des tests de détection d'anticorps dirigés contre les plaquettes, sur les plaquettes (test direct) et dans le serum (test indirect) par cytométrie en flux. Pour réaliser le test direct, des plaquettes de chiens ont été incubées avec des anticorps dirigés contre des anticorps anti-IgG ou anti-IgM canins liés à un fluorochrome. Pour réaliser le test indirect, des plaquettes de chiens sains ont été incubées avec les sérums à tester puis avec les mêmes anticorps que ceux utilisés pour le test direct. Les plaquettes ont par la suite été analysées par cytométrie en flux dans les deux cas. En combinant les deux tests direct et indirect de détection d'IgG et d'IgM dirigés contre les plaquettes, ils ont déterminé une sensibilité et une spécificité respectivement de 76,5% et de 65,5% pour différencier une TMI primaire d'une TMI secondaire. Pour l'heure, l'utilité de tels tests dans le diagnostic des TMI primaire n'a pas été clairement démontrée due à un manque de sensibilité et de spécificité. L'étude de Dircks *et al.* (2009) s'est intéressée au pourcentage de plaquettes fluorescentes par cytométrie en flux après marquage des plaquettes par des anticorps de chèvre dirigés contre les IgG anti plaquettes canins. Sur 83 animaux atteints de thrombopénie testés dont 13 atteints de TMI primaire, 37 ont présenté un résultat positif (avec un seuil établi à 10%). Sur ces 37 chiens, 12 présentaient une TMI primaire confirmée. Cette étude a également mis en évidence la présence d'anticorps liés aux plaquettes chez des animaux atteints de maladies infectieuses (babésiose, piroplasmose...), inflammatoire (hépatite, syndrome inflammatoire à réponse systémique), néoplasiques (lymphome, sarcome histiocytaire). La cytométrie présentait ainsi dans cette étude, un intérêt dans la mise en évidence d'un phénomène immunitaire en défaveur des plaquettes.

Ces tests de détection d'anticorps ne permettent cependant pas de différencier une TMI primaire d'une TMI secondaire (en cas de maladie à tiques, de phénomène inflammatoire...). Néanmoins, un résultat positif à ce test constitue un élément en faveur d'une thrombopénie à médiation immune et, couplé à d'autres tests, renforce le diagnostic du clinicien. À ce jour, l'indisponibilité sur le marché d'anticorps spécifiques d'autoanticorps dirigés contre les glycoprotéines plaquettaires entrave le développement de ces tests (LeVine et Brooks, 2019).

En médecine humaine, les tests de détection des anticorps liés aux plaquettes ne sont pas utilisés pour établir le diagnostic mais de récentes études mettent en avant leur intérêt dans l'optimisation du traitement et la surveillance de la réponse à celui-ci. Les individus atteints de TMI primaire présentent des anticorps dirigés contre diverses glycoprotéines en quantité variable, modifiant le mécanisme de destruction des plaquettes induit. Pour rappel, les anticorps dirigés contre les glycoprotéines GPIIb/IIIa conduisent à la clairance des plaquettes par le récepteur Fc présents à la surface des macrophages tandis que les anticorps dirigés contre les glycoprotéines GPIb déclenchent la désialylation plaquettaire via la neuraminidase-1 plaquettaire, entraînant une clairance via le récepteur hépatique Ashwell-Morell, la voie normale des plaquettes âgées désialylées. L'absence d'intervention des récepteurs Fc des macrophages dans la destruction des plaquettes chez les patients possédant des anticorps dirigés contre les glycoprotéines GPIb, semble être à l'origine d'une absence de réponse au traitement par immunoglobulines intraveineuses. Ces patients seraient donc plus enclins à répondre à un traitement inhibiteur de la neuraminidase (Brooks *et al.*, 2022).

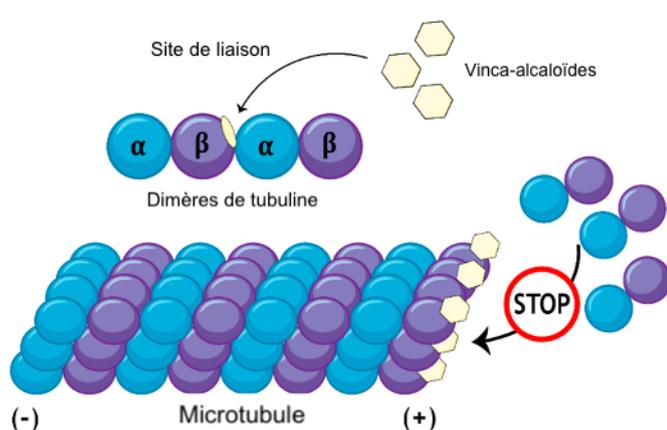
D. Traitement

Chez le chien, le traitement de première intention consiste en l'administration de glucocorticoïdes, le plus souvent de la prednisolone à la dose de 2 mg/kg/j en début de thérapie. L'administration unique quotidienne semble être associée à une plus faible survenue d'effets secondaires qu'une administration fractionnée. Lorsque le chien a retrouvé une numération plaquettaire normale (après 7 à 10 jours de traitement lorsque le patient répond favorablement à cette thérapie), la dose de glucocorticoïdes est diminuée de 25% par semaine jusqu'à atteindre un dosage de 0,5 mg/kg/j pour la prednisolone. Si aucune rechute n'est observée durant 6 mois, le traitement peut être arrêté (Day, 2012 ; Brooks *et al.*, 2022).

a. Utilisation de la vincristine et d'immunoglobulines par voie intraveineuse

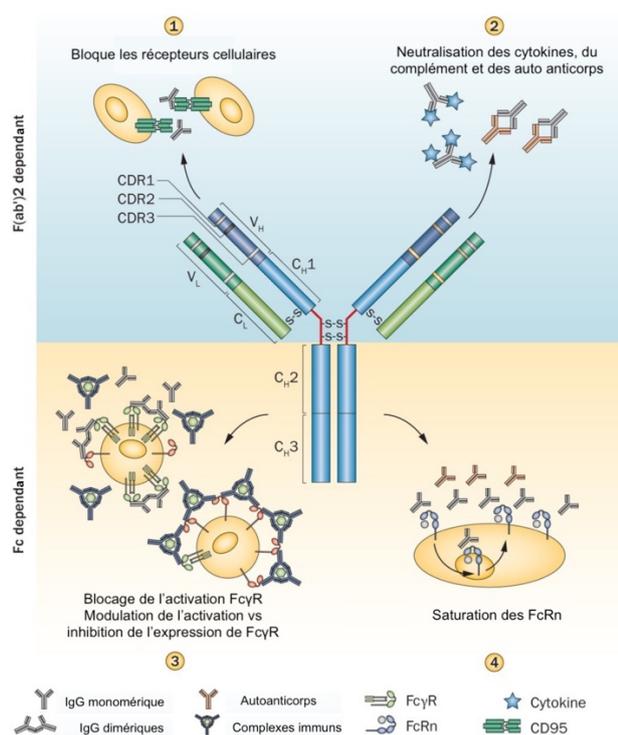
La vincristine appartient à la famille des vinca-alcaloïdes et agit en se liant à la sous-unité β des dimères de tubuline, inhibant ainsi la formation des microtubules et donc du cytosquelette des plaquettes (Figure 13) (Škubník *et al.*, 2021). La vincristine augmenterait la numération plaquettaire en favorisant la thrombopoïèse en accélérant la fragmentation des mégacaryocytes. Elle permettrait également de limiter la dégradation des plaquettes opsonisées (Brooks *et al.*, 2022). La dose utilisée chez le chien est de 0,02 mg/kg par voie intra veineuse en une seule administration. Les chiens y répondant présentent une augmentation de la numération plaquettaire trois à cinq jours après l'administration. Une seconde dose peut être administrée une semaine après la première en cas d'absence de réponse (Day, 2012).

Figure 13 : Mode d'action de la vincristine, d'après Škubník et al. (2021)



Un autre traitement utilisé en médecine humaine est l'injection intraveineuse d'un sérum riche en IgG d'individus sains (hIVIG), dont les propriétés immunomodulatrices ne sont pas parfaitement comprises. Ce serum agit de plusieurs manières, entre autres en saturant les récepteurs Fc des macrophages, en neutralisant les anticorps pathologiques, en inhibant le complément et en diminuant la production de cytokines (Figure 14). Chez l'homme, son utilisation est liée à une diminution des transfusions, un raccourcissement de la durée d'hospitalisation et un meilleur pronostic (Spurlock et Prittie, 2020). Son utilisation chez le chien est peu décrite, les études s'y étant intéressées sont détaillées dans le paragraphe suivant.

Figure 14 : Mode d'action de l'hIVIg, d'après Lünemann *et al.* (2015)



b. Traitement immunosuppresseur : monothérapie ou bithérapie ?

Chez l'homme, il existe un panel de molécules dont l'efficacité a été démontrée dans le traitement de la TMI primaire. Comme indiqué ci-dessus, le traitement de première ligne correspond à l'utilisation de corticoïdes et d'immunoglobulines. En médecine vétérinaire, les données concernant l'efficacité des différents traitements immunomodulateurs et immunosuppresseurs ne sont à l'heure actuelle pas suffisantes pour trancher sur la supériorité de l'ajout de certains traitements d'appoint contre une monothérapie corticoïde. Davantage d'études s'intéressant à ces traitements de la TMI primaire sont ainsi nécessaires. Les doses d'utilisation de l'azathioprine dans les études sont comprises entre 1,5 mg/kg/j et 2 mg/kg/j et celles du mycophénolate mofétil sont comprises entre 14,2 mg/kg/j et 28,8 mg/kg/j (Kristiansen et Nielsen, 2021). Empiriquement, l'utilisation d'un second immunosuppresseur chez le chien est décidée lors de risques importants d'effets secondaires liés aux corticoïdes, lors d'hémorragie marquée nécessitant une transfusion ou lors d'échec au traitement après une semaine de monothérapie corticoïde (Brooks *et al.*, 2022).

L'utilisation d'immunosuppresseurs n'est pas sans risque et des effets secondaires, parfois mortels peuvent être observés, suite à l'apparition de surinfections ou d'aplasie médullaire (LeVine et Brooks, 2019). Parmi ces études, l'essai randomisé contrôlé chez le chien de Bianco *et al.* (2009) montre une diminution significative du temps d'hospitalisation et une augmentation de la vitesse de récupération du taux de plaquettes à court terme lors d'ajout d'immunoglobuline humaine à la dose de 0,5 mg/kg en une injection par voie intraveineuse à une monothérapie corticoïde (prednisolone à une dose comprise entre 1,5 mg/kg et 2 mg/kg deux fois par jour par voie orale ou dexaméthasone à la dose de 0,2 mg/kg à 0,3 mg/kg une fois par jour par voie sous cutanée ou intraveineuse).

Néanmoins, cette même étude ne montre pas de différence significative de récupération totale de la numération plaquettaire et de survie à 6 mois entre ces deux protocoles. Cette absence de différence pouvant provenir d'un manque de puissance de l'étude.

Une étude préliminaire chez le chien évalue les différences entre un groupe recevant un traitement corticoïdes/mycophénolate mofétil et un groupe recevant un traitement corticoïdes/cyclosporine. Dans le premier groupe, les corticoïdes utilisés étaient de la prednisolone dont les doses étaient comprises entre 1,4 mg/kg/j et 3,5 mg/kg/j (ou de la dexaméthasone à la dose comprise entre 0,12 mg/kg/j et 0,18 mg/kg/j) en association avec du mycophénolate mofétil à la dose de 10,7 mg/kg/j à 17,8 mg/kg/j. Dans le second groupe, les corticoïdes utilisés étaient de la prednisolone dont les doses étaient comprises entre 0,5 mg/kg/j et 2 mg/kg/j (ou de la dexaméthasone à la dose comprise entre 0,14 mg/kg/j et 0,29 mg/kg/j) en association avec du mycophénolate mofétil à la dose de 10,7 mg/kg/j à 17,8 mg/kg/j. Ces deux groupes recevaient de la doxycycline à la dose de 10 mg/kg/j par voie orale. Cette étude suggère une quantité moindre d'effets secondaires pour le premier protocole sans différence significative de survie à 30 jours et à 60 jours. Le mycophénolate mofétil, plus accessible et moins coûteux, correspond donc ici au premier choix de traitement adjuvant (Cummings et Rizzo, 2017). Une autre étude, randomisée, s'est intéressée à la différence entre un traitement à base de prednisolone à la dose de 1,5 mg/kg à 2 mg/kg deux fois par jour associé à une injection unique de vincristine à la dose de 0,02 mg/kg ou à une injection unique d'hIVIG à la dose de 0,5 g/kg. Cette étude n'a pas mis en évidence de différence significative entre les deux groupes composés de 10 chiens, bien que 70% des chiens du premier groupe ont survécu contre 100% des chiens du deuxième groupe (Balog *et al.*, 2013).

Ainsi, en médecine vétérinaire, le traitement corticoïde correspond au premier traitement indiqué lors de TMI primaire et l'utilisation d'immunomodulateurs ou d'immunosuppresseurs adjuvants nécessite l'existence d'études plus importantes mettant en évidence l'augmentation du taux de survie et l'innocuité de ces molécules.

c. Procédure de splénectomie

La procédure de splénectomie constitue un traitement de seconde intention chez l'Homme avec un taux de rémission au long terme de 60% (Brooks *et al.*, 2022). Ce traitement a été décrit dans certains cas et aurait permis selon une étude rétrospective chez cinq chiens ayant subi une splénectomie après de multiples rechute de la TMI primaire de favoriser la récupération de la numération plaquettaire. Une rémission a été observée chez quatre de ces chiens chez lesquels un traitement médical n'a pas été nécessaire durant la période d'observation allant de 6 mois à 17 mois (Jans *et al.*, 1990). Néanmoins, les données concernant l'utilisation de cette procédure lors de TMI primaire canine sont encore insuffisantes.

d. Objectifs du traitement

L'*American Society of Hematology* recommande de ne traiter les patients humains que lorsque leur numération plaquettaire est inférieure à 30 000 plaquettes/ μ L ou en cas de saignements actifs. De plus, elle recommande de fixer cette même valeur comme objectif du traitement et non une normalisation de la numération plaquettaire. En médecine vétérinaire, c'est généralement ce deuxième objectif qui est choisi (Neunert *et al.*, 2019).

E. Pronostic

Le pronostic de la TMI primaire est relativement bon chez le chien. La plupart des chiens présentent une numération plaquettaire normale après 5 à 7 jours de traitement. La létalité varie de 10% à 30% selon les études. Entre 9% et 58% des animaux présentent une rechute et nécessitent un traitement immunosuppresseur chronique (Brooks *et al.*, 2022).

Dans une étude s'intéressant à la survie de 45 chiens atteints de TMI primaire pendant un an minimum après le diagnostic de TMI primaire, presque 90% des animaux survivaient en hospitalisation et environ 30% ont présenté une rechute. La médiane de temps entre le diagnostic et la première rechute était de 79 jours et la moitié des chiens présentant une première rechute en ont présenté au moins une seconde. Le temps de normalisation de la numération plaquettaire était significativement plus élevé chez les patients ayant présenté une rechute. Il n'existait pas de différence significative de taux de rechute entre les patients ayant reçu un traitement corticoïde continu et ceux dont la durée du traitement corticoïde était finie (Simpson *et al.*, 2018).

Une étude de 2018 propose un outil permettant de quantifier les saignements des chiens atteints à travers la réalisation d'un score de saignement. Ce score « DOGi-BAT » est à réaliser à l'admission du patient et à monitorer au cours de l'hospitalisation, permettant de grader la sévérité de l'atteinte et d'objectiver la réponse au traitement. Ce score est inversement corrélé à la numération plaquettaire des animaux et positivement corrélé à la durée d'hospitalisation et à la nécessité de la réalisation d'une transfusion. Son utilisation nécessite néanmoins encore une validation (Makielski *et al.*, 2018) (Tableau 1).

Par ailleurs, l'analyse de l'indice plaquettaire, dont le calcul est précisé plus haut, semble être un indicateur plus précoce de réponse au traitement que la numération plaquettaire (Brooks *et al.*, 2022).

Tableau 1 : Nouvel outil d'évaluation du score de saignement chez le chien, d'après Makielski et al. (2018)

Localisation	Score de saignement		
	1	2	3
Cutanée	Non	Pétéchies/ecchymoses sur une région anatomique	Pétéchies/ecchymoses sur plus d'une région anatomique
Saignement au cathéter, au site de prélèvement sanguin	Non	Auto-résolutif et < 5minutes	> 5minutes et/ou nécessitant une intervention
Muqueuse buccale	Non	Pétéchies	Hémorragie franche
Intraoculaire	Non	Visible au fond d'œil	Hyphéma
Épistaxis	Non	Unilatéral et < 5 minutes	Bilatéral et > 5 minutes
Gastro-intestinal	Test de sang occulte négatif ; (Hema-check, Siemens Healthcare Diagnostics Inc., Tarrytown, New York)	Test de sang occulte positif ; (Hema-check, Siemens Healthcare Diagnostics Inc., Tarrytown, New York)	Hématémèse, hématochésie, méléna
Urinaire	Non	Visiblement uniquement à la bandelette urinaire	Visible macroscopiquement
Hémorragie pulmonaire (suspectée/observée)	Non	Non	Présent
Hémorragie intracrânienne (suspectée/observée)	Non	Non	Présent

Chaque région anatomique reçoit une note allant de 0 (absence de saignement) à 2 (saignements marqués). Les notes de chaque site sont additionnées pour donner un score DOGiBAT sur 18.

Comme indiqué plus haut, de nouvelles méthodes permettent de mettre en évidence la présence d'anticorps liés aux plaquettes dans les cas de thrombopénies à médiation immune dont la cytométrie en flux. Cette nouvelle technique directe permet de confirmer la présence d'un phénomène immunitaire en défaveur des plaquettes, et d'aider le clinicien à orienter son diagnostic rapidement, bien qu'elle ne distingue pas encore un processus primaire d'un processus secondaire. Le travail présenté ici avait donc pour but d'adapter les protocoles de purification et de marquage de plaquettes canines déjà décrits dans la littérature, ainsi que l'analyse par cytométrie en flux, au Biopôle, qui possède l'appareil et l'expertise de cette technologie, afin de pouvoir proposer ce test diagnostic dans un futur proche. Cette partie expérimentale de la thèse est décrite dans la seconde partie de ce manuscrit.

Deuxième partie : étude expérimentale

1. Introduction

La TMI primaire est une maladie auto-immune rare, caractérisée par la destruction des plaquettes suite à une perte de la tolérance du soi engendrant la mise en place d'une réponse immunitaire généralement à médiation humorale et pouvant dans certains cas, être également à médiation cellulaire. La production d'anticorps dirigés contre les glycoprotéines membranaires entraîne une destruction des plaquettes par le système phagocytaire mononucléé.

Le diagnostic du caractère primaire de la thrombopénie à médiation immune repose sur l'exclusion des autres causes de thrombopénie. À l'heure actuelle, il n'existe aucun consensus listant les tests à réaliser afin de diagnostiquer cette maladie. Ce diagnostic repose donc pour l'instant, sur l'observation d'un faisceau d'éléments cliniques et paracliniques. La mise en évidence de la thrombopénie associée à l'exclusion d'affections sous-jacentes provoquant une thrombopénie constitue la pierre angulaire de la recherche diagnostique.

L'objectif de ce travail est donc de développer un test direct de mise en évidence par cytométrie en flux, de la présence d'anticorps liés aux plaquettes chez des chiens atteints de thrombopénie afin de confirmer son origine immune. L'observation d'anticorps liés aux plaquettes assure la présence d'un phénomène immun actif, dirigé contre les plaquettes, pouvant être primaire ou bien secondaire à une infection sous-jacente. Sans permettre de différencier le caractère primaire ou secondaire de la thrombopénie à médiation immune, la mise en place d'un tel test permettrait tout de même au clinicien d'orienter son diagnostic en confirmant la présence d'un dysfonctionnement immunitaire en défaveur des plaquettes. Il permettrait dans un second temps, d'affiner le suivi de la maladie et la réponse au traitement en cours d'hospitalisation et lors du suivi au long terme, en monitorant la production d'anticorps dirigés contre les plaquettes. De plus, l'utilisation de la cytométrie en flux permet l'analyse individuelle et ponctuelle d'échantillons, ce qui constitue un critère essentiel dans ce contexte de maladie rare. Plusieurs études ont démontré l'intérêt de cette nouvelle technologie dans la mise en évidence de ces anticorps. Une étude de 2018 propose un protocole afin de réaliser ces expériences (Shropshire et al., 2018). Ce travail a donc pour visée le développement d'un protocole semblable, au laboratoire du Biopôle de l'École Nationale Vétérinaire d'Alfort. Il a reçu l'autorisation du Comité Ethique de Recherche Clinique de l'EnvA sous le numéro 2021-01-06-1.

2. Généralités sur la cytométrie en flux

La cytométrie en flux est une méthode d'analyse des caractéristiques de taille, de granulosité et de fluorescence de particules en suspension. L'utilisation d'anticorps spécifiques permettant l'identification précise des cellules/particules en suspension dans l'échantillon, permet de distinguer cette technique particulière des automates d'hématologie utilisés pour la réalisation de numérations formules sanguines en laboratoire d'analyses vétérinaires, bien qu'ils soient basés sur les mêmes principes de flux et de rencontre avec un faisceau laser.

A. Principe de cytométrie en flux

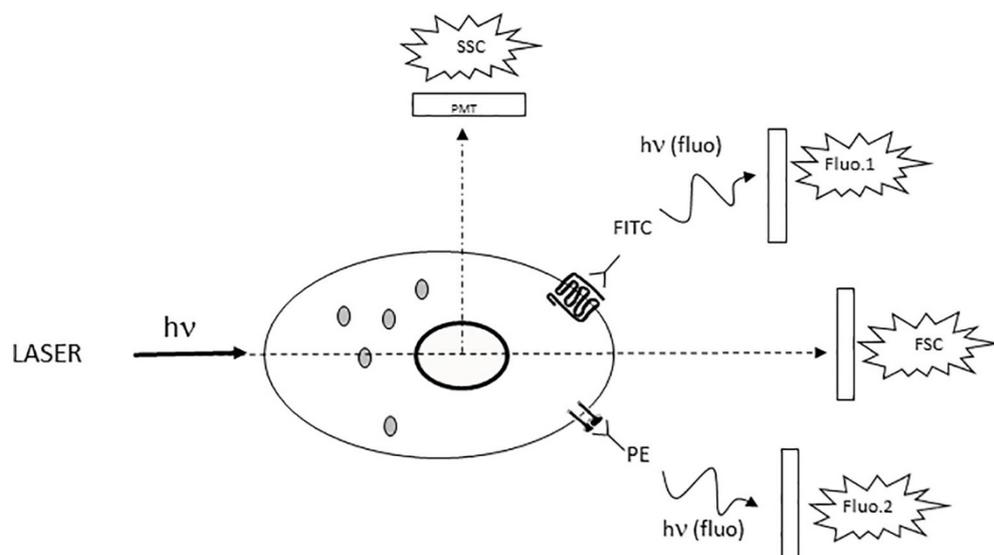
a. Fonctionnement général

Les cellules de l'échantillon sont individualisées et alignées dans une gaine de faible diamètre grâce à un fluide sous pression formant un tube, appelé fluide de gaine. Les cellules traversent cette gaine à une vitesse modulable par l'opérateur et pouvant atteindre 10 000 cellules par seconde. Un système de laser dirige un faisceau lumineux sur les cellules et la diffraction de ce faisceau est analysée grâce à un système de récepteurs qui amplifient et numérisent les données (Zafrani et Monneret, 2017).

b. Données recueillies

La diffusion de la lumière est analysée de deux manières différentes : la diffusion dans l'axe de la source lumineuse et la diffusion perpendiculaire à la source lumineuse. La première, nommée *forward scatter* en anglais (FSC) donne la taille de la cellule. La diffusion à 90° est quant à elle nommée *side scatter* en anglais (SSC) et renseigne la granularité de la cellule (Figure 15).

Figure 15 : Principe général de la cytométrie en flux, d'après Zafrani et Monneret (2017)

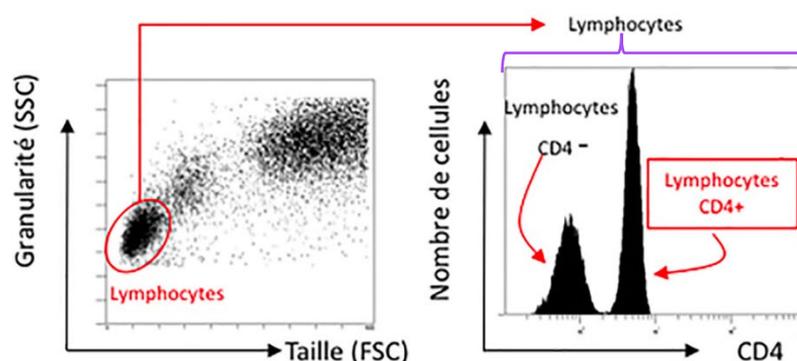


Les cellules analysées sont réparties sur un histogramme présentant la FSC en abscisse et la SSC en ordonnées (Figure 16, histogramme de gauche). Chaque élément est représenté par un point dont l'abscisse correspond donc à sa taille (FSC) et dont l'ordonnée correspond à sa granularité (SSC) (Zafrani et Monneret, 2017).

La cytométrie en flux permet également d'analyser les protéines membranaires de surface des cellules par couplage à un anticorps monoclonal dirigé contre cette molécule (nommée classe de différenciation ou CD). Cet anticorps est lui-même couplé à un fluorochrome, l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) uniquement dans cette étude, mais il existe beaucoup de différents fluorochromes qui peuvent être analysés simultanément par la machine (Zafrani et Monneret, 2017). Lorsque la protéine membranaire recherchée est présente sur la cellule, les anticorps couplés se lient à la surface des cellules (lors de l'étape de marquage décrite plus loin). Après stimulation par le laser, ces fluorochromes émettent de la lumière à une longueur d'onde différente de celle du faisceau excitateur. Cette longueur d'onde est analysée par l'appareil, permettant d'objectiver la présence de la molécule de surface ainsi que de quantifier sa présence en fonction de l'intensité du signal émis. Au contraire, si la molécule est absente de la surface de la cellule, les anticorps ne se lient pas et aucune fluorescence n'est émise (Zafrani et Monneret, 2017).

Ces résultats sont présentés dans un histogramme supplémentaire représentant le nombre de cellules émettrices en fonction de l'intensité de fluorescence émise par chaque cellule et donc du marqueur suivi (Figure 16, histogramme de droite, ici CD4 est le marqueur suivi, permettant d'identifier des lymphocytes T auxiliaires parmi la population de lymphocytes, identifiée et sélectionnée par le rond rouge sur le diagramme de gauche).

Figure 16 : Histogramme taille/granularité (à gauche) associé à un histogramme montrant le nombre de cellules émettrices en fonction l'intensité de fluorescence pour le marqueur CD4 (à droite) (Zafrani et Monneret, 2017).



Les lymphocytes CD4+ ont été marqués avec un anticorps spécifique couplé à un fluorochrome.

Le cytomètre de flux analyse toutes les particules en suspension dans la solution passant dans le fluide de gaine. Ainsi, des cellules ou débris de particules n'intéressant pas l'étude sont analysés tout de même par l'appareil. De plus, des faisceaux de photons aléatoires ne résultant pas de l'interaction du faisceau lumineux émis par le cytomètre avec des particules sont captés par les photodétecteurs. Ces signaux enregistrés par l'appareil constituent ce que l'on appelle le bruit de

fond. Il convient donc de sélectionner les éléments à analyser en constituant une fenêtre d'analyse (communément appelée « gate »).

B. Appareil utilisé

Cette étude a été effectuée à l'aide du cytomètre BD Accuri C6Plus commercialisé par Becton Dickinson (Figure 17). Il est équipé d'un laser bleu émettant à 488 nm, d'un laser rouge émettant à 640 nm, et d'un système de quatre détecteurs de fluorescences avec des filtres optiques optimisés pour la détection de nombreux fluorochromes couramment utilisés. Les données numériques récupérées sont transmises à un ordinateur par l'appareil et interprétées à l'aide du logiciel d'analyse BD Accuri C6 Plus, fourni par la même société. Le cytomètre est contrôlé tous les mois par une personne responsable, et un nettoyage complet de la machine est assuré après chaque utilisation.

Figure 17 : Photographie du cytomètre BD Accuri C6Plus (BD, 2016)



3. Matériels et méthodes

A. Sélection de la cohorte

a. Chiens sains

Afin d'établir une valeur seuil au-dessus de laquelle il serait possible de déterminer la médiation immune d'une thrombocytopénie par cytométrie en flux (Shropshire *et al.*, 2018), une cohorte de 20 chiens « sains » été recrutée au service de médecine préventive du CHUV-AC en 2020 (Centre Hospitalier Universitaire Vétérinaire des Animaux de Compagnie).

Les critères de sélection de chaque chien de cette cohorte étaient les suivants : (i) absence de symptômes, (ii) un examen clinique sans anomalie le jour du prélèvement et (iii) un âge supérieur à 3 mois. La race des animaux ne constituait pas un critère de sélection.

b. Chiens atteints de thrombopénie

Les chiens thrombopéniques ont été recrutés dans l'ensemble des services du CHUV-AC, principalement au service de médecine interne et au service des urgences, au cours des années 2020, 2021 et 2022. Afin de ne pas prélever de sang supplémentaire sur des animaux thrombopéniques pouvant possiblement présenter des troubles de la coagulation, les analyses étaient effectuées sur les prélèvements sanguins réalisés par les cliniciens du CHUV-AC, ayant servis pour d'autres analyses (Numérations Formules Sanguines, mesure des temps de coagulation...). Seule la présence d'une thrombopénie diagnostiquée par NFS et/ou par comptage plaquettaire réalisé sur frottis sanguin constituait un critère d'inclusion dans l'étude. La valeur seuil de numération plaquettaire permettant de détecter une thrombopénie diffère selon les appareils utilisés, mais n'excède pas la valeur de 150 000 plaquettes/ μ L citée plus haut.

Divers examens complémentaires ont été réalisés chez les chiens thrombopéniques au cours de la démarche diagnostique. Ces examens comprennent la réalisation de frottis sanguins, des examens d'imagerie (radiographies, examens tomodensitométriques), des tests de Coombs, des dépistages de maladies à tiques... Les chiens dont les examens n'ont pas permis de mettre en évidence une affection expliquant la thrombopénie, ont été diagnostiqués par défaut « atteints de TMI primaire ». Les examens réalisés sont précisés pour les chiens atteints de TMI primaire dans la description de ces cas dans la partie « 3. Résultats ». Pour chaque animal, le diagnostic retenu pour cette étude est celui présent dans la conclusion du compte rendu clinique validé par le clinicien.

c. Procédure de prélèvement

Les prélèvements ont été effectués à la veine saphène externe ou à la veine jugulaire et l'analyse a été réalisée dans un délai maximal de 8h. Pour cela, un à deux millilitres de sang ont été prélevés sur tube EDTA ou sur tube citraté à l'aide d'une aiguille de 22 G ou 20 G. Les données collectées durant ces expériences n'ont pas été prises en compte dans la démarche diagnostique et les animaux inclus n'ont pas subi de manipulation inutile.

B. Détection des anticorps dirigés contre les plaquettes par cytométrie de flux

a. Isolement et fixation des plaquettes

Les protocoles décrits dans les études ayant mis en évidence la présence d'anticorps anti-plaquettes ont été utilisés lors de ce travail (Dircks *et al.*, 2009 ; Shropshire *et al.*, 2018). Chaque échantillon a été traité dans les 3h suivant le prélèvement ou conservé dans un environnement à 4°C jusqu'à leur utilisation (\leq 8h). Les expériences ont été réalisées par l'auteur de cette thèse pour les animaux sains et une partie des animaux thrombopéniques. La directrice de cette thèse a effectué des expériences cytométrie en flux sur le restant des animaux.

L'objectif de la première partie du protocole est d'obtenir un plasma riche en plaquettes et de fixer les plaquettes ainsi purifiées, afin de limiter l'activation des plaquettes qui pourrait biaiser les résultats. Pour cela, 1ml de sang total citraté ou avec EDTA, est centrifugé durant 10 minutes à une vitesse de 2500 rotations par minute (rpm), sans frein. Le surnageant est prélevé, placé dans un

tube 1,5mL (Eppendorf, France) puis centrifugé 15 minutes à 3500 rpm. Le surnageant obtenu, contenant principalement les protéines sanguines, nommé « plasma pauvre en plaquettes » est récupéré et conservé à -20°C. Le culot obtenu est constitué principalement de plaquettes. Il est dilué dans le restant de surnageant et nommé « plasma riche en plaquettes » ou PRP. Trois cents microlitres (300 µL) de paraformaldehyde (PFA, Thermofisher, France) dilué à 1% dans du phosphate-buffered saline (PBS, Bio-Rad, France) sont ajoutés. Après une incubation de 10 min à température ambiante, les plaquettes fixées sont lavées une première fois par ajout de 500 µL d'une solution de PBS+0,5% Bovine Serum Albumine (BSA, Sigma Aldrich, USA) appelée par la suite « tampon FACS », puis centrifugées pendant 10 minutes à 3500 rpm. Le surnageant est prélevé puis jeté. Le culot est suspendu puis un second lavage est effectué par ajout de 500 µL de tampon FACS puis séparé à volume égal dans deux ou trois nouveaux tubes 1,5mL (Eppendorf, France) en fonction des marquages à effectuer. Deux cents cinquante microlitres (250 µL) de tampon FACS sont ajoutés à chaque eppendorf. Après une centrifugation de 10 minutes à 3500 rpm, le surnageant est pipeté puis jeté et le culot est prêt à être mis au contact des différents anticorps.

b. Marquage des plaquettes

Chaque tube contenant les plaquettes est marqué soit par des anticorps anti-CD61 couplés à la fluorescéine isothiocyanate (FITC) permettant d'identifier les plaquettes par cytométrie de flux (Biorad Antibodies, USA), soit avec des anticorps dirigés contre les immunoglobulines G (IgG) de chiens couplés à la FITC (anti-dog IgG FITC, Jackson Immunoresearch, USA) ou des anticorps dirigés contre les IgG de cheval couplés FITC également, afin d'avoir un contrôle de fixation non spécifique (contrôle négatif du marquage) (anti-horse IgG FITC, Jackson Immunoresearch, USA).

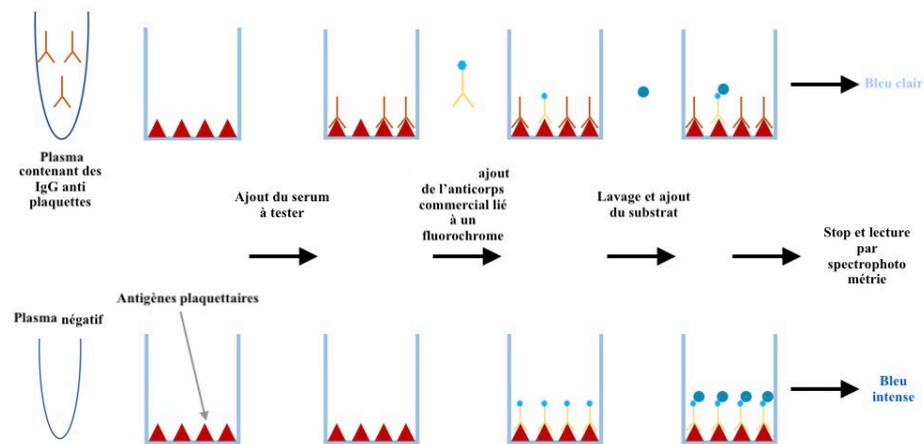
Avant utilisation sur les plaquettes, les différents anticorps sont dilués en tampon FACS. L'anti-CD61-FITC est dilué au 1/20, tandis que les anticorps « anti-dog IgG-FITC » et « anti-horse IgG-FITC » sont dilués au 1/50. Cinquante microlitres (50 µL) de solution de chaque anticorps ainsi dilué, est distribué dans les tubes de 1,5mL contenant les plaquettes. Après une incubation de 30 minutes à température ambiante, les plaquettes marquées sont lavées avec 450 µL de tampon FACS puis centrifugées pendant 10 minutes à 3500 rpm. Le surnageant est jeté et le culot est suspendu. Un deuxième lavage est effectué avec 500 µL de tampon FACS, suivi d'une centrifugation de 10 minutes à 3500 rpm, le surnageant est à nouveau jeté et le culot suspendu avec 400 µL de PBS. Les échantillons sont alors immédiatement analysés par cytométrie en flux.

C. Détection des anticorps dirigés contre les plaquettes par ELISA

Les anticorps anti-plaquettes présents dans le plasma de certains chiens de l'étude (« plasma pauvre en plaquettes »), ont été mesurés à l'aide d'un kit ELISA commercial spécifique (BlueGene, China) en suivant les instructions fournies dans le kit. Les échantillons des chiens atteints de thrombopénie disponibles au moment de l'expérience ont été choisis, ainsi que ceux de chiens sains sélectionnés aléatoirement, à cause de la limite du nombre d'échantillons pouvant être analysés sur la plaque unique du kit. Cette expérience a été réalisée par l'auteur de cette thèse avec l'aide de la directrice. Ce test permet de mettre en évidence de manière semi quantitative la présence

d'anticorps dirigés contre les plaquettes, présents dans le serum ou le plasma des patients par une méthode ELISA de compétition. Le principe de cette technique consiste à incuber des anticorps dirigés contre des IgG canins anti-plaquettes liés à un fluorochrome, mélangés avec le serum ou plasma à tester, sur une plaque dont les puits sont recouverts d'un mélange de protéines de plaquettes canines. Les anticorps dirigés contre des IgG anti-plaquettes canins liés à un fluorochrome fournis avec le kit, entrent en compétition avec les anticorps dirigés contre les IgG anti-plaquettes canins possiblement présents dans le serum ou le plasma à tester et non couplés avec une enzyme. Après incubation, la plaque est rincée et incubée avec le substrat chromogène correspondant à l'enzyme. La réaction enzyme-substrat forme un complexe coloré dont l'intensité est proportionnelle à la quantité d'anticorps couplés dans le puits. Cette coloration est mesurée avec un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 450 nm. Dans le cas d'une ELISA de compétition, plus le signal obtenu est faible, plus le serum ou le plasma testé contient d'anticorps dirigés contre des IgG anti-plaquettes canines (Figure 18).

Figure 18 : Schéma personnel explicatif du protocole ELISA de compétition.



Triangles rouges : antigènes anti plaquettes ; anticorps oranges : anticorps du serum à tester ; anticorps jaunes : anticorps fournis par le kit

Le protocole est le suivant : une plaque dont les 96 puits sont recouverts d'un mélange de protéines plaquettaires canines ont été incubées pendant une heure à 37°C avec les plasmas des chiens de l'étude ou des standards, ainsi qu'avec l'anticorps de compétition anti-plaquettes de chien couplé à une enzyme. Après des lavages et les étapes de révélation utilisant un substrat chromogène, la plaque a été lue à 450nm, sur le lecteur MultiskanFC et analysées avec le logiciel SkanIt Research Edition 4.1 (ThermoFisher Scientific, France), selon les instructions du fabricant. Les analyses ont été effectuées grâce au logiciel GraphPad PRISM 9.3.0 (Dotmatics, USA). L'équation de la courbe standard a permis ensuite de calculer les concentrations en anticorps anti-plaquettes dans les plasmas des chiens testés (n=23).

4. Résultats

A. Étude caractéristique des cohortes

a. Cohorte des chiens sains

La cohorte de chiens sains est composée de dix-neuf individus dont les caractéristiques sont résumées tableau 2 ci-dessous :

Tableau 2 : Caractéristiques des chiens sains

Age moyen (valeurs limites)	4 ans (8 mois – 12 ans)
Femelles	13
Mâles	6
Race	
Terre Neuve	1
Terrier Irlandais	1
Rottweiler	2
Beagle	1
Shar Peï	1
Berger Allemand	2
Berger Australien	1
Cocker anglais	3
Épagneul Breton	1
Chien loup de Saarloos	1
Croisé	4
Total	19

b. Cohorte des chiens thrombopéniques

Treize chiens présentant une thrombopénie ont été prélevés dans le cadre de la recherche diagnostique. Leurs caractéristiques sont présentées tableau 3. Ces échantillons ont été analysés avant qu'un diagnostic ne soit émis.

Tableau 3 : Caractéristiques des chiens thrombopéniques

Age moyen (valeurs limites)	5 ans (7 mois – 11 ans)
Femelles	9
Mâles	4
Race	
Shih Tzu	1
Bouledogue français	1
Whippet	1
Golden Retriever	1
Border Collie	1
Akita Inu	1
Akita américain	1
Berger Allemand	1
Labrador	2
Croisé	3
Total	13

Les différentes affections présentées par les chiens thrombopéniques sont présentées tableau 4. Les chiens suspectés d'être atteints d'une maladie vectorielle ont été classés comme tel par association de plusieurs critères : absence de mise en évidence de cause de thrombopénie aux examens, résolution de la thrombopénie avec la mise en place d'un traitement à base de doxycycline, signes cliniques concordants avec ce type d'infection.

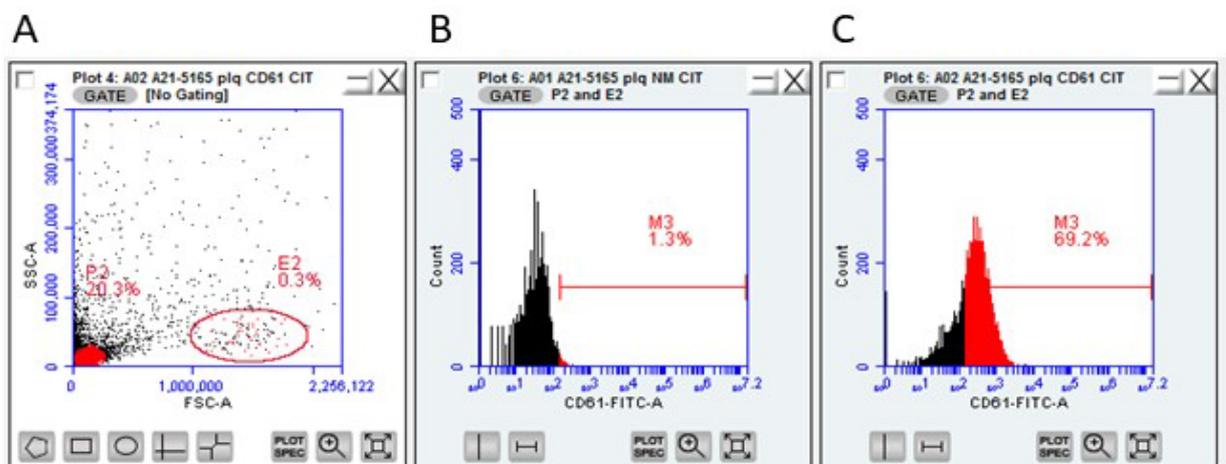
Tableau 4 : Affections présentées par les chiens thrombopéniques

TMI primaire	4
TMI secondaires :	
Piroplasmose	1
Dirofilariose	1
Ehrlichiose	1
Maladie vectorielle suspectée	2
Syndrome méningite artérite	1
Thrombopénie non immunitaire	
CIVD	1
Hémoabdomen (contexte tumoral suspecté)	1
Leucémie aiguë myéloïde	1
Total	13

B. Validation du protocole d'obtention du PRP par cytométrie en flux

La figure 19 représente les résultats de cytométrie en flux d'un échantillon sanguin d'un chien sain pour lequel les plaquettes purifiées selon la technique décrite plus haut, n'ont pas été marquées avec un anticorps (contrôle négatif de la manipulation, histogramme B) ou ont été marquées avec l'anti-CD61 (histogramme C) permettant de distinguer les plaquettes des débris et du bruit de fond électronique de la machine.

Figure 19 : Cytogrammes illustrant la stratégie de « gating » utilisée pour identifier les plaquettes dans les échantillons de PRP.



(A) Taille et granulosité des plaquettes (P2) et autres particules (possiblement quelques globules rouges résiduels en E2) contenues dans le PRP d'un chien sain. (B) Intensité de fluorescence des plaquettes non marquées. (C) Intensité de fluorescence des plaquettes marquées avec l'anti-CD61-FITC

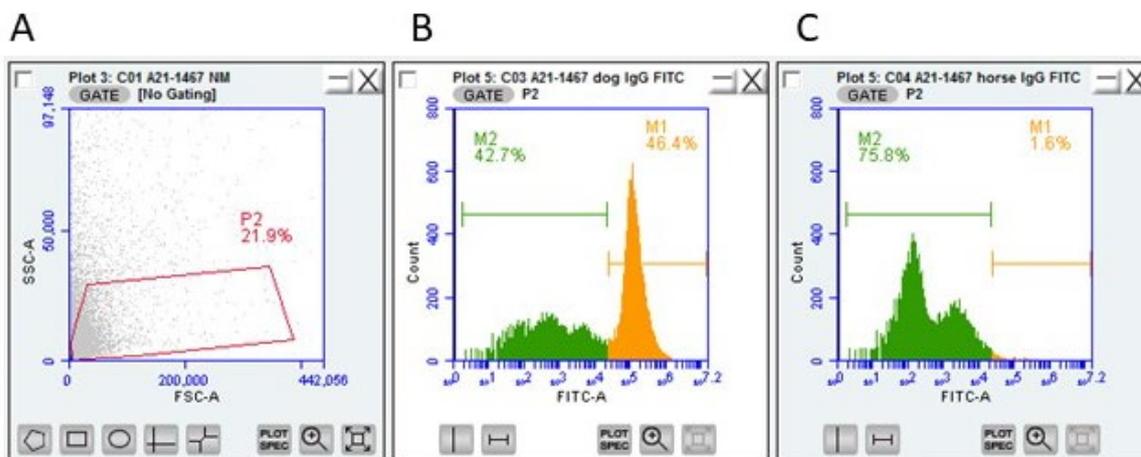
Le marquage avec l'anti-CD61 permet d'identifier les plaquettes parmi les particules contenues dans le PRP. La figure 19 montre clairement que le PRP obtenu dans cet exemple, contient 69,2% de particules CD61+, donc des plaquettes. Cette analyse permet également de valider notre protocole de purification de plaquettes à partir de sang de chien, décrit dans la partie matériel et méthodes.

C. Mise en évidence des anticorps liés aux plaquettes

a. Détection des anticorps liés spécifiquement aux plaquettes

Il existe un risque que les anticorps utilisés dans cette étude, permettant de reconnaître les IgG canins, puissent se lier de manière aspécifique à la surface des plaquettes. Afin de s'assurer que les anticorps anti-IgG de chien sont spécifiquement liés à des IgG présents sur des plaquettes, pour chaque échantillon, un témoin a été réalisé systématiquement en incubant des plaquettes avec des anticorps dirigés contre des IgG de chevaux, couplés au FITC. Ces IgG ne se fixent pas de manière spécifique aux IgG canins et l'existence d'une fluorescence à l'examen par cytométrie traduit une fixation aspécifique. La figure 20 montre un exemple de marquage réalisé sur le PRP d'un chien présentant une TMI secondaire à une maladie à tiques, avec des anticorps anti-IgG de chien et des anticorps anti-IgG de chevaux. Le cytogramme situé au milieu montre le pourcentage de cellules présentant une fluorescence émise par les anticorps anti-IgG canins. Le cytogramme situé à droite montre le pourcentage de cellules présentant une fluorescence émise par les anticorps anti-IgG équins. On observe une fluorescence de 46,4% des cellules marquées par les anticorps anti-IgG canin contre 1,6% des cellules marquées par les anticorps anti-IgG équins. Ceci montre que les anticorps détectés sont bien des anticorps spécifiquement liés aux anticorps présents sur les plaquettes.

Figure 20 : Cytogrammes comparant la détection d'anticorps anti IgG canins et d'anti IgG équins.



(A) Taille et granulosité des particules présentes dans le PRP. P2 contient les plaquettes, l'analyse est donc effectuée uniquement sur cette « gate » P2. (B) Résultat du marquage du PRP avec l'anti-IgG de chien-FITC. (C) Résultat du marquage avec l'anti-IgG de cheval. M2 identifie les plaquettes non marquées et M1 les plaquettes FITC positives.

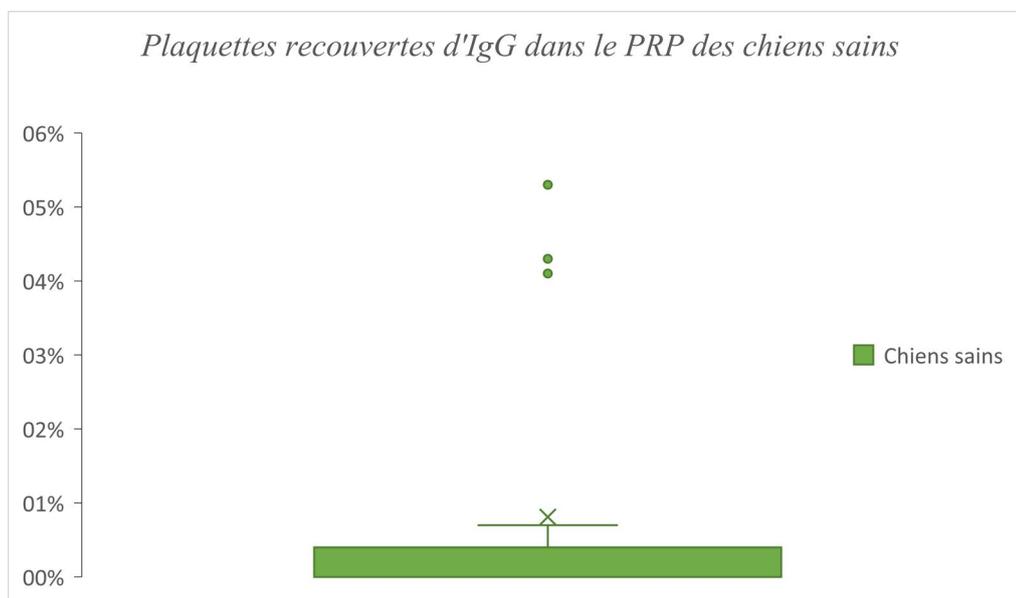
Dans l'exemple montré en figure 20, les anticorps reconnaissant les IgG de chevaux ne se fixent pas sur les plaquettes ou très peu (seulement 1,6% de plaquettes positives). Cette valeur représente le bruit de fond de fluorescence de l'expérience, c'est-à-dire qu'il est possible de considérer qu'1,6% des plaquettes de cet échantillon sont sûrement marquées de façon aspécifique avec les anti-IgG de chiens puisqu'elles sont aussi marquées avec les anti-IgG de chevaux. Pour chaque échantillon, la valeur obtenue avec l'anti-IgG de cheval a été ôtée du pourcentage de plaquettes fluorescentes. Ainsi, ce chien présente 46,4% de plaquettes recouvertes d'anticorps anti-IgG de chien, confirmant la présence d'IgG sur les plaquettes, possiblement responsables de la thrombopénie.

Sur tous les échantillons testés, la moyenne de la fluorescence observée avec l'anti-IgG de cheval était de 1,7%. Cette valeur a par la suite été soustraite aux valeurs de fluorescence obtenus avec les anticorps anti-IgG canins.

b. Résultats chez les chiens sains

Un total de 19 chiens sains a été inclus dans cette étude. Les résultats de l'analyse de la fluorescence par cytométrie en flux après incubation du PRP avec des anticorps dirigés contre des IgG canins possiblement présentes sur les plaquettes, sont présentés figure 21 et tableau 5.

Figure 21 : Diagramme en boîte montrant le pourcentage de plaquettes fluorescentes (FITC+) des chiens sains marquées avec l'anticorps anti-IgG canins



Les limites des boîtes indiquent le premier et le troisième quartile, l'extrémité des barres verticales indique le premier et le neuvième décile, les points indiquent les valeurs éloignées de la moyenne, et la croix indique la valeur de la moyenne.

Tableau 5 : Valeurs statistiques associées à la figure 21

Effectif	Moyenne	Minimum	Maximum	Écart-type
19	0,8%	0 %	5,3 %	1,7 %

Dans le PRP des chiens sains, le pourcentage de plaquettes fluorescentes moyen est de 0,8%. 12 chiens présentent une fluorescence de 0% et 3 chiens présentent une fluorescence supérieure à 4%. Tous les chiens sains présentent des valeurs de fluorescence inférieure au seuil de positivité de ce test, établi à 10% par les travaux de Shropshire *et al.* (2018).

c. Résultats des chiens atteints de TMI primaire

Un total de 4 chiens a été diagnostiqué d'une TMI primaire au cours de la période durant laquelle ces expériences ont été effectuées. Ce faible effectif, expliqué par la rareté de la maladie, ne permet pas d'effectuer des tests statistiques pertinents. Chaque animal sera donc présenté de manière individuelle.

- Chien atteint de TMI primaire n°1

Les caractéristiques de ce chien sont présentées tableau 6.

Tableau 6 : Caractéristiques du chien atteint de TMI primaire n°1

	Chien atteint de TMI primaire n°1
Signalement	Shih Tzu femelle entière de 2 ans
Signes cliniques	Dysorexie, abattement, vomissements, méléna, pétéchies et suffusions (dos, cuisses, membres, museau), hématochésie, hémorragies sclérales bilatérales
Examens complémentaires effectués d'intérêt pour la recherche de cause de thrombopénie	NFS, frottis, test d'agglutination, échographie abdominale, radiographies thoraciques, biochimie, ionogramme, mesure des temps de coagulation, bilan de recherche des maladies à tiques (SNAP 4DX®), recherche antigénique d' <i>angiostrongylus</i>
Numération Formule sanguine	Thrombopénie marquée (4000 plaquettes/ μ L) Anémie macrocytaire hypochrome régénérative (16,4% d'hématocrite) Leucocytose monocytaire, neutrophilique et lymphocytaire
Traitement reçu avant analyse cytométrique	Injection de dexaméthasone retard deux jours auparavant à dose inconnue
Résultat de l'analyse par cytométrie en flux (en pourcentage de plaquettes FITC+)	54 % <i>Le PRP testé montre que 54% des plaquettes de ce chien sont recouvertes d'IgG.</i>
Traitement reçu (hors fluidothérapie et traitement symptomatique)	Dexaméthasone à dose immunosuppressive (0,25 mg/kg IV SID), Mycophénolate mofétil à la dose de 10 mg/kg PO BID, Doxycycline à la dose de 10mg/kg PO SID, Fenbendazole à la dose de 50 mg/kg SID
Devenir de l'animal	Procédure de fin de vie au 9 ^{ème} jour d'hospitalisation au vu de la dégradation de l'état général de l'animal

- Chien atteint de TMI primaire n°2

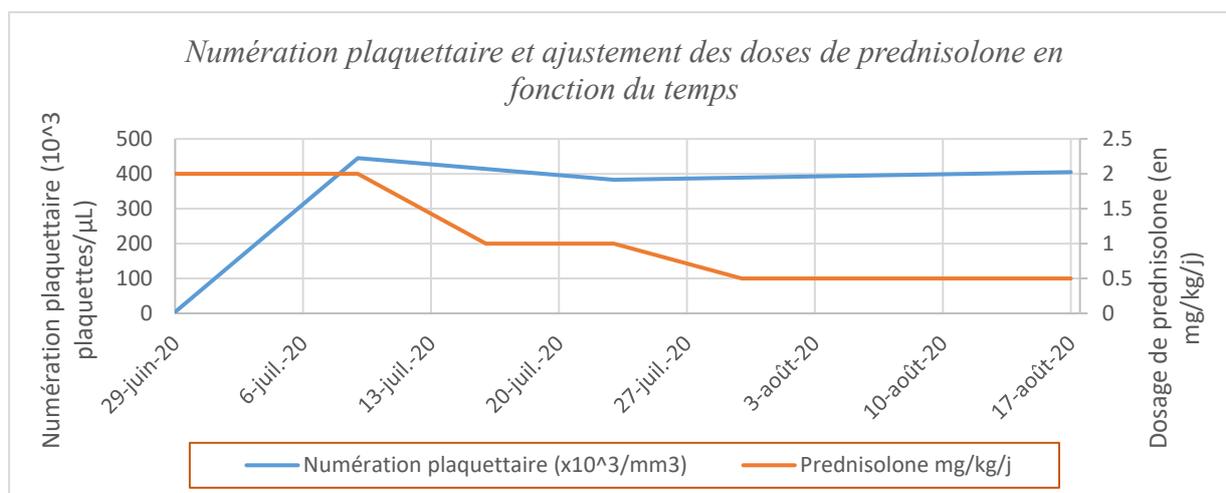
Les caractéristiques de ce chien sont présentées tableau 7. Il est à noter que l'échantillon présentait une quantité de plaquettes faible à l'analyse cytométrique, possiblement à cause d'une erreur de manipulation, pouvant entraîner un défaut de fluorescence.

Tableau 7 : Caractéristiques du chien atteint de TMI primaire n°2

	Chien atteint de TMI primaire n°2
Signalement	Bouledogue Français femelle entière de 10 ans
Signes cliniques	Hématochésie, rares pétéchies
Examens complémentaires effectués d'intérêt pour la recherche de cause de thrombopénie	NFS, frottis sanguin, myélogramme, bilan de recherche des maladies à tiques (SNAP 4DX®), recherche antigénique d' <i>angiostrongylus</i> , recherche d'anaplasma par PCR, échographie abdominale, radiographies thoraciques, endoscopie digestive
Numération Formule sanguine	Thrombopénie marquée (4000 plaquettes/ μ L)
Traitement reçu avant analyse cytométrique	Traitement au métronidazole à dose inconnue
Résultat de l'analyse par cytométrie en flux (en pourcentage de plaquettes FITC+)	8,7% <i>Le PRP testé montre que 8,7% des plaquettes de ce chien sont recouvertes d'IgG.</i>
Traitement reçu (hors fluidothérapie et traitement symptomatique)	Dexaméthasone à la dose de 0,2 mg/kg IM SID puis prednisolone à la dose de 1 mg/kg PO BID pendant 6 semaines Métronidazole à la dose de 15 mg/kg PO BID puis Doxycycline à la dose de 10 mg/kg PO SID
Devenir de l'animal	Rétablissement de la numération plaquettaire 10 jours après mise en place du traitement

Cet animal a présenté une normalisation de la numération plaquettaire lors de la mise en place du traitement immunomodulateur. L'ajustement de ce traitement ainsi que la réponse hématologique du patient sont présentés figure 22.

Figure 22 : Représentation de l'évolution de la numération plaquettaire et du traitement corticoïde en fonction du temps



- Chien atteint de TMI primaire n°3

Les caractéristiques de ce chien sont présentées tableau 8.

Tableau 8 : Caractéristiques du chien atteint de TMI primaire n°3

	Chien atteint de TMI primaire n°3
Signalement	Chien croisé griffon femelle stérilisée de 10 ans
Signes cliniques	Épistaxis bilatérale
Examens complémentaires effectués d'intérêt pour la recherche de cause de thrombopénie	NFS, frottis sanguin, biochimie sanguine, mesure des temps de coagulation, test de recherche des maladies à tiques (SNAP 4DX®), sérologie angiostrongylose, scanner crâne et thorax, rhinoscopie, échographie abdominale, mesure de pression artérielle
Numération Formule sanguine	Thrombopénie marquée (1000 plaquettes/ μ L)
Traitement reçu avant analyse cytométrique	Aucun
Résultat de l'analyse par cytométrie en flux (en pourcentage de plaquettes FITC+)	17,8% <i>Le PRP testé montre que 17,8% des plaquettes de ce chien sont recouvertes d'IgG.</i>
Traitement reçu (hors fluidothérapie et traitement symptomatique)	Dexaméthasone à la dose de 0,4 mg/kg IV SID puis prednisolone à la dose de 0,8 mg/kg PO BID pendant 15 jours Fenbendazole à la dose de 20 mg/kg PO SID Doxycycline à la dose de 10 mg/kg PO SID
Devenir de l'animal	Augmentation de la numération plaquettaire après une journée en hospitalisation avec une numération plaquettaire à 120 000 plaquettes/ μ L. Animal perdu de vue après la sortie d'hospitalisation

- Chien atteint de TMI primaire n°4

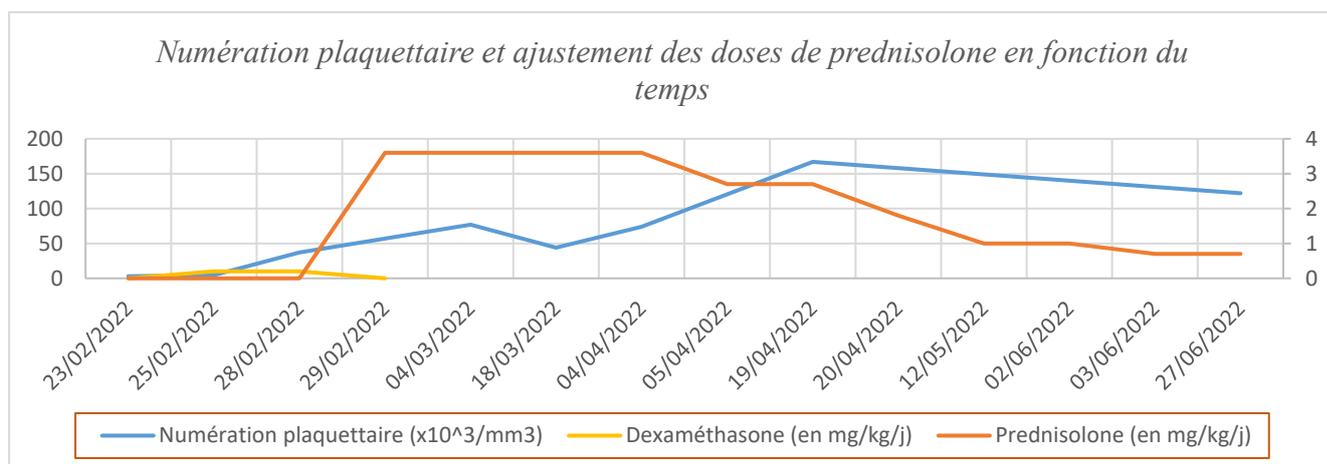
Les caractéristiques de ce chien sont présentées tableau 9. L'échantillon sanguin de cet animal présentait un caillot sanguin formé dans le tube. Le prélèvement ne pouvant être réitéré pour des raisons éthiques, il a été choisi de l'analyser tout de même.

Tableau 9 : Caractéristiques du chien atteint de TMI primaire n°4

	Chien atteint de TMI primaire n°4
Signalement	Akita Inu femelle stérilisée de 3 ans
Signes cliniques	Abattement, anorexie, hyperthermie à 40°C, pétéchies en région abdominale et sur les muqueuses buccales, muqueuses pâles,
Examens complémentaires effectués d'intérêt pour la recherche de cause de thrombopénie	NFS, frottis sanguin, bilan de recherche des maladies à tiques (recherche PCR de <i>babesia spp.</i> , <i>ehrlichia spp.</i> , <i>anaplasma spp.</i> , <i>hepatozoon canis</i> et sérologie <i>anaplasma</i> , <i>borrelia</i> et <i>ehrlichia</i>), biochimie sanguine, ionogramme sanguin, mesure des temps de coagulation, échographie abdominale, radiographies thoraciques, myélogramme
Numération Formule sanguine	Thrombopénie marquée (3000 plaquettes/ μ L) Anémie hypochrome normocytaire (hématocrite 24%)
Traitement reçu avant analyse cytométrique	Aucun
Résultat de l'analyse par cytométrie en flux (en pourcentage de plaquettes FITC+)	4,3% <i>Le PRP testé montre que 4,3% des plaquettes de ce chien sont recouvertes d'IgG.</i>
Traitement reçu (hors fluidothérapie et traitement symptomatique)	Dexaméthasone à la dose de 0,2 mg/kg IV SID puis prednisolone à la dose de 1,4 mg/kg PO BID Doxycycline à la dose de 10 mg/kg PO SID
Devenir de l'animal	Décès de l'animal plusieurs mois après sa sortie d'hospitalisation (cause inconnue)

Ce chien a présenté une réponse moyennement satisfaisante au traitement après sa sortie d'hospitalisation. La figure 23 présente l'évolution de la numération plaquettaire au cours du temps et l'adaptation du traitement corticoïde mis en place.

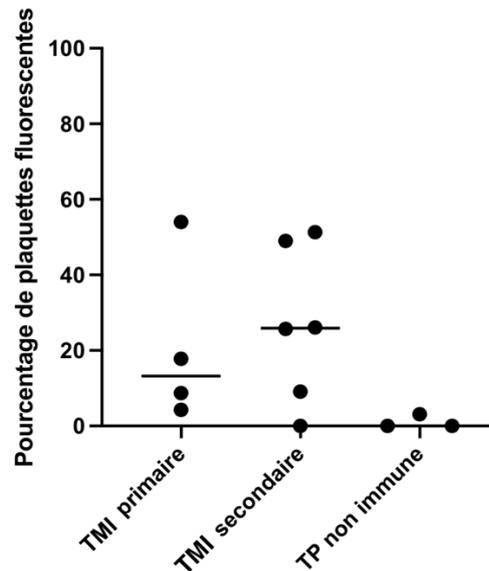
Figure 23 : Représentation de l'évolution de la numération plaquettaire et du traitement corticoïde en fonction du temps



d. Résultats chez les chiens atteints de thrombopénies

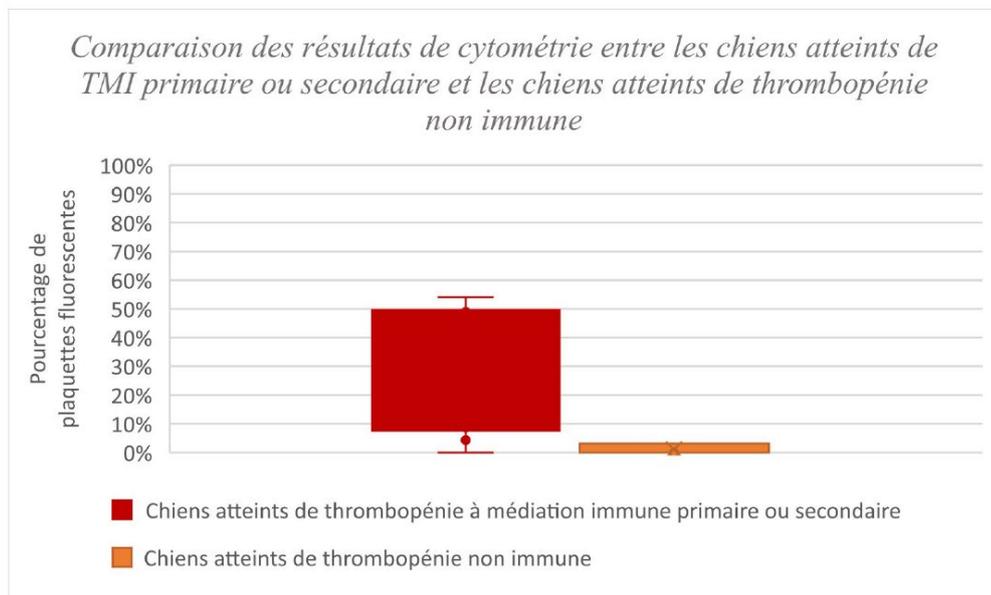
Les résultats obtenus chez les chiens thrombopéniques sont présentés figure 24. Comme expliqué dans la partie introductive, l'analyse en cytométrie en flux de la présence d'IgG sur les plaquettes des chiens ne peut pas identifier la cause primaire ou secondaire de la thrombopénie. Cependant, les résultats du test obtenu dans le PRP des chiens atteints de thrombopénie diagnostiquée par d'autres tests cliniques et paracliniques à la suite de notre analyse, ont été comparés aux résultats des PRP de chiens atteints de thrombopénie, diagnostiquée comme « non à médiation immune ». Cette comparaison est présentée dans la figure 25 ci-dessous.

Figure 24 : Résultats individuels chez les chiens thrombopéniques d'origine immune primaire ou secondaire, ou non immune



Chaque échantillon est représenté par un point, les barres horizontales montrent la moyenne de chaque catégorie

Figure 25 : Diagrammes en boîte montrant le pourcentage de plaquettes fluorescentes (FITC+) des chiens atteints de thrombopénie marquées avec l'anticorps anti-IgG canins



Les résultats montrent une valeur moyenne de 28% de plaquettes présentant des IgG à leur surface, chez les chiens atteints de TMI, qu'elle soit primaire ou secondaire. Ces valeurs sont clairement au dessus de la valeur seuil de 10% établie par Shropshire *et al.* (2018) pour deux des chiens atteints de TMI primaire et quatre des chiens atteints de TMI secondaire. Un PRP de chien

atteint de TMI secondaire présentait un taux de fluorescence de 0% tandis que les autres chiens atteints de TMI secondaire montraient des valeurs nettement supérieures à la valeur moyenne qui a été obtenue chez les chiens sains d'environ 1,3%.

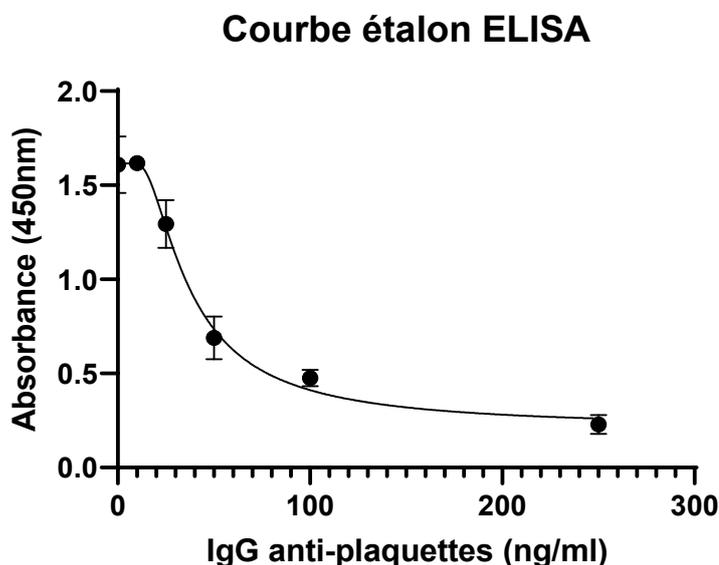
Cette valeur moyenne est de 1% chez les chiens présentant une thrombopénie diagnostiquée comme non immune par d'autres tests cliniques et paracliniques et est donc du même ordre de grandeur que la moyenne obtenue chez les chiens sains.

D. Concordance des résultats de cytométrie en flux comparés aux résultats du test ELISA

Afin de tester si la technique par cytométrie de flux est équivalente à un test ELISA pour la détection d'anticorps circulants dirigés contre les plaquettes, certains plasmas de chiens qui ont pu être conservés, ont été testés par cette technique dans notre étude.

Des sérums étalons de concentrations connues en anticorps anti-plaquettes de chien, fournis avec le kit, permettent de construire une courbe d'étalonnage de l'absorbance en fonction du titre en anticorps. Le logiciel GraphPad Prism calcule ensuite à partir de cette courbe étalon, la concentration en IgG anti-plaquettes canine de chaque échantillon testé (Figure 26). Il est à noter que la modélisation obtenue s'approche d'une modélisation linéaire uniquement pour une concentration maximale d'environ 60 ng/ml. Les concentrations estimées supérieures à cette valeur sont donc difficilement interprétables.

Figure 26 : Courbe étalon construite à partir des sérums étalons



a. Résultats chez les chiens sains

Le kit ELISA ne permettant que l'analyse d'un nombre défini d'échantillons, seuls certains échantillons ont été analysés par cette méthode. Ceux-ci ont été choisis aléatoirement parmi les échantillons ayant été analysés par cytométrie. Les résultats sont présentés figure 27 et tableau 10.

Figure 27 : Diagramme en boîte présentant les concentrations en anticorps anti plaquettes présents dans les sérums des patients sains calculés par méthode ELISA

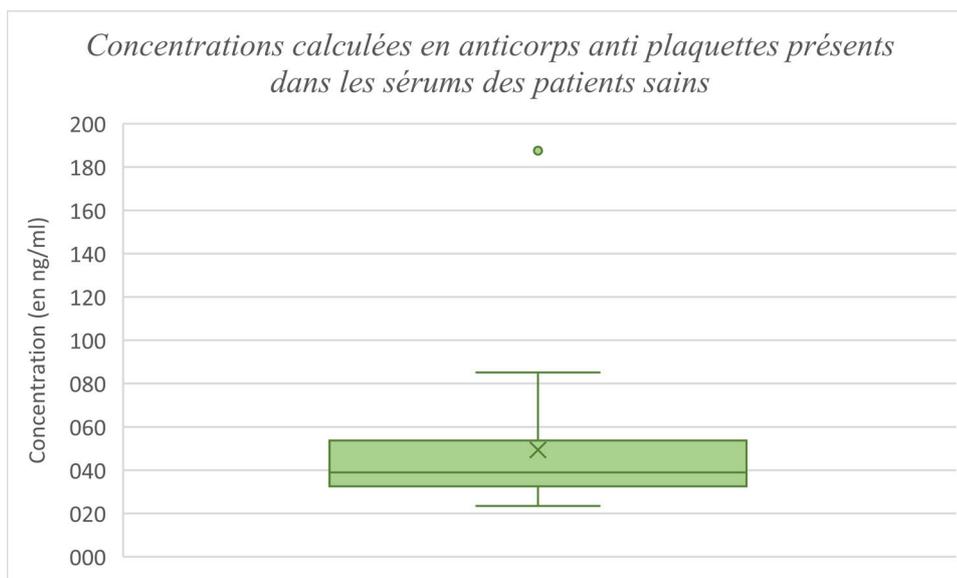


Tableau 10 : Valeurs statistiques correspondant à la figure 27

Effectif	Moyenne	Minimum	Maximum	Écart-type
19	49,37 ng/ml	23,49 ng/ml	187,52 ng/ml	33,8 ng/ml

On peut observer la présence d'un échantillon présentant une concentration en anticorps anti plaquettes très élevée estimée à 187,52 ng/ml. Ce même échantillon présentait une fluorescence de 0% à l'analyse par cytométrie en flux.

Afin d'apprécier l'éventualité d'une concordance entre les résultats de cytométrie et les résultats ELISA, un graphique regroupant les résultats est présenté figure 28, traduit en tableaux de contingence (Tableau 11 et Tableau 12).

b. Résultats chez les chiens atteints de TMI primaire

Deux échantillons ont été analysés par cette méthode. Les résultats sont présentés tableau 13. Les deux chiens présentant des TMI primaire présentent de faibles concentrations d'anticorps dirigés contre les plaquettes par analyse ELISA, mais non nulles.

Tableau 13 : Résultats de cytométrie et de méthode ELISA des chiens atteints de TMI primaire

	Chien n°1	Chien n°2
Cytométrie en flux (en pourcentage d'éléments fluorescents)	54,0 %	8,7 %
ELISA (en ng/ml)	20,4	30,4

5. Discussion

Ce travail avait pour objectif d'étudier la possibilité de mettre en évidence la présence d'anticorps liés aux plaquettes dans le cadre de la thrombopénie à médiation immune primaire canine au Biopôle, le laboratoire d'analyses vétérinaires de l'École Nationale Vétérinaire d'Alfort. Afin d'isoler les plaquettes des prélèvements sanguins et de marquer celles-ci avec les anticorps, le protocole utilisé dans les études de Dircks *et al.* (2009) et Shropshire *et al.* (2018) a été appliqué.

Le protocole de purification des plaquettes à partir des échantillons de sang total de chien a été validé par un marquage des plaquettes enrichies dans le PRP, par un anticorps anti-CD61, spécifique des plaquettes. En plus de valider la préparation du PRP avec une majorité de plaquettes présentes dans l'échantillon, ce marquage avec l'anti-CD61 a également permis de créer la « *gate* » adaptée à l'observation des plaquettes sur les cytogrammes d'analyses. L'utilisation de cet anticorps est retrouvé dans ce même but dans l'étude de Wills *et al.* (2006) et celle de Bachman *et al.* (2015).

On note néanmoins une fluorescence des plaquettes comprises dans cette « *gate* » CD61+, inférieure à 100%. Ceci peut être expliqué de deux manières. Premièrement, les plaquettes étant des particules de petite taille comparées aux autres cellules du sang, le « *gating* » utilisé entraîne la possible prise en compte de débris cellulaires. Deuxièmement, les anticorps anti-CD61 sont dirigés contre des glycoprotéines plaquettaires de porcs. Bien que le laboratoire produisant ces anticorps valide leur utilisation chez le chien, ce facteur peut possiblement intervenir négativement dans la fixation aux plaquettes par diminution de l'affinité des anticorps pour leur antigène.

Lors de cette étude, nous avons choisi d'analyser les échantillons sanguins le jour même de leur prélèvement afin de limiter l'influence du temps sur la fluorescence et limiter au maximum la possibilité d'activation des plaquettes qui pourraient affecter le marquage et donc l'analyse par cytométrie en flux. En effet, l'étude de Wilkerson *et al.* (2006) montre une augmentation artéfactuelle d'un facteur 3 à 7 de la fluorescence des échantillons stockés pendant 24h à 72h comparée à ceux analysés dans les 24h suivant le prélèvement. Il est néanmoins intéressant de noter que l'étude de Shropshire *et al.* (2018) montre quant à elle, une très faible variation des taux de fluorescence jusque 72h après le prélèvement de chiens thrombopéniques lorsque les échantillons ont été stockés à une température de 4°C. Dans cette même étude, les échantillons des chiens sains étaient stables durant 48h mais présentaient une diminution significative de fluorescence après 72h de conservation. Cependant, dans notre étude, afin d'éviter au maximum l'activation des plaquettes, en plus de réduire le temps entre le prélèvement et le marquage, les plaquettes ont été fixées avec de la PFA, conformément au protocole de Spurgeon et Naseem, (2020) avant le marquage avec les anticorps.

La liaison aspécifique des anticorps aux plaquettes ainsi que le bruit de fond de fluorescence ont été ici évalués en marquant les plaquettes avec un anticorps reconnaissant les IgG de chevaux couplé au FITC. Son utilisation dans un tel but n'est pas retrouvée dans la littérature mais la faible fluorescence (en moyenne 1,6%) observée lors de nos expériences suggère qu'il constitue un anticorps de choix dans la réalisation d'un contrôle de marquage aspécifique, utile pour mesurer la fixation spécifique d'anticorps anti-IgG de chiens, produits chez la chèvre, tout comme les anti-IgG de chevaux. Cependant, d'autres anticorps peuvent être utilisés comme contrôle négatif en cytométrie de flux, pour des plaquettes, notamment un anticorps dirigé contre l'amylase humaine par exemple (Bachman *et al.*, 2015).

L'étude de Shropshire *et al.* (2018) fixe un seuil de positivité en cytométrie en flux pour les plaquettes recouvertes d'IgG, égal à 10%. Nos expériences montrent que l'intégralité des échantillons sanguins provenant de chiens sains présentaient une fluorescence inférieure à 6% en cytométrie en flux et peuvent donc être qualifiés de négatifs à ce test. De façon intéressante, la moyenne de fluorescence des chiens atteints de thrombopénie était quant à elle, supérieure au seuil de 10% et largement supérieure à la moyenne des chiens sains, peu importe l'origine de la thrombopénie, confirmant ainsi la valeur de 10% établie dans l'étude de Shropshire. La détection d'anticorps sur les plaquettes de chiens atteints de causes différentes de thrombopénie peut s'expliquer, chez les chiens atteints de thrombopénie à médiation immune secondaire par la production d'anticorps secondaire à l'infection ou à la maladie sous-jacente. En effet, il a été montré, que 47% des chiens atteints de TMI secondaire à une infection présentaient un résultat positif en cytométrie en flux, avec une moyenne de positivité atteignant 17%. De plus, 15% des 27 individus atteints de TMI secondaire à une néoplasie, étaient positifs à ce test (Shropshire *et al.* 2020).

Dans notre étude, les chiens atteints de thrombopénie d'origine non auto-immune ont montré une fluorescence du même ordre de grandeur que les chiens sains, et ainsi bien inférieure au seuil de positivité de 10%. Néanmoins, il est à noter que l'effectif de cette cohorte était faible. La détection d'anticorps liés aux plaquettes chez des chiens atteints de thrombopénie d'origine non auto-immune a été observée dans l'étude de Shropshire *et al.* (2020) dans laquelle 11% (4 sur 36) de ces chiens présentaient un résultat positif. Ces chiens étaient cependant principalement atteints de dérèglement du système immunitaire puisqu'ils présentaient également une anémie à médiation immune (2 chiens), une neutropénie à médiation immune ou une aplasie médullaire secondaire à un traitement à base de chlorambucil.

Le faible effectif de la cohorte des chiens atteints de TMI primaire (4 individus) ne nous permettait malheureusement pas de réaliser une analyse statistique des résultats. Deux de ces chiens présentaient une fluorescence supérieure au seuil de positivité de 10%, dont un présentant une valeur très élevée à 54%. Les deux autres individus testés présentaient des valeurs inférieures au seuil de positivité mais supérieures à la moyenne des animaux sains. L'échantillon révélant le pourcentage de fluorescence le plus bas (4,3%), présentait un caillot dans le tube de prélèvement sanguin, probablement à l'origine de ce résultat suite à l'activation des plaquettes ainsi qu'à leur rareté dans le PRP obtenu. Le second chien, présentant une fluorescence de 8,7%, présentait quant à lui une faible quantité de plaquettes à l'analyse cytométrique, possiblement à cause d'une erreur de manipulation, probablement à l'origine d'une diminution artéfactuelle de la fluorescence. L'incidence de la numération plaquettaire est décrite dans l'étude de Bachman *et al.* (2015) dans laquelle une nette diminution de la fixation des anticorps anti-CD61 est observée dans les échantillons contenant peu de plaquettes comparé aux échantillons de chiens sains. La survenue de faux négatifs peut également être secondaire à une erreur de manipulation, un diagnostic de TMI primaire erroné ou un lavage des anticorps liés aux plaquettes lors de l'étape de marquage.

Ainsi, le protocole établi semble permettre de différencier les animaux atteints de TMI, qu'elle soit primaire ou secondaire, des animaux atteints de thrombopénie d'origine différente. Il n'y a cependant pas de différence de fluorescence entre les TMI primaire et secondaire, dû à la présence d'anticorps dans ces deux cas de figure. L'absence de positivité en cytométrie en flux des échantillons provenant de chiens suspects de TMI primaire ne permet par ailleurs pas d'exclure cette hypothèse.

Dans cette présente étude, un test ELISA provenant du commerce a été utilisé afin de comparer les résultats obtenus par cytométrie avec ceux d'un test considéré souvent comme un test « de référence ». Néanmoins, ce test a montré une absence nette de corrélation avec les résultats de cytométrie. Ce test, réservé à un usage de recherche, n'est par ailleurs pas cité dans la littérature. Chez l'homme, différentes études ont utilisé un test ELISA en vue de détecter la présence d'anticorps dirigés spécifiquement contre les plaquettes. L'étude de Winiarski et Ekelund (1986) a rapporté un taux de positivité de 64% chez les patients humains atteints de TMI primaire chronique et de 48% chez les patients atteints de TMI primaires aiguës (un résultat était défini positif s'il était supérieur à la moyenne plus deux écarts types des résultats des chiens sains). Une étude plus récente, qualifiée à faible risque de biais par l'étude de Schmidt *et al.* (2020), montre une sensibilité de ce test pour les patients atteints de TMI primaire aiguë et chronique respectivement de 81% et 61% (Fu *et al.*, 2019). La sensibilité et la spécificité imparfaites de ce test peuvent expliquer l'absence de corrélation des résultats. Afin de pouvoir comparer les deux techniques, et valider la cytométrie de flux pour la détection d'anticorps présents sur les plaquettes, il est essentiel d'augmenter les effectifs à la fois des chiens sains et des chiens atteints de thrombocytopenie à médiation immune et également non immune, maintenant que le protocole d'obtention du PRP et du marquage des plaquettes sont validés ainsi que l'analyse des échantillons par cytométrie en flux.

Conclusion

La thrombopénie à médiation immune primaire canine est une maladie rare caractérisée par une destruction des plaquettes de l'individu atteint, ainsi que par une production diminuée de ces cellules. La compréhension de sa pathogénie est en constant développement, en médecine humaine comme en médecine vétérinaire. En effet, le mécanisme de cette affection est complexe. Il met en jeu une dysrégulation du système immunitaire associée à des facteurs génétiques favorisants et un évènement déclenchant, souvent supposé infectieux et presque toujours non identifié. La prédisposition génétique a été prouvée chez l'homme mais n'a pas été prouvée chez le chien, bien que certaines races soient rapportées comme prédisposées à cette maladie (Cocker Spaniel, bobtail...). La réponse immunitaire associée fait intervenir plusieurs types cellulaires. L'importance de la réaction de chaque type cellulaire (lymphocytes B, lymphocytes T, lymphocytes régulateurs...) varie selon les individus d'une même espèce. Le mécanisme le plus observé est celui de la production d'IgG dirigées contre les protéines plaquettaires, principalement les complexes GPIIb/IIIa, récepteurs au fibrinogène (80% des patients humains) et Ib/IX, récepteurs au facteur de Von Willebrand (20% à 40% des patients humains). La liaison des anticorps anti-GPIIb/IIIa aux plaquettes entraîne leur dégradation par les cellules du système phagocytaire mononucléé, tandis que les anticorps anti-GPIb entraînent leur destruction par le récepteur Ashwell-Morell présent sur les hépatocytes. Cependant, il a été démontré chez l'homme que jusqu'à 40% des patients ne développaient pas d'anticorps anti-plaquettaires. La réponse immunitaire est dans ce cas médiée par des lymphocytes T cytotoxiques. La destruction des plaquettes s'accompagne chez l'homme d'un taux de TPO paradoxalement faible au vu de la thrombopénie. L'absence de test permettant la mesure de TPO chez le chien ne permet pas de confirmer cette hypothèse dans cette espèce.

La thrombopénie à médiation immune primaire se distingue des thrombopénies à médiation immune secondaire dans lesquelles la production d'anticorps dirigés contre les plaquettes fait suite à une affection sous-jacente. Cette affection peut être infectieuse, inflammatoire, néoplasique, secondaire à l'administration d'un médicament ou bien post transfusionnelle. Déterminer le caractère primaire d'une thrombopénie à médiation immune est un défi pour le clinicien car il repose sur un diagnostic d'exclusion, c'est-à-dire que les nombreuses causes de thrombopénies doivent être recherchées et exclues afin d'émettre un diagnostic de TMI primaire. Il n'existe pour l'heure aucun consensus décrivant les tests à effectuer afin d'établir ce diagnostic.

Au vu de la difficulté diagnostique de cette maladie, de nombreuses études se sont intéressées à la réalisation d'un test permettant de mettre en évidence la présence d'anticorps dirigés contre les plaquettes. Des tests permettant de mettre en évidence les anticorps dans le serum par méthode ELISA ont été développés mais montrent une sensibilité inférieure aux tests les détectant sur les plaquettes. Ces derniers correspondent à une détection par cytométrie en flux d'anticorps liés aux plaquettes. Ce présent travail avait pour but de déterminer la possibilité de réaliser ce test au laboratoire du Biopôle présent sur le site de l'École Nationale Vétérinaire d'Alfort. Pour cela, les travaux de Shropshire *et al.* (2018) ont été adaptés. Le sang de 13 chiens thrombopéniques présentés à l'EnvA prélevés à des fins diagnostiques, a été récupéré et traité afin d'isoler un plasma riche en plaquettes, conformément au protocole de Spurgeon et Naseem (2020). Les plaquettes ont par la suite été marquées par des anticorps liés à de l'isothiocyanate de fluorescéine et dirigés contre des IgG de chiens. Les échantillons ont été ensuite analysés par cytométrie de flux afin d'apprécier la présence d'anticorps IgG liés aux plaquettes chez ces chiens.

La liaison aspécifique des anticorps anti-IgG de chien a été évaluée en incubant les échantillons avec des anticorps dirigés contre des IgG de chevaux. La moyenne de fluorescence observée avec ces anticorps était de 1,6%, validant leur utilisation comme témoin de bruit de fond de fluorescence et de liaison aspécifique. Ces résultats ont été comparés à ceux d'échantillons de chiens sains ayant subi le même protocole. L'intégralité des chiens sains présentait un pourcentage de fluorescence inférieur à 6% et pouvaient ainsi être qualifiés de négatifs à ce test selon le seuil de positivité de 10% fixé par l'étude de Shropshire *et al.* (2018). Chez les chiens atteints de thrombopénies à médiation immune primaire ou secondaire, les résultats montrent une valeur moyenne de 28% de plaquettes présentant des IgG, soit une valeur supérieure au seuil de positivité. Sur les quatre chiens atteints de TMI primaire intégrés à cette étude, deux présentaient un résultat positif. Les deux autres échantillons présentaient un pourcentage supérieur à la moyenne des chiens sains mais inférieur au seuil de 10%. La présence de faux négatifs peut s'expliquer par un diagnostic de TMI primaire erroné, un lavage des anticorps liés aux plaquettes lors de l'étape de marquage, voire une erreur de manipulation. Le protocole établi semble donc permettre de différencier les chiens atteints de thrombopénie à médiation immune de chiens atteints de thrombopénie d'origine différente. Aucune différence de fluorescence n'a été observée entre les chiens atteints de TMI primaire ou secondaire.

Une comparaison avec un test ELISA réservé à la recherche, a été effectuée afin de comparer les résultats obtenus par cytométrie avec un « test de référence ». La littérature montre une sensibilité de ce test inférieure à la détection d'anticorps liés aux plaquettes par cytométrie en flux. Ici, aucune corrélation n'a cependant été mise en évidence entre les deux tests.

Ainsi, le travail présenté valide le protocole d'isolement du plasma canin riche en plaquettes et de marquage des plaquettes à l'aide d'anticorps spécifiques. Il valide également la possibilité de détecter les anticorps liés aux plaquettes chez les chiens atteints de thrombopénies à médiation immune par cytométrie en flux. Un effectif plus important de chiens sains et atteints de thrombopénies immunes et non immunes est cependant nécessaire afin de confirmer statistiquement l'intérêt de ce test dans la distinction des thrombopénies à médiation immune de celles d'origine différente.

Liste des références bibliographiques

- BACHMAN D.E., FORMAN M.A., HOSTUTLER R.A., *et al.* (2015) Prospective diagnostic accuracy evaluation and clinical utilization of a modified assay for platelet-associated immunoglobulin in thrombocytopenic and nonthrombocytopenic dogs. *Vet. Clin. Pathol.* 44(3), 355-368
- BALOG K., HUANG A.A., SUM S.O., *et al.* (2013) A Prospective Randomized Clinical Trial of Vincristine versus Human Intravenous Immunoglobulin for Acute Adjunctive Management of Presumptive Primary Immune-Mediated Thrombocytopenia in Dogs. *J. Vet. Intern. Med.* 27(3), 536-541
- BD (2016) BD Accuri™ C6 Plus Flow Cytometer. In *bdbiosciences.com*. [<https://www.bdbiosciences.com/en-us/products/instruments/flow-cytometers/research-cell-analyzers/bd-accuri-c6-plus>] (consulté le 16/10/2022).
- BIANCO D., ARMSTRONG P.J., WASHABAU R.J. (2009) A Prospective, Randomized, Double-Blinded, Placebo-Controlled Study of Human Intravenous Immunoglobulin for the Acute Management of Presumptive Primary Immune-Mediated Thrombocytopenia in Dogs. *J. Vet. Intern. Med.* 23(5), 1071-1078
- BROOKS M.B., HARR K.E., SEELIG D.M., *et al.* (2022) Schalm's Veterinary Hematology, 7^e ed. Hoboken, John Wiley and Sons
- CINES D., BLANCHETTE V. (2002) Immune Thrombocytopenic Purpura. *N. Engl. J. Med.* 346, 995-1008
- CONSOLINI R., LEGITIMO A., CAPARELLO M.C. (2016) The Centenary of Immune Thrombocytopenia – Part 1: Revising Nomenclature and Pathogenesis. *Front. Pediatr.* 4, 102
- CUMMINGS F.O., RIZZO S.A. (2017) Treatment of presumptive primary immune-mediated thrombocytopenia with mycophenolate mofetil versus cyclosporine in dogs: Treatment of immune-mediated thrombocytopenia dogs. *J. Small Anim. Pract.* 58(2), 96-102
- DAY M.J. (2012) BSAVA Manual of canine and feline haematology and transfusion medicine, 2nd ed. Gloucester, British Small Animal Veterinary Association
- DIRCKS B.H., SCHUBERTH H.-J., MISCHKE R. (2009) Underlying diseases and clinicopathologic variables of thrombocytopenic dogs with and without platelet-bound antibodies detected by use of a flow cytometric assay: 83 cases (2004–2006). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 235(8), 960-966
- FU L., MA J, CHENG Z., *et al.* (2019) Platelet-specific antibodies and differences in their expression in childhood immune thrombocytopenic purpura predicts clinical progression. *Pediatr. Investig.* 2(4), 230-235
- HUANG A.A., MOORE G.E., SCOTT-MONCRIEFF J.C. (2012) Idiopathic Immune-Mediated Thrombocytopenia and Recent Vaccination in Dogs. *J. Vet. Intern. Med.* 26(1), 142-148
- JACKSON M.L. (2013) Veterinary Clinical Pathology: An Introduction, 3^e ed. Hoboken, Wiley-Blackwell.
- JANS H.E., ARMSTRONG P.J., PRICE G.S. (1990) Therapy of Immune Mediated Thrombocytopenia. *J. Vet. Intern. Med.* 4(1), 4-7
- KRAPF R. (2016) «Promotion de la relève» chez les plaquettes sanguines. *Forum Méd. Suisse – Swiss Med. Forum* 16(03), 57

- KRISTENSEN A.T., WEISS D.J., KLAUSNER J.S. (1994) Platelet Dysfunction Associated With Immune-Mediated Thrombocytopenia in Dogs. *J. Vet. Intern. Med.* 8(5), 323-327
- KRISTIANSEN P.S., NIELSEN L.N. (2021) Immunomodulatory and immunosuppressive drug protocols in the treatment of canine primary immune thrombocytopenia, a scoping review. *Acta Vet. Scand.* 63(1), 54
- LÉON C., DUPUIS A., GACHET C., LANZA F. (2015) Apport des modèles murins dans les thrombopénies constitutionnelles. *Hématologie* 21(5), 262-279
- LEVINE D.N., BROOKS M.B. (2019) Immune thrombocytopenia (ITP): Pathophysiology update and diagnostic dilemmas. *Vet. Clin. Pathol.* 48 Suppl 1, 17-28
- LI J., VAN DER WAL D.E., ZHU G., *et al.* (2015) Desialylation is a mechanism of Fc-independent platelet clearance and a therapeutic target in immune thrombocytopenia. *Nat. Commun.* 6, 7737
- LÜNEMANN J.D., NIMMERJAHN F., DALAKAS M.C. (2015) Intravenous immunoglobulin in neurology—mode of action and clinical efficacy. *Nat. Rev. Neurol.* 11(2), 80-89
- MAKIELSKI K.M., BROOKS M.B., WANG C., *et al.* (2018) Development and implementation of a novel immune thrombocytopenia bleeding score for dogs. *J. Vet. Intern. Med.* 32(3), 1041-1050
- METZNER K., BAUER J., PONZI H., UJCICH A., CURTIS B.R. (2017) Detection and identification of platelet antibodies using a sensitive multiplex assay system—platelet antibody bead array. *Transfusion (Paris)* 57(7), 1724-1733
- MHEMO (2018) MHEMO Filière de santé maladies hémorragiques rares. In *MHEMO.fr*. [<https://mhemofr.fr/les-pathologies/les-pathologies-plaquettaires/>] (consulté le 27/09/2022).
- NAEINI M.B., BIANCONI V., PIRRO M., SAHEBKAR A. (2020) The role of phosphatidylserine recognition receptors in multiple biological functions. *Cell. Mol. Biol. Lett.* 25, 23
- NEUNERT C., TERRELL D.R., ARNOLD D.M., *et al.* (2019) American Society of Hematology 2019 guidelines for immune thrombocytopenia. *Blood Adv.* 3(23), 3829-3866
- ROBERTSON S., MILLER M. (2018) Ambient air pollution and thrombosis. *Part. Fibre Toxicol.* 15, doi: 10.1186/s12989-017-0237-x
- SCHMIDT D.E., LAKERVELD A.J., HEITINK-POLLÉ K.M.J., *et al.* (2020) Anti-platelet antibody immunoassays in childhood immune thrombocytopenia: a systematic review. *Vox Sang.* 115(4), 323-333
- SCOTT M.A., KAISER L., DAVIS J.M., SCHWARTZ K.A. (2002) Development of a sensitive immunoradiometric assay for detection of platelet surface-associated immunoglobulins in thrombocytopenic dogs. *Am. J. Vet. Res.* 63(1), 124-129
- SHROPSHIRE S., DOW S., LAPPIN M. (2018) Validation of a clinically applicable flow cytometric assay for the detection of immunoglobulin associated platelets in dogs. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 202, 109-114
- SHROPSHIRE S., DOW S., LAPPIN M. (2020) Detection and dynamics of anti-platelet antibodies in thrombocytopenic dogs with and without idiopathic immune thrombocytopenia. *J. Vet. Intern. Med.* 34(2), 700-709
- SIMPSON K., CHAPMAN P., KLAG A. (2018) Long-term outcome of primary immune-mediated thrombocytopenia in dogs. *J. Small Anim. Pract.* 59(11), 674-680

- ŠKUBNÍK J., PAVLÍČKOVÁ V.S., RUML T., RIMPELOVÁ S. (2021) Vincristine in Combination Therapy of Cancer: Emerging Trends in Clinics. *Biology* 10(9), 849
- SPURGEON B.E.J., NASEEM K.M. (2020) Phosphoflow cytometry and barcoding in blood platelets: Technical and analytical considerations. *Cytometry B Clin. Cytom.* 98(2), 123-130
- SPURLOCK N., PRITTIE J. (2020) Use of Human Intravenous Immunoglobulin in Veterinary Clinical Practice. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract., Emergency and Critical Care of Small Animals* 50(6), 1371-1383
- THEMES, U.F.O. (2017) Blood disease. In *basicmedicalkey.com*. [<https://basicmedicalkey.com/blood-disease/>] (consulté le 27/09/2022).
- WILLS T.B., WARDROP K.J., MEYERS K.M. (2006) Detection of activated platelets in canine blood by use of flow cytometry. *Am. J. Vet. Res.* 67(1), 56-63
- WINIARSKI J., EKELUND E. (1986) Antibody binding to platelet antigens in acute and chronic idiopathic thrombocytopenic purpura: a platelet membrane ELISA for the detection of antiplatelet antibodies in serum. *Clin. Exp. Immunol.* 63(2), 459-465
- ZAFRANI, L., MONNERET, G. (2017) Comprendre la cytométrie en flux. *Méd. Intensive Réa* vol. 26, n° 6, p. 517-522. doi: 10.1007/s13546-017-1317-5

LES THROMBOCYTOPÉNIES À MÉDIATION IMMUNE - MISE AU POINT D'UN TEST PAR CYTOMÉTRIE EN FLUX POUR DÉTECTER LA PRÉSENCE D'ANTICORPS ANTI-PLAQUETTES CANINES

AUTEUR : Sébastien BERNARD

RÉSUMÉ :

La thrombopénie à médiation immune primaire est une maladie rare dont la compréhension de sa pathogénie évolue rapidement et est aujourd'hui connue pour être le résultat d'une combinaison d'une réponse immunitaire à médiation humorale et cellulaire en défaveur des plaquettes et des mégacaryocytes. Elle est à distinguer des thrombopénies à médiation immunes secondaires, à une néoplasie, une infection, un processus inflammatoire ou une réaction médicamenteuse. Le diagnostic de cette maladie peut représenter un défi pour le clinicien car il constitue un diagnostic d'exclusion qui de plus, est chronophage. La détection d'anticorps liés aux plaquettes permettrait de mettre en évidence l'existence d'un processus dysimmunitaire primaire ou secondaire et plusieurs études ont mis au point un protocole permettant de détecter ces anticorps par cytométrie en flux. Le but de ce travail est donc de développer un protocole adapté au Biopôle, laboratoire d'analyses vétérinaires présent sur le site de l'École Nationale Vétérinaire d'Alfort, et de confronter les résultats à ceux d'un test ELISA permettant de mettre en évidence les anticorps dirigés contre les plaquettes dans le plasma des patients. Une analyse de cytométrie en flux directe a donc été effectuée sur 19 chiens sains et 14 chiens atteints de thrombopénie, dont 4 atteints de thrombopénie à médiation immune primaire. Les analyses de cytométrie ont été réalisées après isolement d'un plasma riche en plaquettes (PRP) et marquage par des anticorps anti-IgG canins. Un seuil de positivité égal à 10% de plaquettes fluorescentes par analyse cytométrique, mis en place par l'étude de Shropshire *et al.* (2018), a été choisi. L'intégralité des échantillons des chiens sains a présenté un résultat inférieur à 6%. Ces échantillons ont donc été qualifiés de négatifs, la moyenne de fluorescence étant de 1,6%. La moyenne de fluorescence des plaquettes des échantillons de chiens atteints de thrombopénies à médiation immune, toute causes confondues, était de 28%, soit fortement supérieure à celle des chiens sains. Trois prélèvements de chiens atteints de thrombopénie non immune ont été analysés et ont présenté une moyenne de fluorescence de 1%. Les faibles effectifs des chiens atteints de thrombopénie n'ont pas permis de réaliser d'analyses statistiques, ni d'observer une corrélation avec le test ELISA, mais les résultats de cytométrie de flux semblent montrer une différence notable de fluorescence chez les chiens atteints de thrombopénies à médiation immune par rapport aux autres causes de thrombopénies et aux chiens sains. Cette étude a donc permis de valider le protocole d'isolement du PRP et de marquage des plaquettes par les anticorps. De plus grands effectifs sont à présent nécessaires pour valider la cytométrie de flux pour la détection d'anticorps liés aux plaquettes.

MOTS CLÉS :

CYTOMÉTRIE EN FLUX, THROMBOPÉNIE AUTO IMMUNE, ELISA, ANTICORPS ANTI PLAQUETTES, CHIEN, MALADIE À MÉDIATION IMMUNE, IMMUNOLOGIE

JURY :

Président : Pr BELLIER Sylvain

Directrice de thèse : Dr LE ROUX Delphine

Examinateur 1 : Dr DESHUIILLERS Pierre

Examinatrice 2 : Dr BENCHEKROUN Ghita

PRIMARY IMMUNE-MEDIATED THROMBOPENIA – DEVELOPMENT OF A CLINICAL APPLICABLE FLOW CYTOMETRIC ASSAY FOR THE DETECTION OF PLATELET-BOUND ANTIBODIES IN DOGS

AUTHOR: Sébastien BERNARD

SUMMARY:

Autoimmune thrombocytopenia is a rare disease whose pathogenesis is rapidly evolving and is now known to be the result of a combination of a humoral and cellular immune response against platelets and megakaryocytes. It must be distinguished from immune-mediated thrombocytopenia secondary to neoplasia, infection, inflammatory processes or drug reactions. The diagnosis of this disease can be challenging for the clinician as it is a diagnosis of exclusion and is time consuming. The detection of platelet-bound antibodies would reveal the existence of a primary or secondary dysimmune process and several studies have developed a protocol to detect these antibodies by flow cytometry. The aim of this work is therefore to develop a protocol adapted to the Biopôle, a veterinary analysis laboratory located at the National Veterinary School of Alfort, and to compare the results with those of an ELISA test used to detect antibodies directed against platelets in the plasma of patients. Direct flow cytometry analysis was therefore performed on 19 healthy dogs and 14 dogs with thrombocytopenia, including 4 with primary immune-mediated thrombocytopenia. Cytometric analyses were performed after isolation of platelet-rich plasma (PRP) and labeling with anti-canine IgG antibodies. A threshold of positivity equal to 10% of fluorescent platelets by flow cytometry analysis, set up by the study of Shropshire et al. (2018), was chosen. All the samples from the healthy dogs showed fluorescence levels under 6% and were therefore labeled negative, with an average fluorescence of 1.6%. The average platelet fluorescence of the samples from dogs with immune-mediated thrombocytopenia from all causes was 28%, significantly higher than that of the healthy dogs. Three samples from dogs with nonimmune thrombocytopenia were analyzed and showed an average fluorescence of 1%. The small numbers of dogs with thrombocytopenia did not allow any statistical analysis or correlation with the ELISA, but the flow cytometry results appear to show a significant difference in fluorescence in dogs with immune-mediated thrombocytopenia compared with other causes of thrombocytopenia and healthy dogs. This study therefore, validated the protocol for isolation of PRP and labeling of platelets with antibodies. Larger numbers of samples are now needed to validate flow cytometry for the detection of canine platelet-bound antibodies.

KEYWORDS:

FLOW CYTOMETRIE, IMMUNE-MEDIATED THROMBOPENIA, ELISA, PLATELET-BOUND ANTIBODIES, DOG

JURY:

Chairperson: Pr BELLIER Sylvain

Thesis Director: Dr LE ROUX Delphine

Reviewer 1: Dr DESHUIILLERS Pierre

Reviewer 2: Dr BENCHEKROUN Ghita