

Immunologie plaquettaire

Anne Delsalle
TACT oct 2013

Antigènes plaquettaires

- Antigènes des systèmes
 - ABO, P, Le
 - HLA Classe 1 A, B, C
- Antigènes plaquettaires spécifiques
 - HPA (Human Platelet Antigen)

Antigènes plaquettaires

- Glycoprotéines majeures

- GP IIbIIIa

(R) Fibrinogène
Fibronectine
Vitronectine
vWf

- GP IbIX

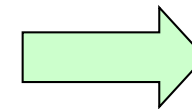
(R) vWf

- GP IaIIa

(R) Collagène

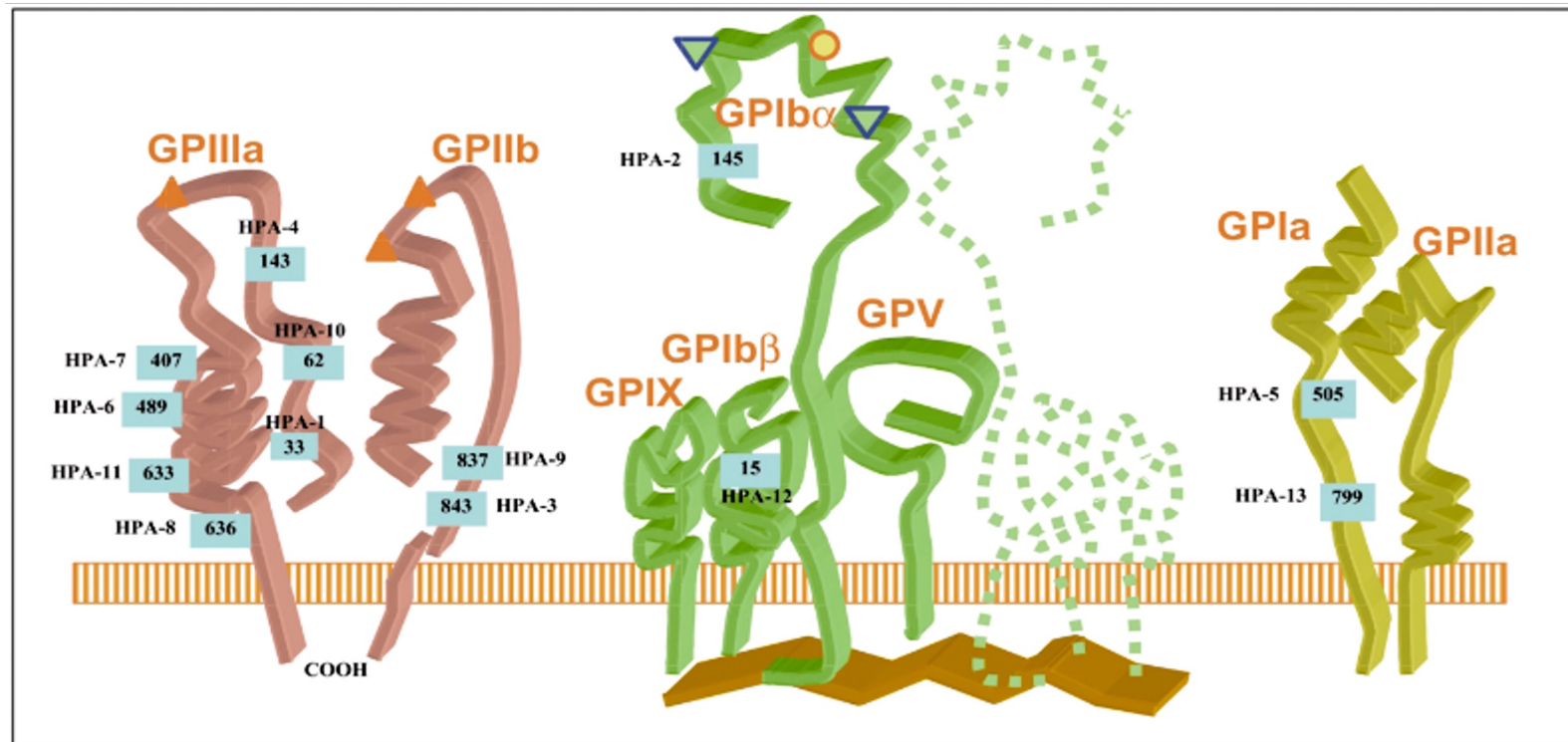
- CD109

?



Adhésion,
Agrégation
plaquettaire

Antigènes plaquettaires



Only one half of the GPIb-IX-V complex is shown. The HPA polymorphisms and hereditary defects are schematised according to the legend:

Glanzmann's thrombasthenia: ▲

Bernard-Soulier syndrome: ▼

von Willebrand's disease-platelet form: ●

HPA polymorphism: 837

Complexes formés de l'association de sous unités, codées par des gènes polymorphes à l'origine de l'allotypie

Antigènes plaquettaires

- Définis par la présence d'allo-Ac identifiés à l'occasion d'exploration de thrombopénie néonatale (1950 Harrington)
- Nomenclature HPA (ISBT 1990) se substitue aux appellations par abréviations des noms de patients
- 33 Ag spécifiques ont été définis en sérologie par un comité international de nomenclature plaquettaire

Nomenclature

- Numérotation des systèmes suivant l'ordre de leur découverte (ex HPA1, HPA2...)
- Allèle de haute fréquence « a »
- Allèle de basse fréquence « b »
- « w » indique qu'un seul des 2 allèles a été jusqu'ici identifié

Systemes HPA

- Systemes HPA_{1,2,3,4,5,15} bien définis
 - 12 Antigènes appartiennent à 6 systemes plaquettaires biallèliques
 - Allèles codominants
 - Systemes HPA 6 à 27
 - seul l'allèle de basse fréquence a été identifié
- Pas de sujet homozygote pour l'allèle de basse fréquence immunisé vis à vis de l'Ag de haute fréquence

Systemes HPA

Systeme	Antigène	Nom alternatif	Fréquence phénotype %	Glycoprotéine membranaire	CD
HPA1	HPA 1a	Zw ^a , Pl ^{a1}	97,9	GP IIIa	CD 61
	HPA 1b	Zw ^b , Pl ^{a2}	28,8		
HPA2	HPA 2a	Ko ^b	>99,9	GP Ib	CD 42
	HPA 2b	Ko ^a , Sib ^a	13,2		
HPA3	HPA 3a	Bak ^a , Lek ^a	80,95	GP IIb	CD 41
	HPA 3b	Bak ^b	69,8		
HPA4	HPA 4a	Yuk ^b , Pen ^a	>99,9	GP IIIa	CD61
	HPA 4b	Yuk ^a , Pen ^b	<0,1		
HPA5	HPA 5a	Br ^b , Zav ^b	99,0	GP Ia	CD49b
	HPA 5b	Br ^a , Zav ^a Hc ^a	19,7		
HPA 15	HPA 15a	Gov ^b	74		CD 109
	HPA 15b	Gov ^a	81		

Autres Antigènes

Système	Antigène	Nom Alternatif	Fréquence phénotypique	Glycoprotéine membranaire	CD
HPA 6	HPA 6bw	Ca ^a Tu ^a	0,7	GP IIIa	CD61
HPA7	HPA 7bw	Mo ^a	0,2	GP IIIa	CD61
HPA 8	HPA 8bw	Sr ^a	<0,01	GP IIIa	CD61
HPA 9	HPA 9bw	Max ^a	0,6	GP IIb	CD41
HPA 10	HPA 10bw	La ^a	<1,6	GP IIIa	CD61
HPA 11	HPA 11bw	Gro ^a	<0,25	GP IIIa	CD61
HPA 12	HPA 12bw	Iy ^a	0,4	GP Ib	CD42
HPA 13	HPA 13bw	Sit ^a	0,25	GP Ia	CD49b
HPA 14	HPA 14bw	Oe ^a	<0,17	GP IIIa	CD61
HPA 16	HPA 16bw	Duv ^a	<1	GP IIIa	CD61

Autres Antigènes suite

Systeme	Antigène	Nom Alternatif	Fréquence phéno- typique	Glycoprotéine membranaire	CD
HPA 17	HPA 17bw	Va ^a	?	GP IIb IIIa	CD61
HPA 18	HPA18bw	Cab ^a	?	GP Ia	CD49b
HPA 19	HPA19bw	Sta	?	GP IIIa	CD61
HPA 20	HPA 20bw	Kno	?	GP IIb	CD41
HPA 21	HPA 21bw	Nos	?	GP IIIa	CD61
HPA 22	HPA 22bw	Sey	?	GP IIb	CD41
HPA 23	HPA 23bw	Hug	?	GP IIIa	CD61
HPA 24	HPA 24bw	Cab2 ^a	?	GP IIb	CD41
HPA 25	HPA 25bw	Swi ^a	?	GP Ia	CD49b
HPA 26	HPA26bw	Sec ^a	?	GP IIIa	CD61
HPA 27	HPA27 bw	Cab3 ^a	?	GP IIb	CD41

Fréquences antigéniques

HPA										
	1a	1b	2a	2b	3a	3b	4a	4b	5a	5b
Caucasiens	97,5	30,8	99,8	11,8	86,1	62,9	100	0	98,8	20,7
Noirs Africains	100	16	97	33	85	60	100	0	96	38
Japonais	99,9	3,7	?	25,4	78,9	70,7	99,9	1,7	99,8	8,7
Chinois	99,9	0,15	?	9	78,5	71,9	99,9	0,17	99,9	17,7

Fréquences alléliques variables en fonction des populations: origine géographique à prendre en compte dans l'étude des cas d'allo-immunisation

Les techniques

5 GROUPES DE TECHNIQUES

- Cytométrie en Flux (PIFT)
- Test Immunocapture basés sur l'ELISA
- Test en Phase Solide avec Gr révélateurs SPAA
(Solid Phase Antigen Assay)
- MAIPA = Monoclonal Antibody Immobilization
of Platelet Antigens
- Luminex

Les techniques

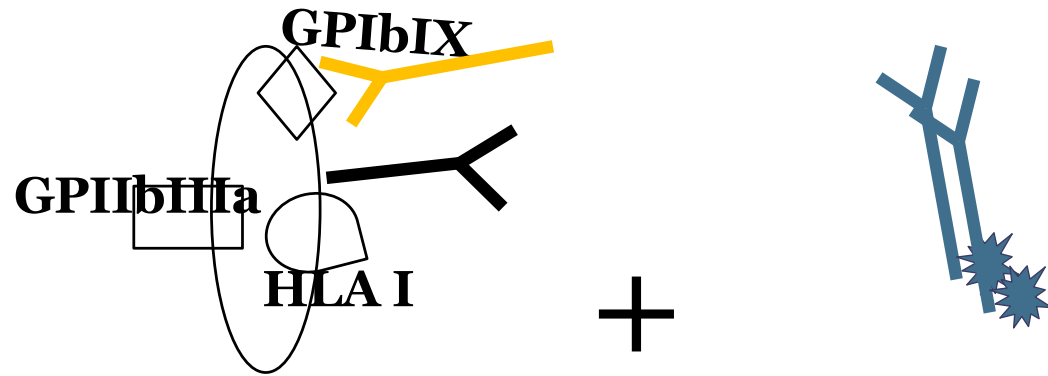
- Tests Directs :
Recherche (et identification) d'Auto-Ac fixés sur les plaquettes « Patient »
- Tests Indirects:
Recherche et identification d'Auto-Ac circulants et d'Allo-Ac, nécessité d'avoir un panel plaquettaire (donneurs génotypés)

Cytométrie en flux

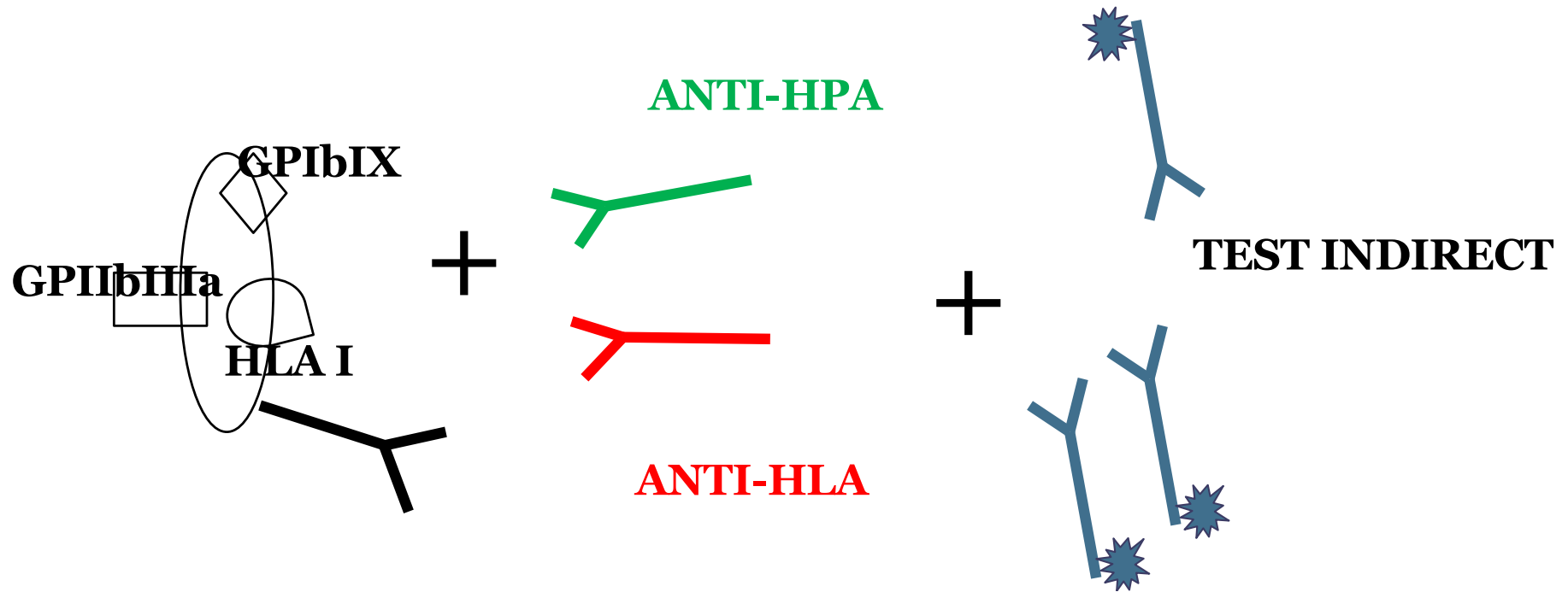
- 1 ère technique fiable développée 1978
- Utilisation des plaquettes « intactes »
- Fréquemment utilisée dans le dépistage des auto-ac anti-plaquettaires fixés (Test Direct)

Cytométrie en flux

AUTO-IbIX



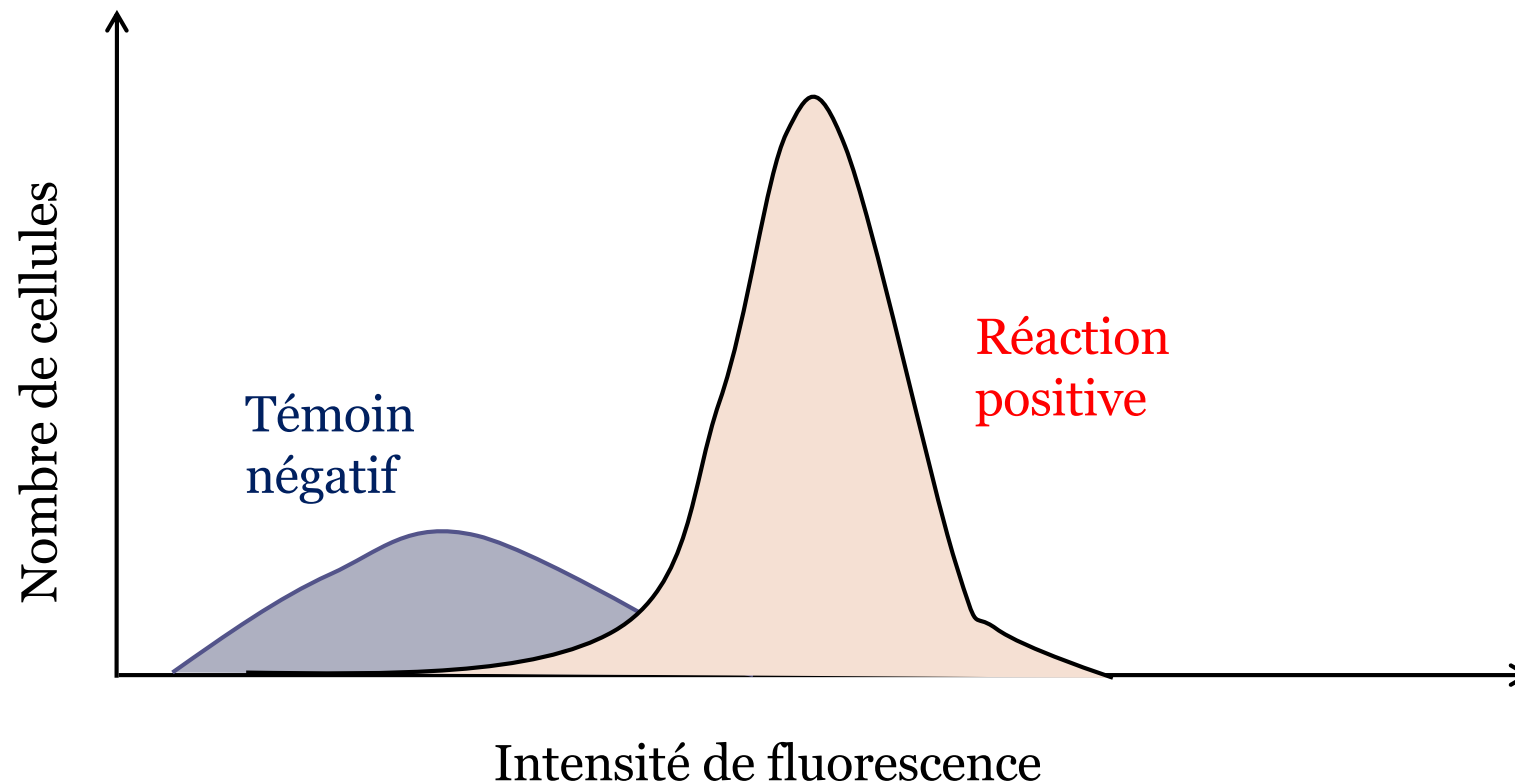
TEST DIRECT



TEST INDIRECT

Cytométrie en flux

Il existe environ 200 molécules d'Ig sur une plaquette « normale »: interprétation du signal par comparaison au signal « plaquettes témoins »



Cytométrie en flux

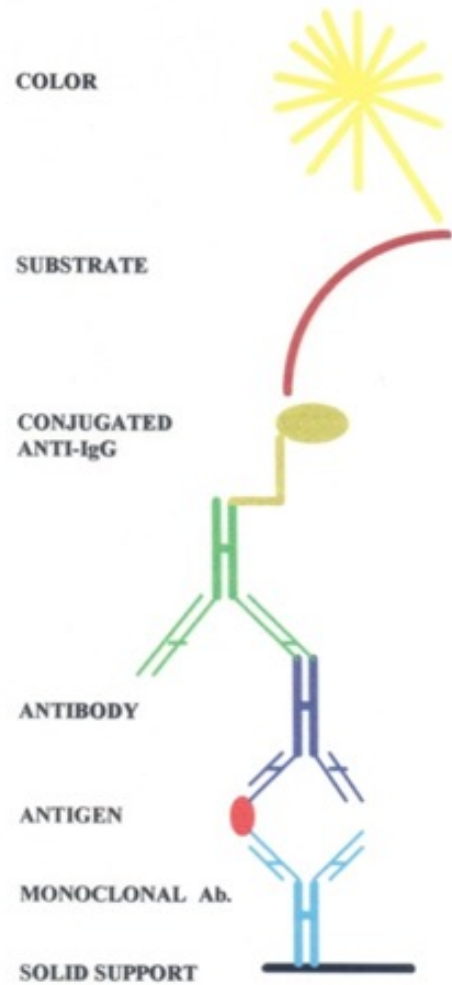
- Rapide, simple
- Test global: toutes les Ig associées à la surface plaquettaire sont révélées par l'AGH*
- Manque de spécificité lié à l'utilisation des plaquettes « entières »

Immuno capture ELISA

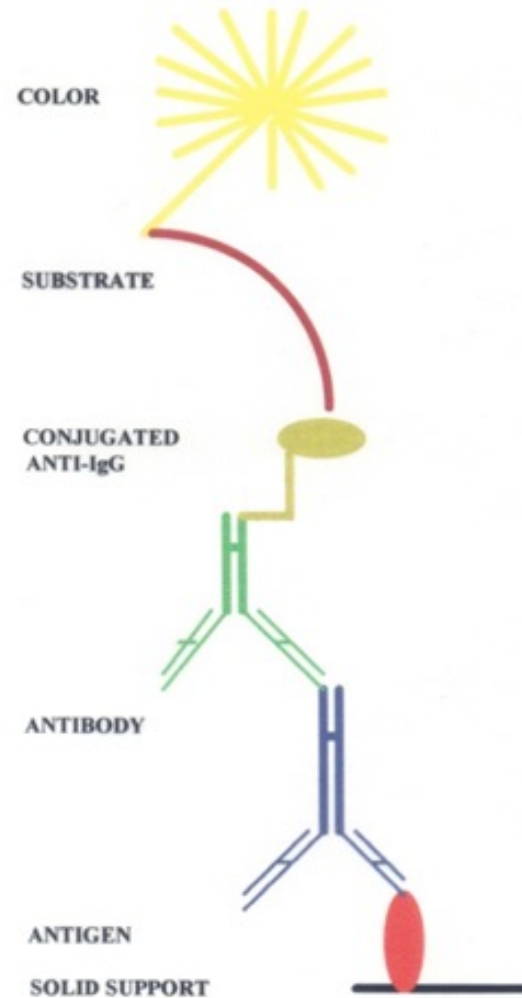
- Lifescode PAK family Products
- Kit de microplaques
 - Coatées avec les GP plaquettaires directement ou par le biais d'Ac monoclonaux
- Equipement spécifique: Laveur, lecteur de microplaques

GTI-PAK

GPIIb/IIIa, GPIa/IIa



GPIb/IX, GPIV, HLA CLASS 1



Immuno capture ELISA

- Rapide: résultat en 1/2 journée
- Sensible, bonne spécificité
- GP déjà coatées : pas de gestion de panel plaquettaire mais de ce fait pouvoir d'identification limité.

Phase Solide

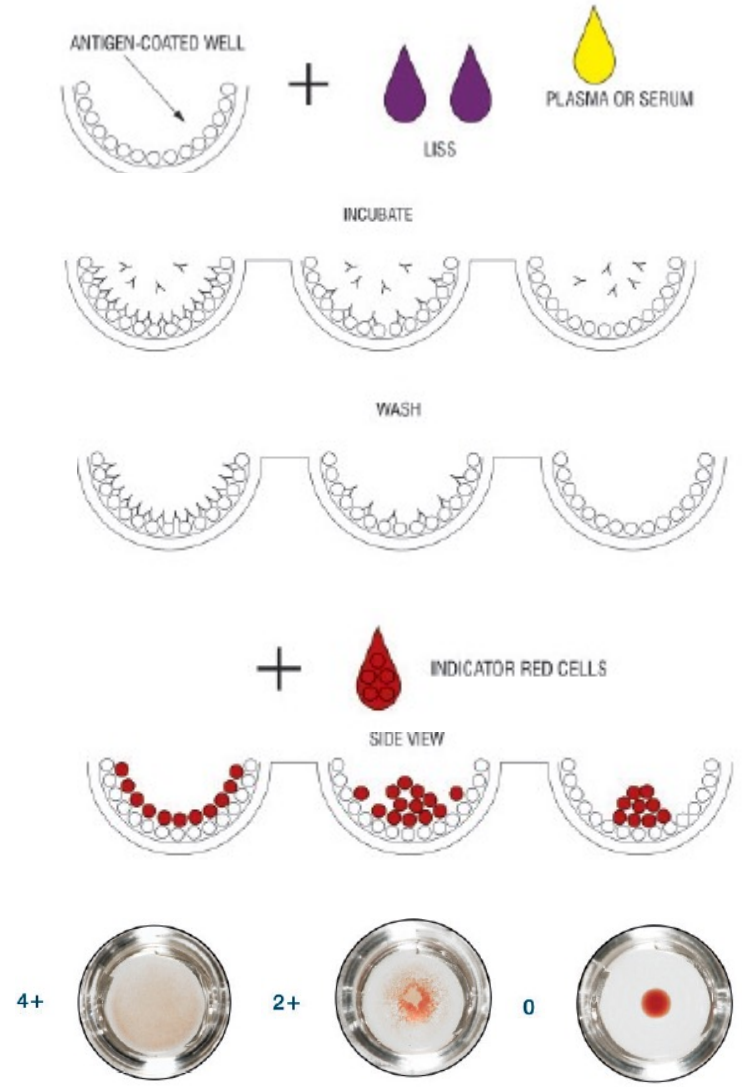
- Capture P Kit Immucor
- MASPAT (Monoclonal Ab Solid Phase Ag Test)

Sanquin

Présentation du produit identique aux tests d'immuno-capture mais mode de révélation différent : par hématises recouvertes d'anti-IgG.

Méthode automatisable

Phase solide

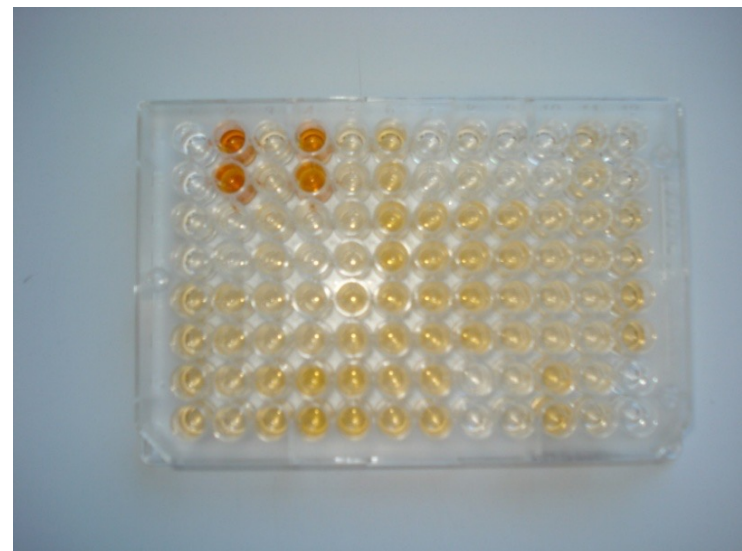
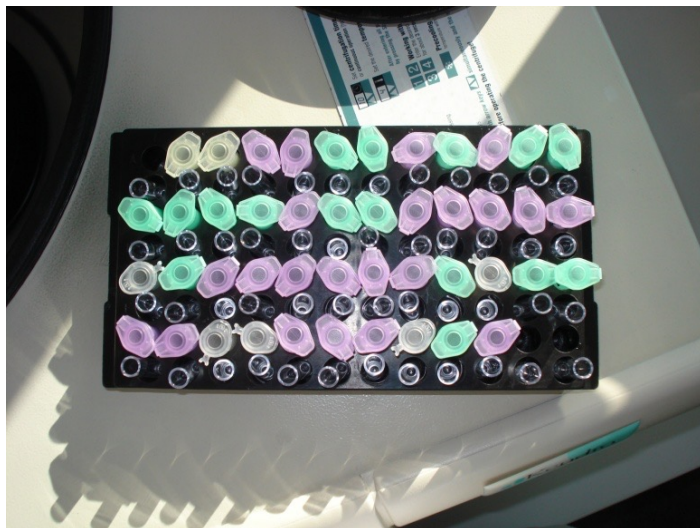
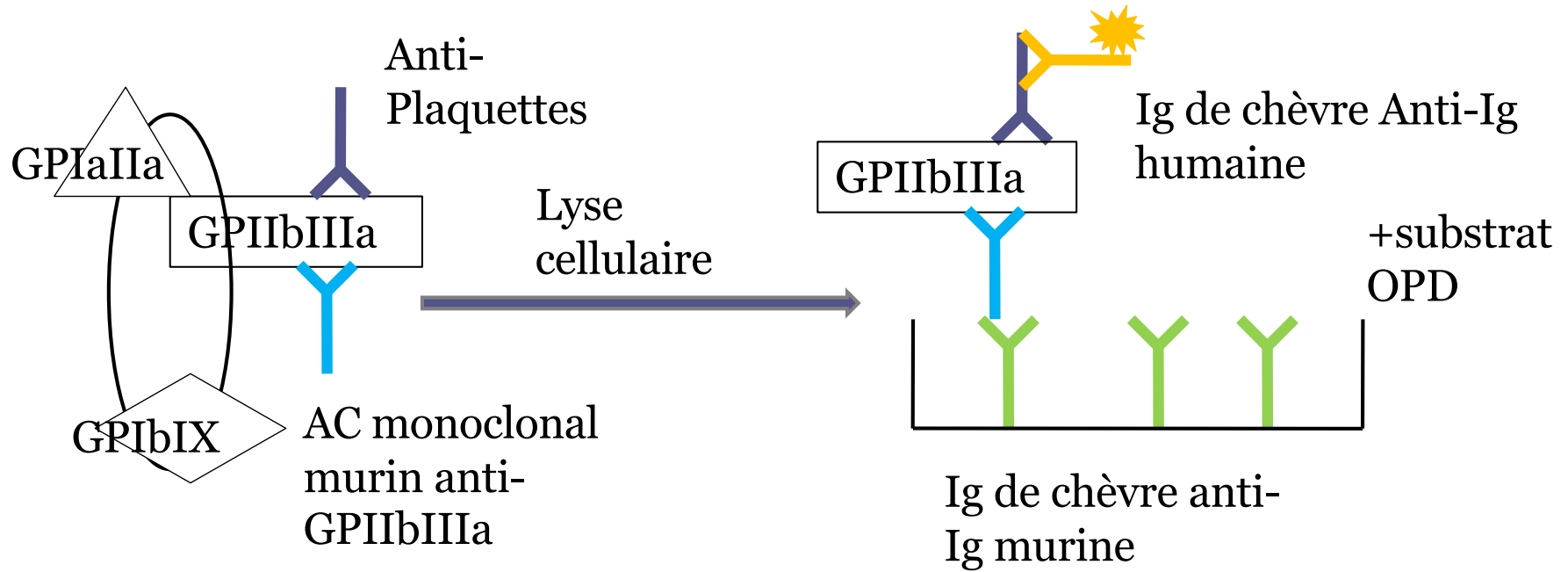


MAIPA

- Monoclonal Antibody Immobilization of Platelet Antigen Kiefel 1987
- Méthode « maison »
- Nécessité de disposer de plaquettes génotypées pour constituer un panel

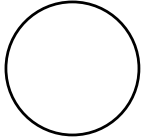
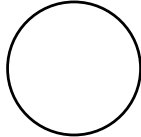
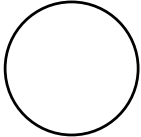
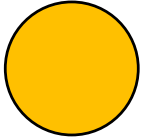
Spécificité basée sur l'utilisation de plusieurs Ac monoclonaux permettant d'isoler les GP plaquettaires libérées de la membrane par lyse cellulaire.

TECHNIQUE MAIPA



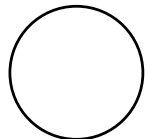
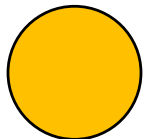
MAIPA

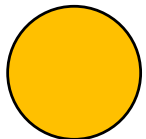
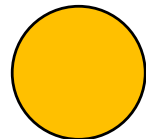
Dépistage

Monoclonal	Anti-CD 42	Anti-CD41	Anti-CD61	Anti-CD49
Glycoprotéine	IbIX	IIbIIIa	IIbIIIa	IaIIa
Système	HPA2	HPA1	HPA3	HPA5
Plaquette de dépistage	HPA2a/b	HPA1 a/b	HPA3 a/b	HPA 5a/b
Résultat				
Interprétation	Négatif	Négatif	Négatif	Positif

MAIPA

Identification

Monoclonal	Anti-CD49	
Glycoprotéine	IaIIa	
Système	HPA5	
Plaquelette d'identification	HPA 5a/a	HPA 5 b/b
Résultat		
Interprétation	Allo anti-HPA5 b	

Anti-CD49	
IaIIa	
HPA5	
HPA 5a/a	HPA 5 b/b
	
Auto-GP IaIIa	

MAIPA

- Très sensible
- Haut pouvoir d'identification: toutes combinaisons possibles des plaquettes du panel
- Technique entièrement manuelle
- Relativement lourde et longue (48H)

Luminex

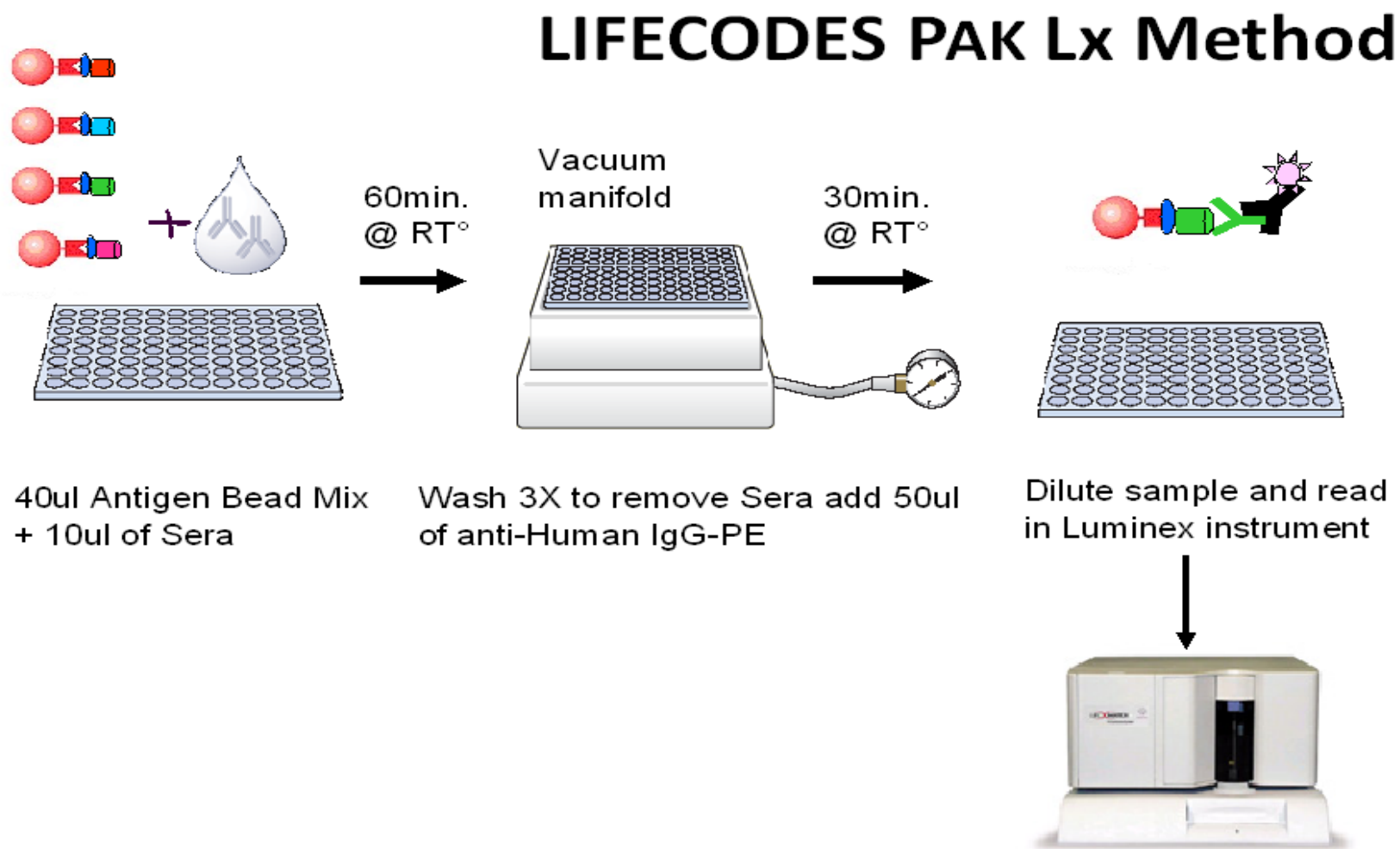
- Test d'identification sur 1 puits
- 1 Mélange de plusieurs types de μ billes
 - Panel= 4 types de billes recouvertes soit d'Ag HLA classe I, GP IIbIIIa, GP IaIIa, GPIbIX
 - Contrôles=
 - 1 type de billes recouvertes d'IgG humaines=Ctrl « + »
 - 3 types de billes « vierges »= 3 Ctrl « - »

Luminex

Billes	Cible	Antigènes
1	HLA Classe I	HLA
2	GPIIb/IIIa	1a/3a/4a
3		1a/3b/4a
4		1b/3a/4a
5		1b/3b/4a
6		1ab/3ab/4a
7		1a/3ab/4b
8	GP IbIX	2a
9		2a
10		2ab
11		2b
12		2b

Billes	Cible	Antigènes
13	GP IaIIa	5a
14		5a
15		5ab
16		5b
17		5b
18	IgG humaine	CTRL +
19		CTRL -
20		CTRL -
21		CTRL -

Luminex



Luminex

- Chaque type de billes est identifiable par une λ d'émission IFR spécifique au « corps interne de la bille ».
- Pour chaque type de billes un comptage sur 60 billes est réalisé pour faire une Moyenne de l'Intensité de Fluorescence externe(MFI).
- MFI des billes du panel sont comparées à celles des billes CTRL- pour l'interprétation des résultats.

Médicale

CHAPITRE IMMUNOLOGIE AUTO-IMMUNITE

- B100 Code 1478: Test direct de mise en évidence des immunoglobulines associées aux plaquettes, Dixon
- B100x3 Code 1479 x3: Identification d'auto-ac fixés sur les plaquettes (3 molécules) par immuno-capture

CHAPITRE HEMATOLOGIE IMMUNO- HEMATOLOGIE

- B100 Code 0162: Dépistage d'anticorps sériques anti-plaquettaires
- B300 Code 0163: Identification des ac sériques anti-plaquettaires
- B200/
système Code 0160: Groupages plaquettaires

Demandes d'analyses

- Diagnostic des thrombopénies immunes
PTI, PTAI
- Diagnostic des thrombopénies néonatales
TNN
- Diagnostic du purpura post-transfusionnel
PPT
- Diagnostic des états réfractaires aux transfusions plaquettaires

Répartition des demandes

Moyenne annuelle des demandes effectuées sur les 5 dernières années (2008-2012)

	TOTAL	THROMBOPENIES	THROMBOPENIES NEONATALES	PPT et ETATS REFRACTAIRES
NOMBRE DE DEMANDES/AN	1200	1130(94,2%)	65(5,4%)	5 (0,4%)

PTI

Thrombopénie isolée persistante < 150 G/L

Diagnostic d'exclusion

Recherche d'une anomalie hématologique:

NFS, réticulocytes parfois un myélogramme
(syndrome myélodysplasique)

Bilan d'hémostase: TCA, TQ, fibrinogène
(CIVD)

Sérologies: séro diagnostics viraux:

VIH, VHC, VHB

Bilan hépatique (hypertension portale)

PTI

Thrombopénie médicamenteuse :quinine, antibiotiques, phénothiazine ,diurétiques thiazidiques, héparine.

Bilan maladies auto immunes:

Tissulaires: recherche anticoagulant de type lupique, anti-phospholipides LED,PR

Plaquettaires: Recherche d'auto-AC fixés sur les plaquettes =Test de Coombs plaquettaire=Test Dixon

Ne suffit pas à lui seul à poser le diagnostic

PTI

Auto-Ac ayant pour cible les GP de la membrane plaquettaire:

Anti-GPIIb IIIa et anti-GP IbIX quel que soit le phénotype HPA destruction prématurée de plaquettes
2 formes différentes

PTI

Jeune enfant: Forme aiguë. Thrombopénie d'installation rapide, sévère $<5\text{G/L}$ survient 2-3 semaines après un épisode infectieux viral.

Incidence 4 à 5 pour 100 000

Guérison dans 80 % des cas dans un délai de 2 à 6 mois

Adulte: thrombopénie le plus souvent modérée 50-80 G/L évolution par poussées hémorragiques, vers la **chronicité** dans 70 % des cas

Incidence 50 à 60 nouveaux cas /million et par an, jeune femme.

TNN

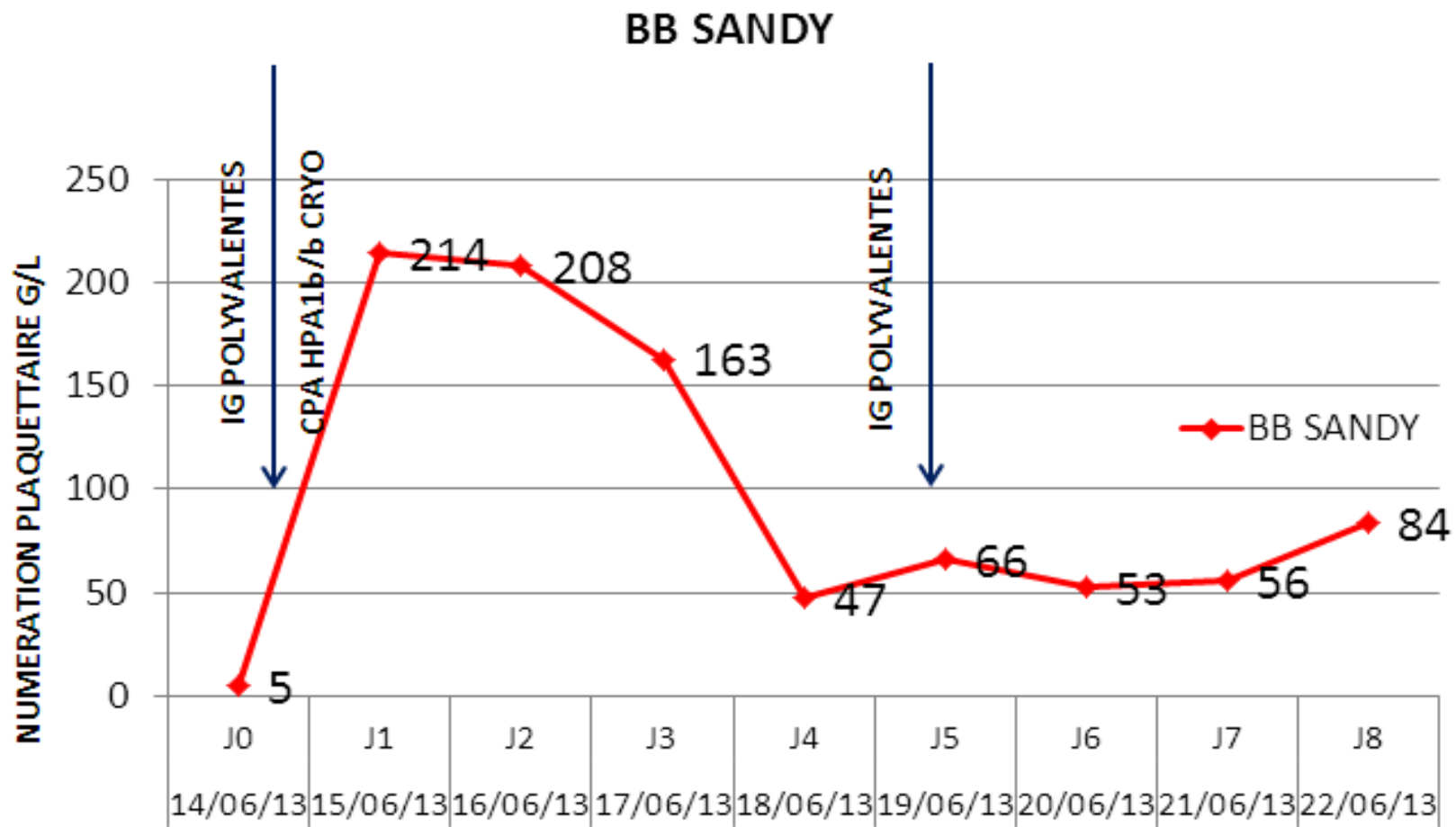
BB SANDY: à terme, Jo pétéchiés, thrombopénie isolée sévère, NP 5 G/L .

Transfert vers un service pédiatrique

Mère: G1P1, accouchement par voie basse

sans ATCD particulier NP 280G/L, pas de contexte infectieux , sérologie HIV HCV HBV négatives.

TNN



TNN

BB CAMILLE: à la naissance NP4 G/L

Mère:G2P2

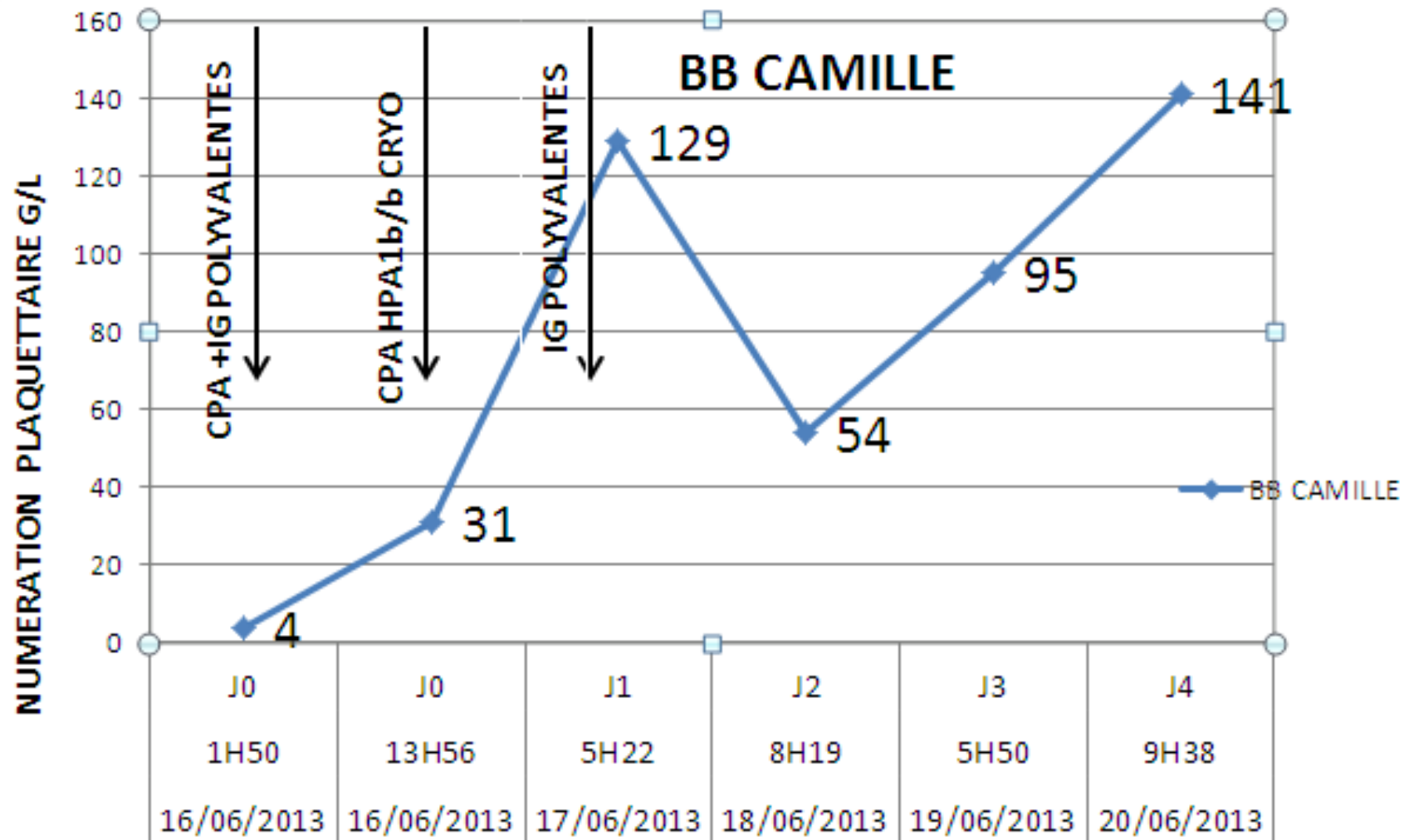
Bilan d'allo-immunisation anti-plaquettaire en juillet 2011

Anti-HPA 1a 1^{er} enfant NP 6 G/L

Père HPA 1a/a

Prise en charge 2^{ème} grossesse au CHRU

TNN



TNN

Mécanisme

- Passage transplacentaire d'Ac maternels
 - d'auto-Ac maternels de patientes thrombopéniques +/- diagnostic de PTI (0,14% des grossesses évolutives)
 - d'allo-Ac de patients immunisées vis à vis d'Ag plaquettaires hérités du père

Destruction immune des plaquettes du fœtus in utéro parfois précoce: Ag plaquettaires matures
16 SA

TNN Auto -Ac

- Absence de paramètres maternels prédictifs (sauf splénectomie)
- Atteinte foétale dans 40% des cas
- Thrombopénie souvent modérée mais dans 15% des cas $NP < 50$ G/L avec risque HIC 1 à 3%
- Rarement sévère à J0, Nadir J3-J5
- Correction de la $NP > 100$ G/L entre 6 semaines et 2 mois
- Traitement par IgIV 1g/Kg/Jour 1 à 2 cures

TNN et Allo-AC

- 30% des cas au cours de la 1^{ère} grossesse
- Absence de dépistage prénatal
- Expression clinique variable:
 - Asymptomatique à purpura/pétéchies
- Thrombopénies sévères 1/1200 naissances risque HIC 10% (décès ou séquelles neurologiques)
- Dès Jo 10G/L

TNN et Allo-AC

- Spécificité en cause:

Anti-HPA5b (anti-Bra):

le plus fréquent mais responsable de TNN modérée

Impliqué dans 5 à 15 % des TNN sévères

Anti-HPA1a (anti-Pla1):

Moins fréquent mais responsable de 80 à 90 % des formes sévères

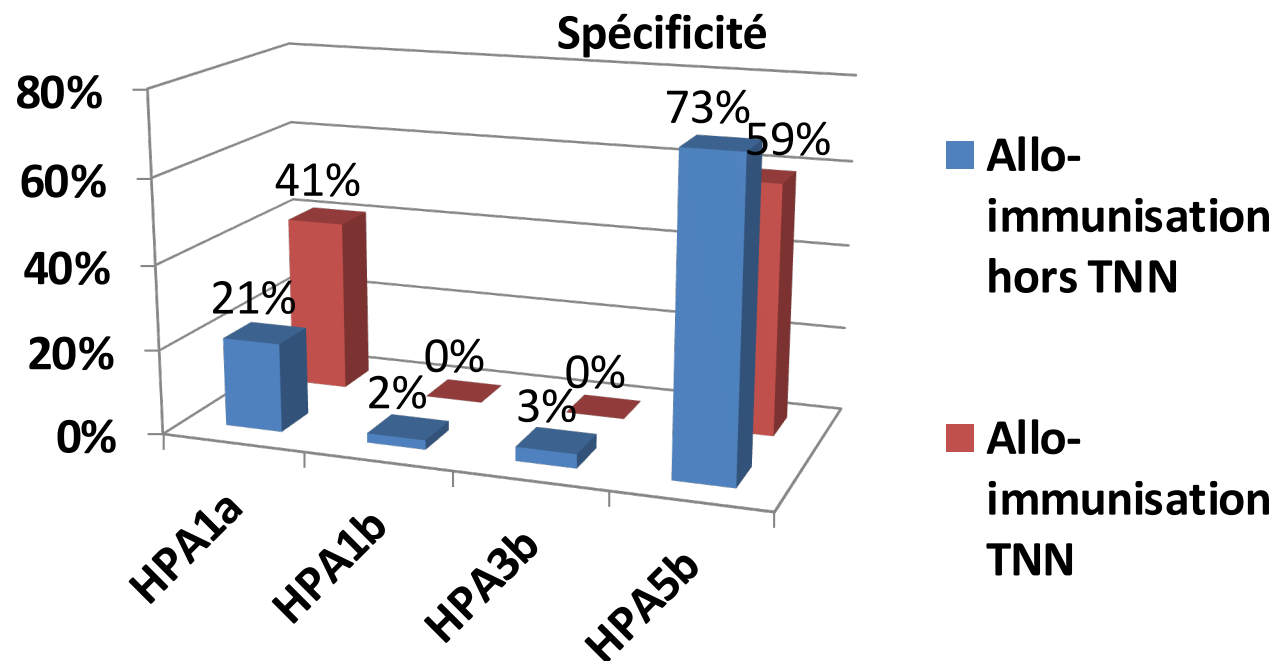
Anti-HPA3, anti-HPA15 (HPA15 non représenté en dépistage de routine)

Anti-HPA4b en Asie

Allo-AC

Statistiques d'allo-immunisation 2008-2012 Laboratoire IH EFS-LILLE

Total des demandes Moyenne annuelle	Hors TNN 1135	TNN 65
Allo-AC	18 soit 1,6%	13 soit 22%



Traitement TNN

- Ig polyvalentes 1g/kg/J 1 à 2 cures
- Transfusion plaquettaire 3 alternatives
 - Plaquettes « tout venant »
 - Réserve CPA HPA1 b/b et HPA5 a/a cryoconservés
 - Plaquettes maternelles

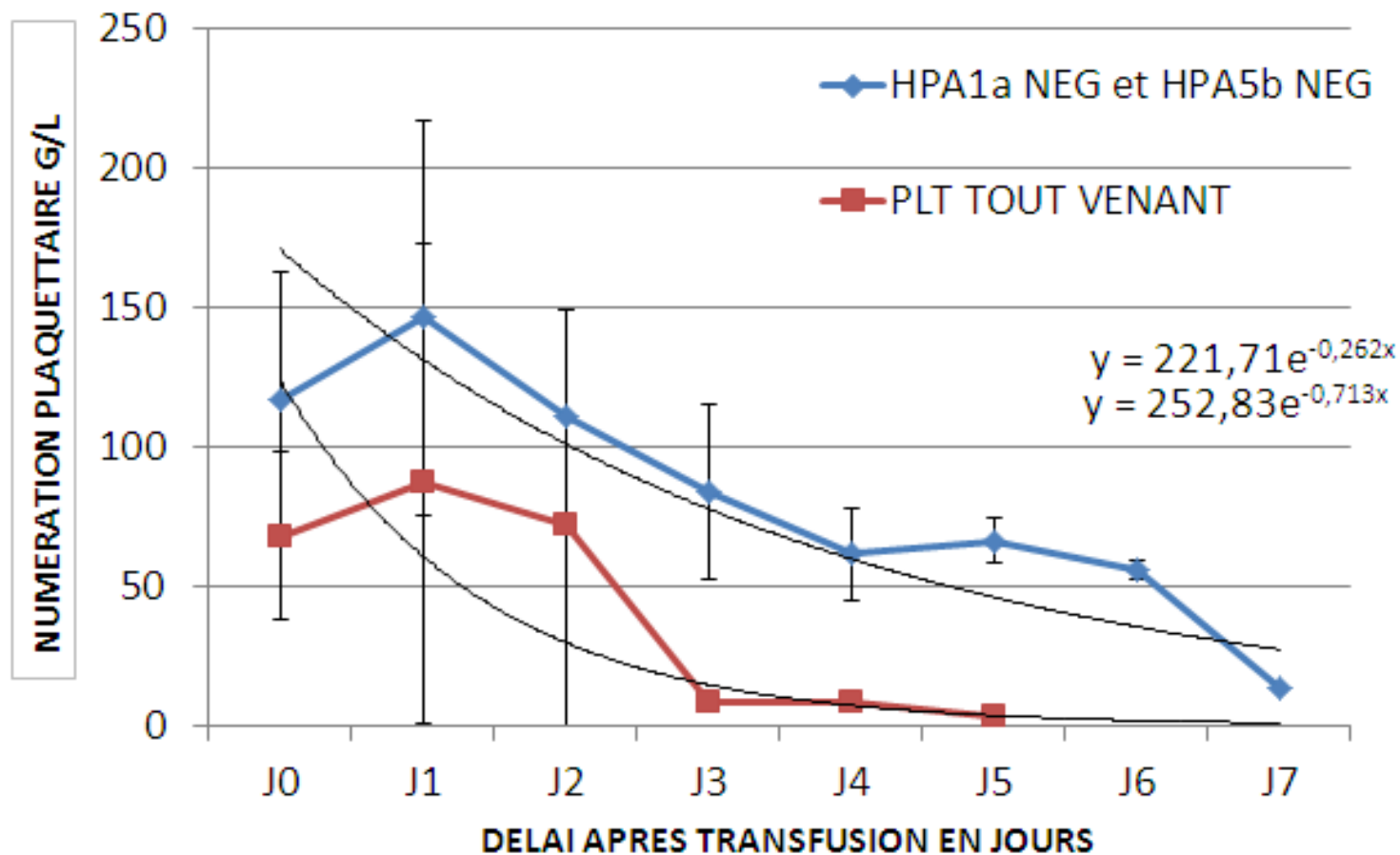
TNN

Publication Kiefel Blood 2006;17:3761-3763

Etude sur 27 dossiers de NN atteints de TNN (HPA1a) qui conclut à l'efficacité des transfusions de plaquettes « tout venant » car la NP > 40 G/L

!MAIS réponse par David J. Roberts Blood 2007;109:388-389 Comparaison des **rendements** plaquettaires et de la **survie** des plaquettes chez des NN atteints de TNN (HPA1a) transfusés en plaquettes HPA1 a négatif versus plaquettes « tout venant ».

TNN



Augmentation moyenne NP J0	68 G/L	116 G/L
Augmentation moyenne NP J1	87 G/L	146 G/L
Survie des plaquettes transfusées	1 Jour	1,9 Jour

Diagnostic biologique TNN

Contexte clinique des demandes de bilan

- Thrombopénie avérée du NN
Délai de résultat non compatible avec distribution en urgence de produits plaquettaires
- Images échographiques évocatrices d'hémorragies cérébrales.

Diagnostic biologique TNN

Mère:

MAIPA Direct: Auto-Ac fixés?

MAIPA Indirect: Auto ou Allo-Ac sériques

vis-à-vis d' un panel de plaquettes HPA génotypées et vis-à-vis des plaquettes du père (mise en évidence d'Ac dirigé contre un Ag de basse fréquence)

Père, Mère, Enfant: Génotypes HPA 1,2,3,4,5,6,15

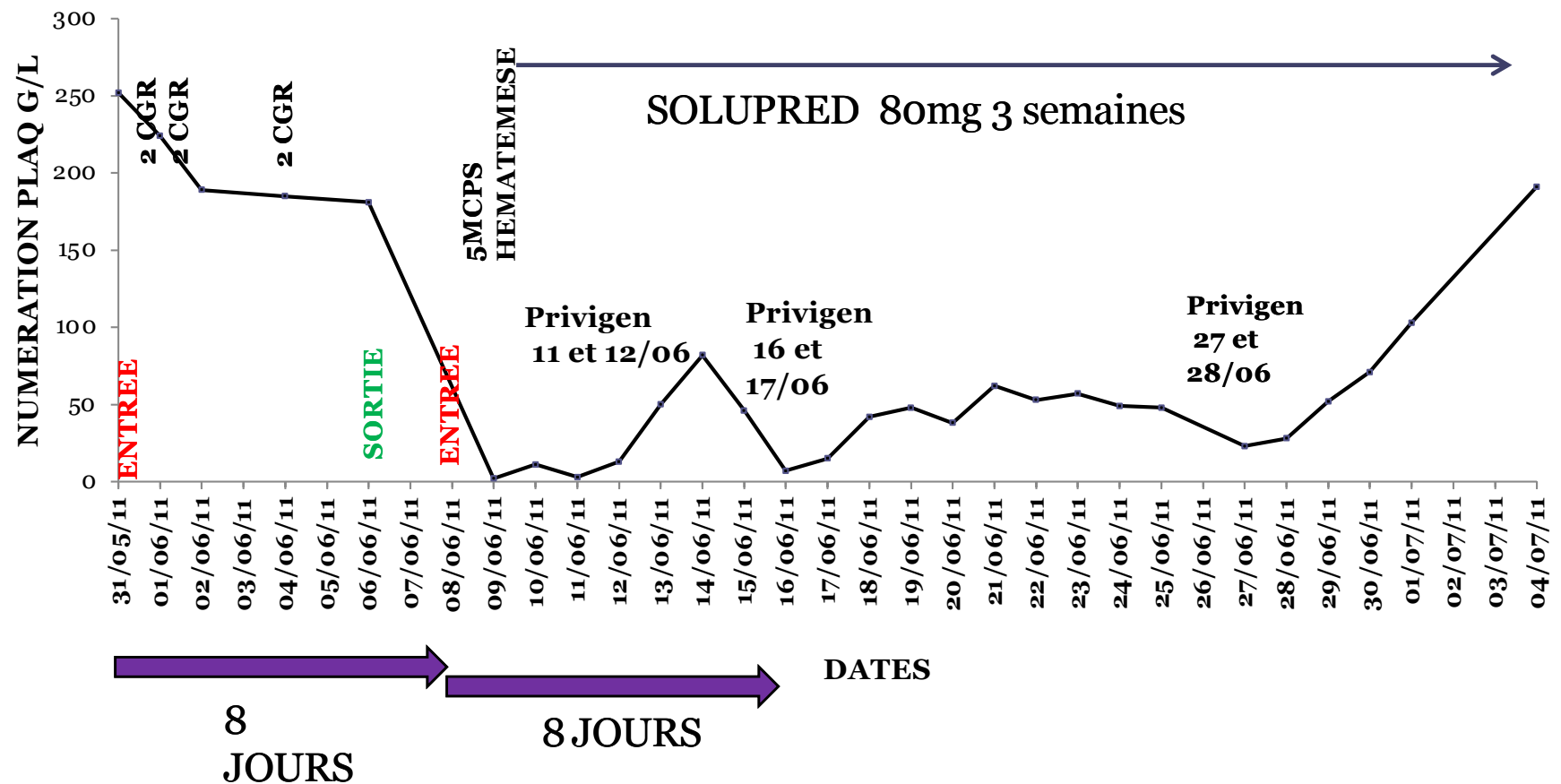
Diagnostic différentiel: recherche d'état infectieux, prématurité, le RCIU, T21...

PPT

- Mme VAN 68 ans
- Antécédents transfusionnels, obstétricaux?
- 31/05/2011 Hospitalisation pour anémie sévère ferriprive point d'appel digestif (bulbite ulcérée)
Hb 4 g/dl Plaquettes 252 G/L
- 31/05 au 04/06/2011 Transfusion de 6 CGR
- 06/06/2011 Sortie Hb 10 g/dl Plaquettes 181 G/L

PPT cas clinique

Mme Van



PPT

- Thrombopénie sévère
- Délai: 5 à 10 Jours après tranfusion
- Tous les PSL contenant des plaquettes
- Candidat type: femme âgée
- Anti-HPA1a le plus souvent

PPT mécanisme

- Réponse immune anamnestique:
- réactivation d'un Ac de très haut titre suite à une 2^{ème} exposition à l'Ag
- Destruction des plaquettes incompatibles transfusées et des propres plaquettes du patient par la production simultanée d'auto-Ac (mécanisme non élucidé).

PPT

- Transfusions plaquettaires non recommandées
- Thérapie de 1^{ère} ligne: IGIV fortes doses
- Récupération NP > 50 G/L délai de 1 à 4 semaines
- Transfusions en CGR déplasmatisés.

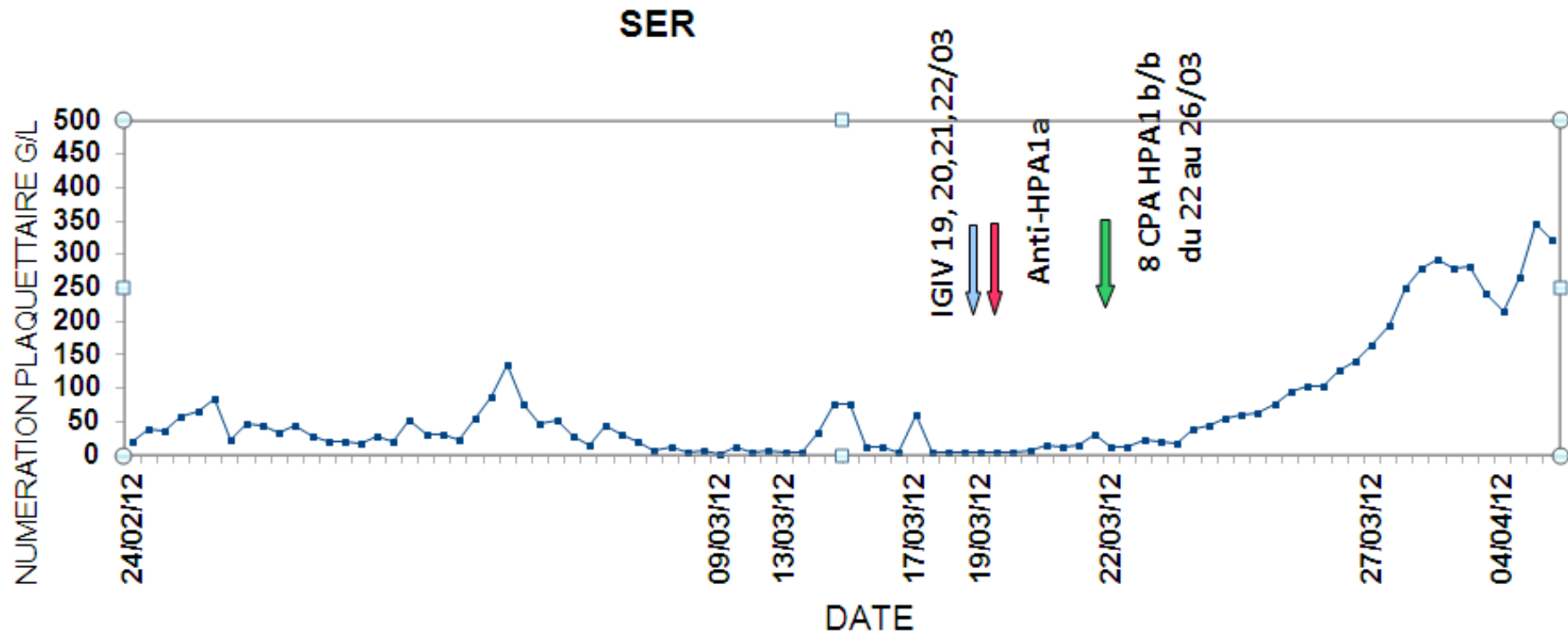
Etats réfractaires aux transfusions plaquettaires

- Mme SER 38 ans
- Pas d'antécédents transfusionnels
- 2 enfants
- 24/02/2012 Transfert au CHR Leucémie aigüe promyélocytaire (LAM3) Plaquettes 32 G/L

	MCP 0,5x10¹¹	CPA 0,5x10¹¹	CGR	Clinique
24/02/12	14			
25 au 27/02/2012	56	25	2	CIVD initiale
28/02/12	19		1	Etat réfractaire aux plaquettes
29/02/12				HTIC et hydrocéphalie hémorragie cérébrale
01/03/12	20	34		
02/03/12	23	15		Dérivation ventriculo- péritonéale
03 au 05/03/12	37	22	1	transfusions fractionnées 8 à 12 H ALP NEG LCT POS Luminex
06 au 09/03/12	17			Transfusions 24 à 48 H
10 au 13/03/12	40	14	2	transfusions fractionnées 8 à 12 H normalisation du bilan d'hémostase
14 au 15/03/12	30	17	1	Hématome sous dural lié à une chute demande de MAIPA
16 au 18/03/12	62	24 dont 10 HLA	1	Début CPA HLA

	MCP 0,5x10¹¹	CPA 0,5x10¹¹	CGR	IGIV	Clinique
19/03/12	29			40 G	Hématome cérébral le long du cathéter ventriculaire
20 au 21/03/12	6	22 dont 6 HLA	2	25 G	
21/03/12	14	21 dont 8 HLA		20 G	
22/03/12	8	5 CRYO HPA +7		40 G	
23/03/12 à 6H		3 CRYO HPA			18 G/L
à 17 H		3 FRAIS HPA	2		38 G/L
24/03/2012 à 2H		3 FRAIS HPA			43 G/L
à 10H		2 FRAIS HPA			56 G/L
à 18H		3 FRAIS HPA			60 G/L
25/03/2012 à 6H		3 FRAIS HPA			75 G/L
à 19 H		3 FRAIS HPA			96 G/L
26/03/12		3 CRYO FRAIS			

Etats réfractaires



Etats réfractaires

Définition: absence de rendement transfusionnel au décours d'au moins 2 épisodes transfusionnels successifs.

Cas difficiles à analyser, observés chez des patients recevant de multiples transfusions.

- Etiologie multifactorielle:
 - Causes liées au patient: CIVD, splénomégalie, fièvre, complication des greffes de CSH, interférence de médicaments
 - Causes liées au produit: dose, compatibilité ABO, durée de conservation >3 Jours

Etats réfractaires

RTP réalisé 1 à 2 H après la transfusion insuffisant doit faire suspecter une allo-immunisation

- L'allo-immunisation plaquettaire est d'abord dirigée vis-à-vis des antigènes HLA, avant d'être observée vis-à-vis des antigènes HPA

Spécificité en cause: anti-HPA 1b, HPA 5b, HPA 2b

Etats réfractaires

- En présence d'allo-immunisation HPA, si la transfusion de plaquettes est impérative, l'utilisation de CPA HPA antigéno-compatible est indispensable.
- Traitement par IgIV

Conclusion

- Discipline qui reste encore méconnue
- Evolution depuis 1987 avec l'arrivée de la technique MAIPA (référence) et par la suite avec le développement de Kits commerciaux.
- Importance des conséquences cliniques justifie l'intérêt qui lui est porté.