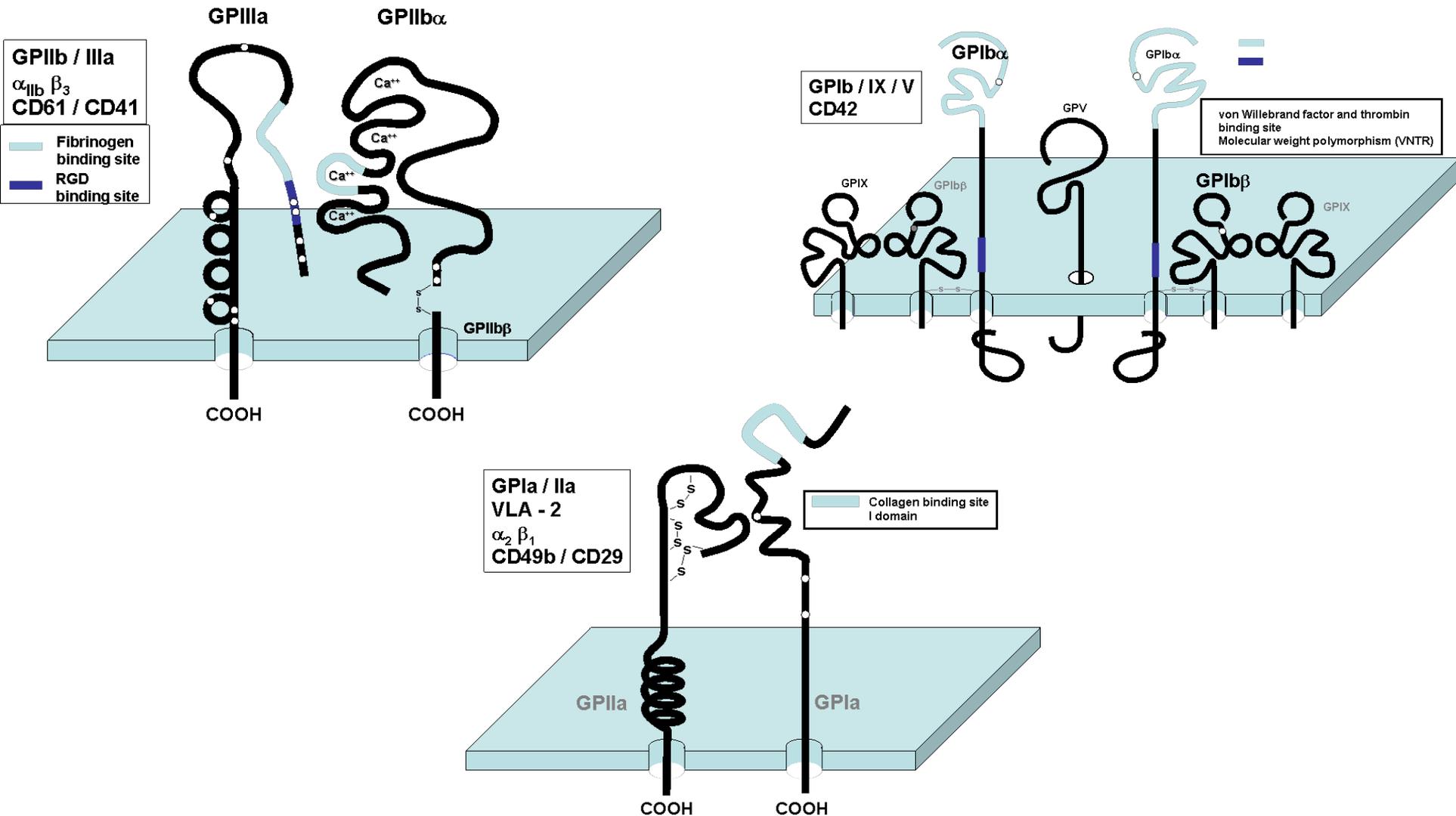


IMMUNOLOGIE PLAQUETTAIRE

Exploration des thrombopénies immunes

Dr Rachel PETERMANN

Département d'Immunologie Plaquettaire -
INTS



- ◆ Antigène = peptide potentiellement immunogène
- ◆ Nomenclature internationale: Human Platelet Antigen (HPA): mis en évidence par les alloanticorps
- ◆ 6 systèmes antigéniques **bi-alléliques** (12 antigènes: HPA-1a/b, HPA-2a/b, HPA-3a/b, HPA-4a/b, HPA-5a/b et HPA-15a/b) Rq : “a” allèle de haute fréquence et “b” allèle de basse fréquence
- ◆ 16 antigènes **monoalléliques** (absence de sérum anti-thétique) (HPA-6bw, -7bw, -8bw, -9bw, -10bw, -11bw, -12bw, -13bw, -14bw, -16bw à 28bw).
Rq : “w” 1 seul des allèles identifié

Immuno Polymorphism Database

Overview | [IMGT/HLA](#) | [KIR](#) | [MHC](#) | [HPA](#) | [ESTDAB](#) | [Contact](#) | [Support](#)

[IPD](#) > [HPA](#)

All HPA Genetic Information

The following table details genetic information about HPA Antigens. The following conventions are used in the table:

- Nucleotide change - Nucleotide numbers are given in relation to the reference sequence in the NCBI database, as indicated in the RefSeq column, and we have used the numbering convention as recommended by Antonarakis (*Hum Mutat* 1998;11:1-3) whereby the A of the start codon is +1. For example the T/C SNP coding for HPA-1 is at position 196 in the RefSeq sequence, but because this sequence includes 20 nucleotides upstream of the start codon, the SNP is designated at position 176 in the table above. Therefore, it is likely that the nucleotide positions given above are different to the numbers in the original publication describing the mutation.
- Nucleotide and protein substitutions are shown as changes from the more common form (a) to the less common form (b). In certain cases, e.g. HPA-5, the reference sequence encodes the less common form.

IPD-HPA

- [Allo/antigen protein data](#)
- [Genetic Information](#)
- [Allele Frequencies](#)
- [Non HPA Antigens](#)

Antigen	Glyco-protein	HGNC	Chromosome	Entrez Gene	Ref_Seq	Uni-Prot	dbSNP	Nucleotide Change	Precursor	Mature Protein	Reference
HPA-1	GPIIIa	ITGB3	17	3690	NM_000212	ITB3_Human	rs5918	176T>C	L59P	L33P	Newman et al, J Clin Invest 83:1778-81 (1989)
HPA-2	GPIba	GP1BA	17	2811	NM_000173	GPBA_Human	rs6065	482C>T	T161M	T145M	Kuijpers et al, J Clin Invest 89:381-4 (1992)
HPA-3	GPIIb	ITGA2B	17	3674	NM_000419	ITAB_Human	rs5911	2621T>G	I874S	I843S	Lyman et al, Blood 1990, 75:2343-8 (1990)
HPA-4	GPIIIa	ITGB3	17	3690	NM_000212	ITB3_Human	rs5917	506G>A	R169Q	R143Q	Wang et al, Proceedings of the Japan Academy 67:102-6 (1991) Wang et al, J Clin Invest 90:2038-43 (1992)
HPA-5	GPIa	ITGA2	5	3673	NM_002203	ITGA2_Human	rs10471371	1600G>A	E534K	E505K	Santoso et al, J Clin Invest 92:2427-32 (1993) Kalb et al, Thromb Haemost 71:651-4 (1994) Simsek et al, Br J Haematol 86:671-4 (1994)
HPA-6w	GPIIIa	ITGB3	17	3690	NM_000212	ITB3_Human	rs13306487	1544G>A	R515Q	R489Q	Wang et al, Blood 82:3386-91 (1993)
HPA-7w	GPIIIa	ITGB3	17	3690	NM_000212	ITB3_Human		1297C>G	P433A	P407A	Kuijpers et al, Blood 81:70-6 (1993)
HPA-8w	GPIIIa	ITGB3	17	3690	NM_000212	ITB3_Human		1984C>T	R662C	R636C	Santoso et al, J Biol Chem 269:8439-44 (1994)
HPA-9w	GPIIb	ITGA2B	17	3674	NM_000419	ITAB_Human		2602G>A	V868M	V837M	Noris et al, Blood 86:1019-26 (1995)
HPA-10w	GPIIIa	ITGB3	17	3690	NM_000212	ITB3_Human		263G>A	R88Q	R62Q	Peyruchaud et al, Blood 89:2422-28 (1997)
HPA-11w	GPIIIa	ITGB3	17	3690	NM_000212	ITB3_Human		1976G>A	R659H	R633H	Simsek et al, Br J Haematol 97:330-335 (1997)
HPA-12w	GPIbb	GP1BB	22	2812	NM_000407	GPBB_Human		119G>A	G40E	G15E	Sachs et al, Blood 95:1849-55 (2000)
HPA-13w	GPIa	ITGA2	5	3673	NM_002203	ITGA2_Human		2483C>T	T828M	T799M	Santoso et al, Blood 94:4103-11 (1999)
HPA-14w	GPIIIa	ITGB3	17	3690	NM_000212	ITB3_Human		1909_1911delAAG	K637del	K611del	Santoso et al, Blood 99:1205-14 (2002)
HPA-15	CD109	CD109	6	135228	NM_133493	Q8TDJ3	rs10455097	2108C>A	S703Y	S682Y	Schuh et al, Blood 99:1692-98 (2002)



INSTITUT NATIONAL DE LA TRANSFUSION SANGUINE

HPA-16w	GPIIIa	ITGB3	17	3690	NM_000212	ITB3_Human		497C>T	T166I	T140I	Jallu et al, Blood 99:4449-5
HPA-17w	GPIIIa	ITGB3	17	3690	NM_000212	ITB3_Human		662C>T	T221M	T195M	Stafford et al, Transfusion 4
HPA-18w	GP1a	ITGA2	5	3673	NM_002203	ITGA2_Human		2235G>T	Q745H	Q716H	Bertrand et al, Transfusion
HPA-19w	GPIIIa	ITGB3	17	3690	NM_000212	ITB3_Human	ss120032848	487A>C	K163Q	K137Q	Peterson et al, Transfusion
HPA-20w	GPIIb	ITGA2B	17	3674	NM_000419	ITAB_Human	ss120032852	1949C>T	T650M	T619M	Peterson et al, Transfusion
HPA-21w	GPIIIa	ITGB3	17	3690	NM_000212	ITB3_Human	ss120032849	1960G>A	E654K	E628K	Peterson et al, Transfusion
HPA-22bw	GPIIb	ITGA2B	17	3674	NM_000419	ITAB_Human	rs142811900	584A>C	K195T	K164T	Peterson et al, Transfusion
HPA-23bw	GPIIIa	ITGB3	17	3690	NM_000212	ITB3_Human	rs139166528	1942C>T	R648W	R622W	Peterson et al, Transfusion
HPA-24bw	GPIIb	ITGA2B	17	3674	NM_000419	ITAB_Human		1508G>A	S503N	S472N	Jallu et al, Transfusion (201
HPA-25bw	GP1a	ITGA2	5	3673	NM_002203	ITGA2_Human		3347C>T	T1116M	T1087M	Kroll et al, Transfusion (201
HPA-26bw	GPIIIa	ITGB3	17	3690	NM_000212	ITB3_Human		1818G>T	K606N	K580N	Sachs et al, Thromb Haemo
HPA-27bw	GPIIb	ITGA2B	17	3674	NM_000419	ITAB_Human	rs149468422	2614C>A	L872M	L841M	Jallu et al, Transfusion (201
HPA-28bw	GPIIb	ITGA2B	17	3674	NM_000419	ITAB_Human	ss550827881	2311G>T	V771L	V740L	Poles et al, published online

MODALITES DE RECONNAISSANCE D'UN NOUVEL ANTIGENE

REPORT

Nomenclature of human platelet antigens

P. Metcalfe,¹ N. A. Watkins,² W. H. Ouwehand,^{1,2} C. Kaplan,^{*3} P. Newman,⁴ R. Kekomaki,⁵ M. de Haas,⁶ R. Aster,⁴ Y. Shibata,⁷ J. Smith,⁸ V. Kiefel⁹ Et S. Santoso¹⁰

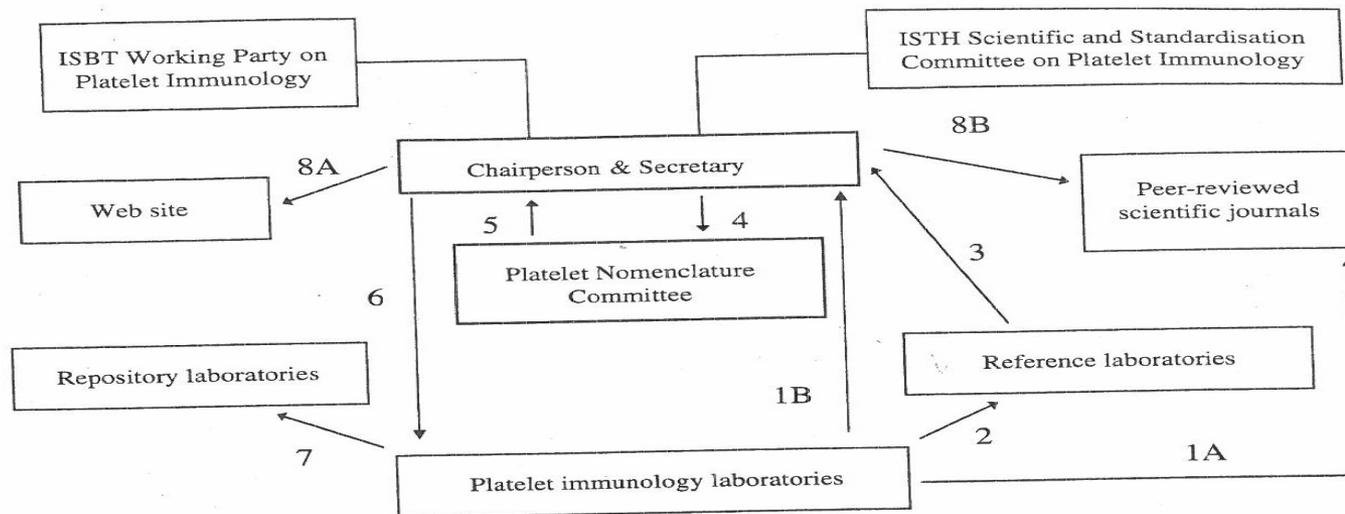


Fig. 1 Organizational chart for assignment of new human platelet antigens (HPAs). Numbers indicate the sequence in the flow of information and samples. Following the submission of a manuscript to a peer reviewed scientific journal (1A) and the corresponding data to the PNC secretary (1B), the laboratory supplies materials to two other designated reference laboratories for confirmation (2) (one other laboratory if the original laboratory is a designated reference laboratory). Following confirmation by the reference laboratories (3) the secretary will circulate the data to the members of the PNC (4). If the committee approves the proposal (5) then the chairperson will inform the original laboratory (6). Blood samples (serum and lymphocytes for immortalization, or a cell line if already produced) should be stored in a repository laboratory (7). The PNC will modify the official website (8A) and at regular intervals an announcement may be made in the scientific journals of the two learned societies (8B).



INSTITUT NATIONAL DE LA TRANSFUSION SANGUINE

MODALITES DE RECONNAISSANCE D'UN NOUVEL ANTIGENE

VoxSanguinis

The International Journal of Transfusion Medicine

ISBT International Society
of Blood Transfusion

REVIEW

Vox Sanguinis (2013)

© 2013 International Society of Blood Transfusion
DOI: 10.1111/vox.12085

Human platelet antigens – 2013

B. R. Curtis & J. G. McFarland

Platelet & Neutrophil Immunology Laboratory, BloodCenter of Wisconsin, Milwaukee, WI, USA

LES ANTICORPS ANTI-PLAQUETTAIRES

◆ Les alloanticorps:

- Immunisation d'un sujet sain contre un (des) alloantigène(s) qu'il ne possède pas
 - Grossesse (alloimmunisation materno-foétale)
 - Transfusion (purpura post-transfusionnel)
- Les épitopes reconnus sont les alloantigènes plaquettaires, systèmes HPA (Human Platelet Antigen)

LES ANTICORPS ANTI-PLAQUETTAIRES

◆ Les auto-anticorps

Immunisation d'un sujet malade contre le Soi

- Purpura Thrombopénique Auto-Immun (PTAI)
- Les épitopes reconnus sont des auto-antigènes

◆ Les “ iso-anticorps ”

- Immunisation d'un sujet n'exprimant pas à la surface de ses plaquettes certaines glycoprotéines:

→ Cas des thrombopathies constitutionnelles héréditaires : Thrombasthénie de Glanzmann, Syndrome de Bernard-Soulier

Méthodes de détection des anticorps anti-plaquettaires

◆ Méthodes globales

pas de distinction entre les “vrais auto-anticorps” des complexes immuns circulants (récepteur Fc pour les IgG)

◆ Méthodes spécifiques

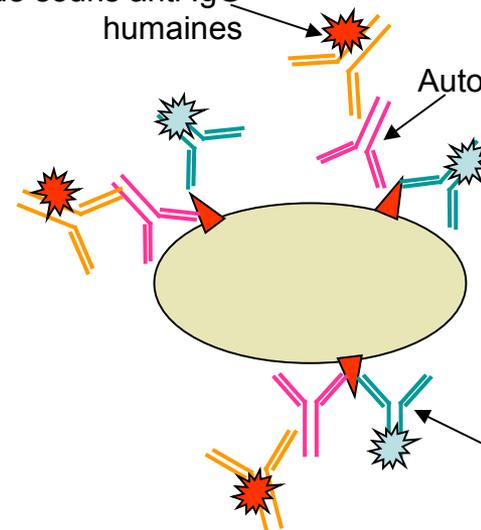
◆ Méthode globale : principe de la CMF

-Préparation des plaquettes du patient (sang EDTA)

-Double marquage des plaquettes

-Lecture

Ac monoclonal de souris anti IgG
humaines



Auto-anticorps du patient

Ac monoclonal de souris anti
GP humaine

- ◆ **Détection des IgG fixés sur les plaquettes** (Coombs plaquettaire)
 - Technique : CMF, interprétation du signal obtenu par rapport à des plaquettes témoins, technique rapide mais peu spécifique
 - Point critique : plvt obligatoire ≤ 72 h
 - Délai de résultat : 1J min/ 4J max
 - Apport : dépistage d'IgG fixés sur plaq (+ou-); si + recherche d'AutoAb par MAIPA direct

◆ Méthode spécifique : ELISA

- Méthode de référence: MAIPA

Monoclonal Antibody-specific Immobilization of Platelet Antigen
(1 kit commercial: ApDia)

- MACE

Modified Antigen Capture ELISA (kits commerciaux: GTI)

- MPHA

Mixed Passive Haemagglutination (kits commerciaux: Immucor, Sanquin)

◆ Identification d'Ab fixés sur les plaquettes

-Technique : MAIPA direct (technique in house)

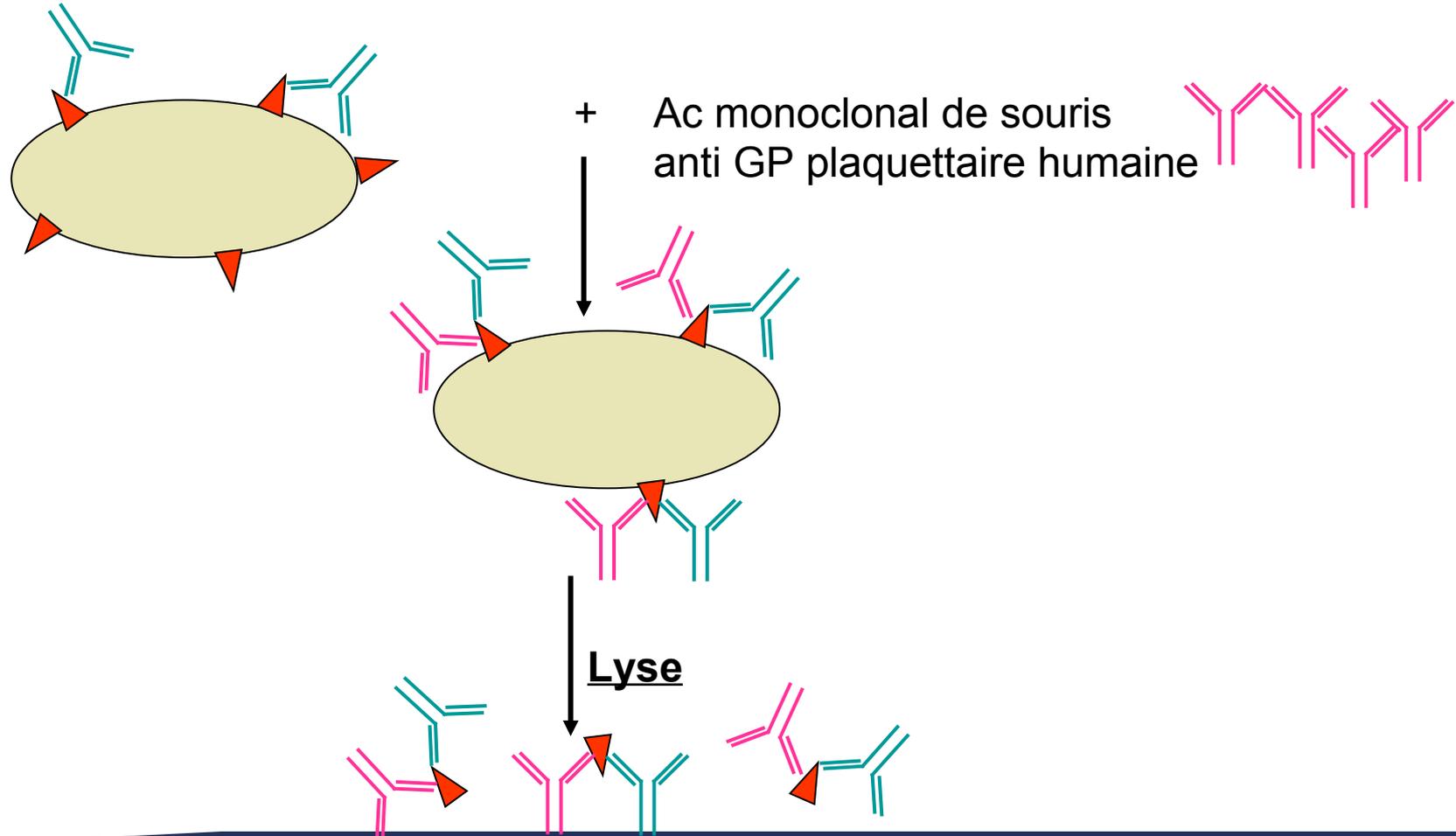
-Points critiques : concentration plaquettaire trop faible fct°
intensité de la thrombopénie

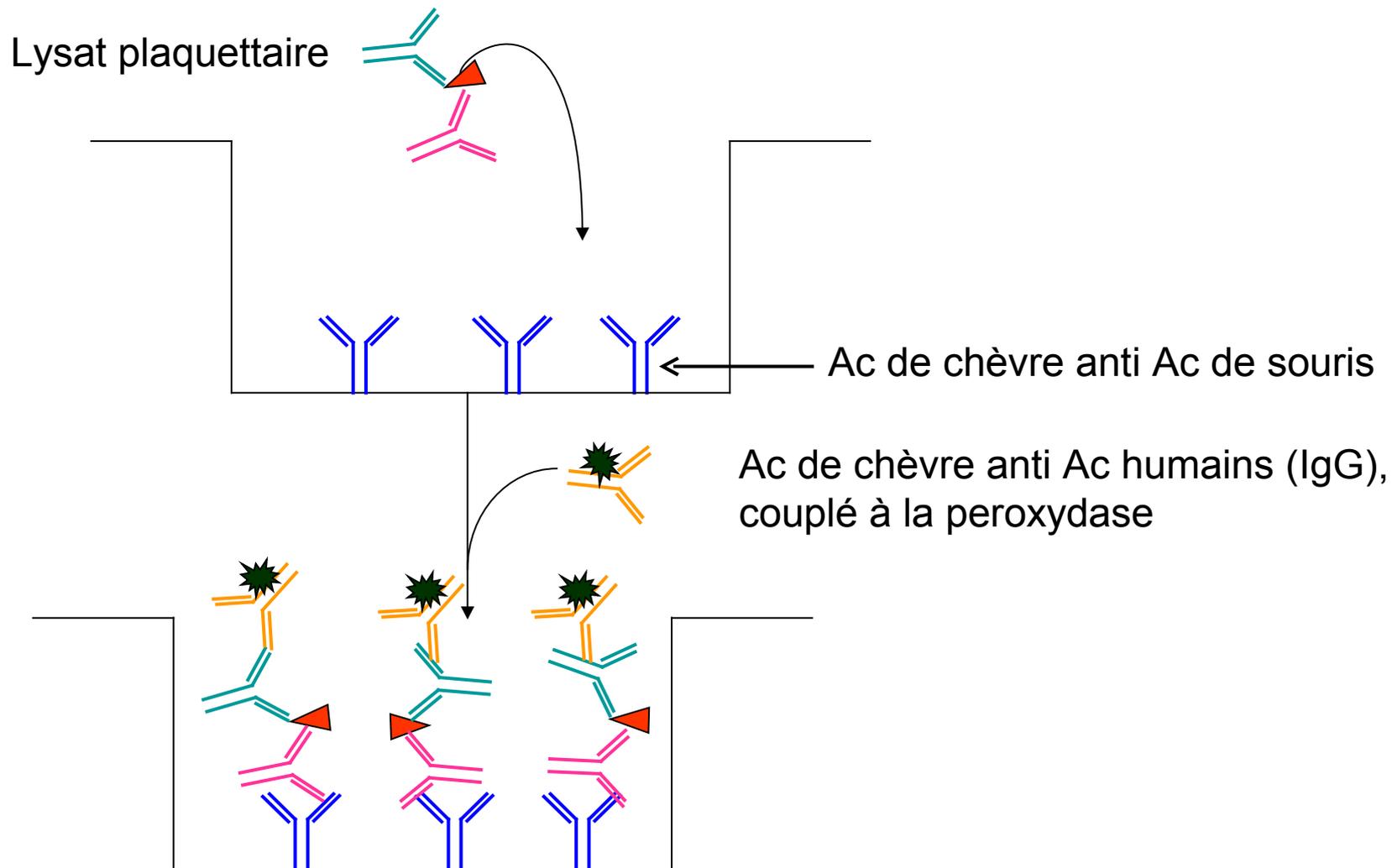
-Délai de résultat : 2J min/ 7J max

-Apport : identification de la nature des AutoAb fixés sur plaq (≠
gplalla, ≠gplbIIla, ≠gplbIX)

◆ MAIPA direct principe

Plaquettes du patient (auto-anticorps fixés)





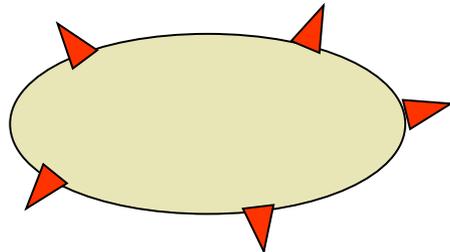
◆ Recherche et Identification d'Ab sériques

- Technique : MAIPA indirect (technique in house)
- Points critiques :
 - 2 étapes : dépistage et si + identification
 - mee de certains alloAb difficiles comme \neq HPA-3a, HPA-3b, \neq HPA-2, \neq HPA-4, \neq HPA-15 d'où pas de Δ alloimmunisation maternofoetale possible même si TNN
- Délai de résultat : 4J min/ 15J max
- Apport : test spécifique d'identification des Ab sériques dirigés contre les systèmes les + fréquents HPA-1, HPA-3 et HPA-5

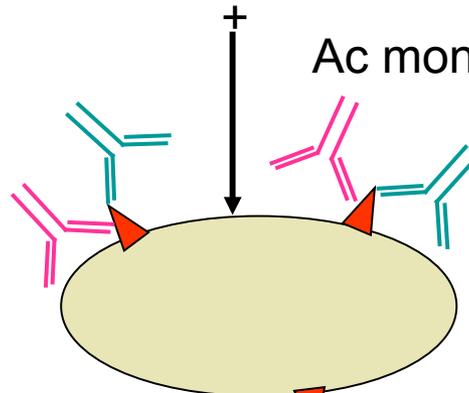
◆ MAIPA indirect principe

Plaquettes de donneurs (30 millions)

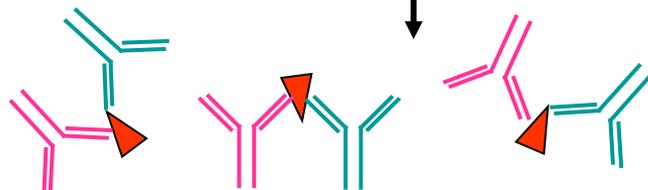
Sérum du patient (40 μ L)



Ac monoclonal anti GP plaquettaire humaine



Lyse



Dépôt sur plaque identique
au MAIPA Direct

◆ Cas particuliers:

-Test autologue :

incubation du sérum du patient avec ses propres plaquettes (recherche d'auto-anticorps sériques)

→ Négatif en cas d'allo-immunisation

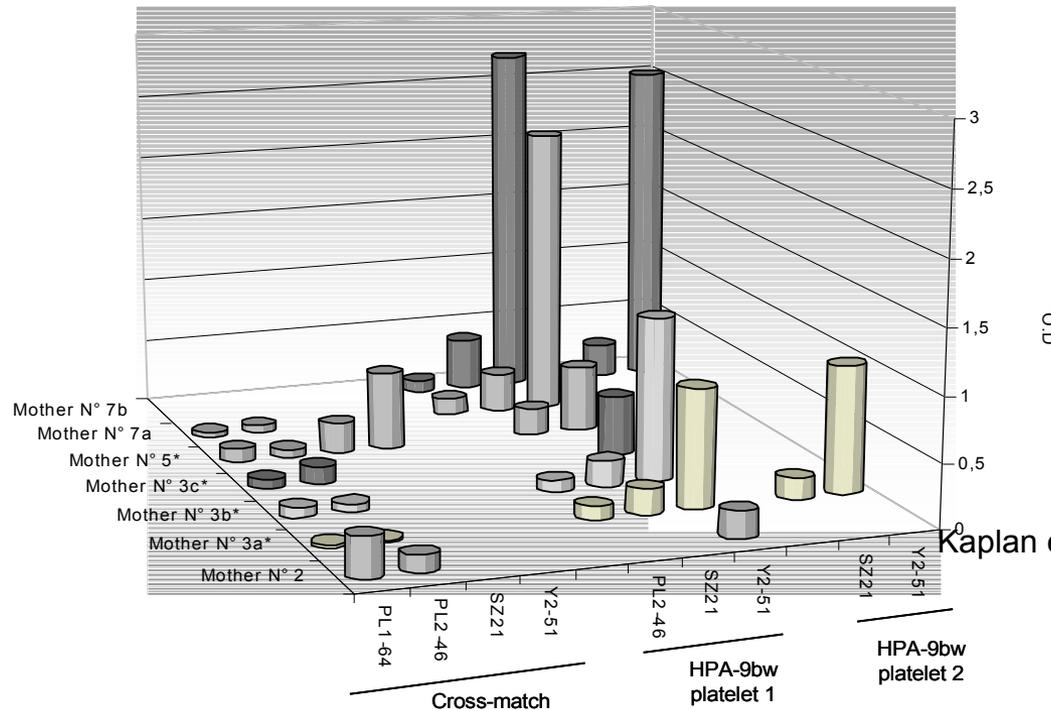
→ Positif en cas d'auto-immunité

-Test de Cross-Match:

incubation du sérum maternel avec les plaquettes paternelles (TNN)

DIFFICULTES TECHNIQUES POUR LA DETECTION ALLO-ANTICORPS (FAUX NEGATIFS)

- ◆ Compétition entre l'anticorps monoclonal de souris et les anticorps humains
- ◆ Antigènes HPA-3a, -3b, -15a et -15b labiles: nécessité d'utiliser des plaquettes de donneurs fraîchement préparées
- ◆ Cas des anticorps seulement détectables avec certains Mabs



Kaplan et al., *Transfusion*, 2005

DIFFICULTES TECHNIQUES POUR LA DETECTION ALLO-ANTICORPS (FAUX POSITIFS)

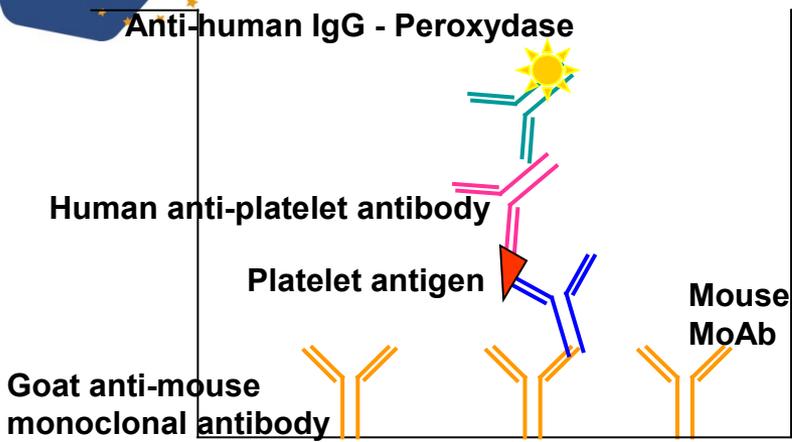
◆ Les glycosylations portées par les GPIa, GPIX, GPIIb et GPIIIa sont semblables à celles des antigènes sanguins A et B

Rq : En cas d'immunisation maternelle anti A ou B: les anticorps maternels se fixeront sur les GP des plaquettes paternelles → Faux-positif MAIPA

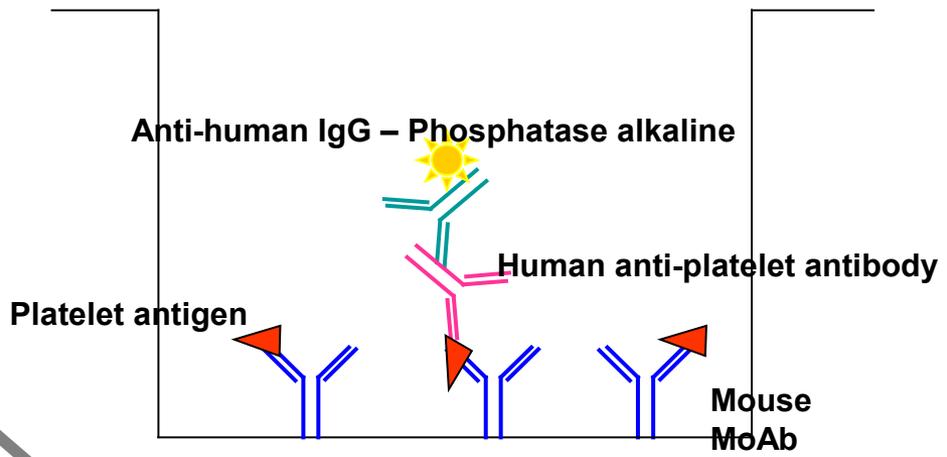
- ◆ **En conclusion : MAIPA technique** très sensible et spécifique mais manuelle
- Etape de lyse pouvant entraîner une perte de sensibilité pour les anticorps humains de faible affinité
- Problématique des faux-positifs et faux-négatifs



Méthodes alternatives: MACE, MPHA

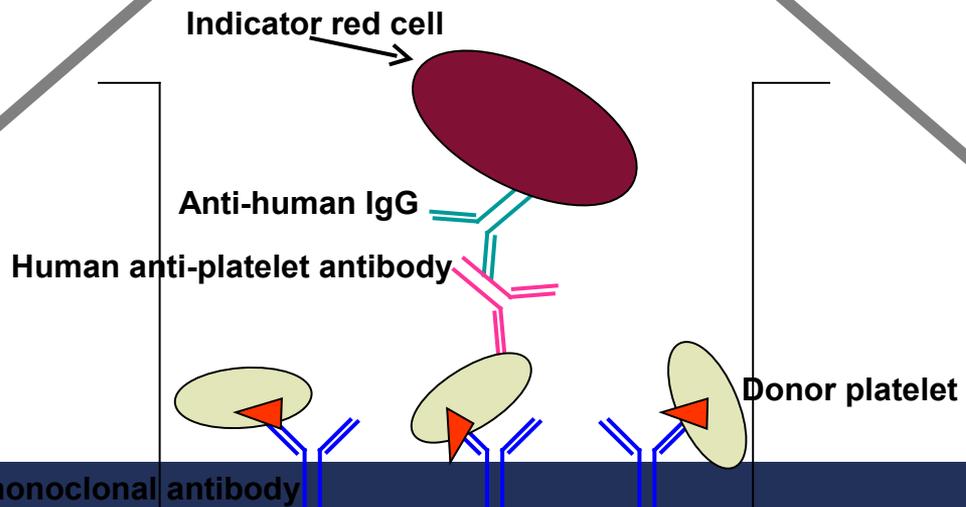


MAIPA
 Monoclonal Antibody-specific
 Immobilization of Platelet Antigens



MACE
 Modified Antigen Capture ELISA

MPHA
 Mixed Passive
 Haemagglutination



◆ **En conclusion :** CAT pour la recherche d'une autoimmunité anti-plaquettaire

- Recherche et identification des auto-anticorps fixés et circulants: signification différente et parfois stade différent de l'évolution de la maladie
- Recherche nécessaire si PTAI atypique, lors des thrombopénies de la grossesse ou lors du diagnostic de thrombopénies foetales/néonatales

◆ **En conclusion :** CAT pour la recherche d'une alloimmunisation anti-plaquettaire

- Mise en évidence de l'alloanticorps
- Détermination de l'antigène impliqué
- Typage plaquettaire

Typage plaquettaire

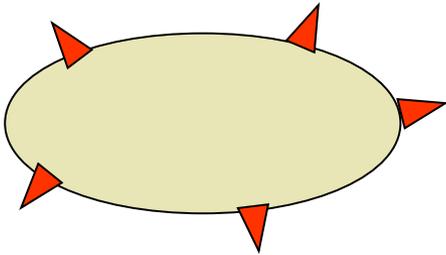
◆ **Rappels:**

• **Phénotypage** = étude des molécules exposées à la surface des plaquettes

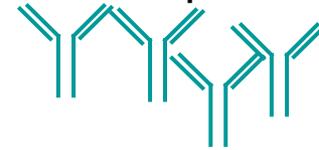
• **Génotypage** = étude du polymorphisme génétique à l'origine de l'antigène

PHENOTYPAGE PLAQUETTAIRE (MAIPA)

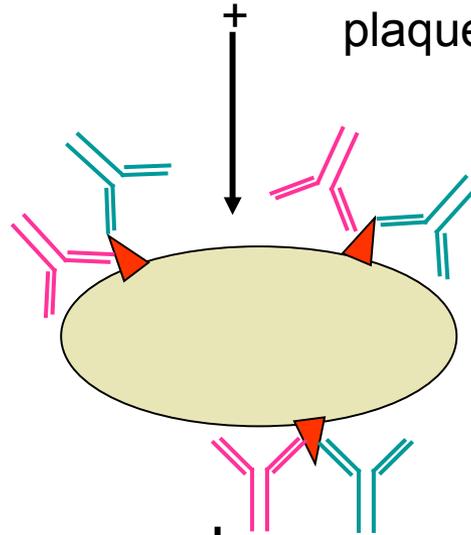
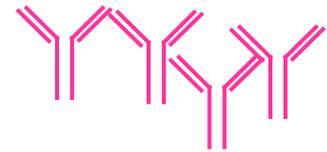
Plaquettes à phénotyper



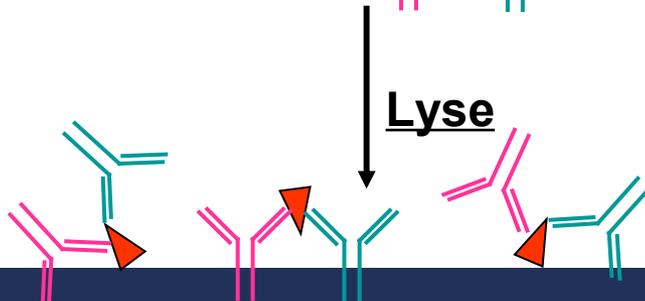
Sérum contenant des Ac de spécificité connue
+ (Ex: Ac anti HPA-1a)



Ac monoclonal anti GP
plaquettaire humaine



Lyse



Dépôt sur plaque identique
au MAIPA sérique

- ◆ Etape d'extraction de l'ADN
- ◆ Amplification de l'ADN par PCR (Polymerase Chain Reaction)
- ◆ Plusieurs méthodes : PCR-RFLP, PCR-SSP, PCR temps réel, Génotypage à haut débit (puces à ADN, microbilles,...)

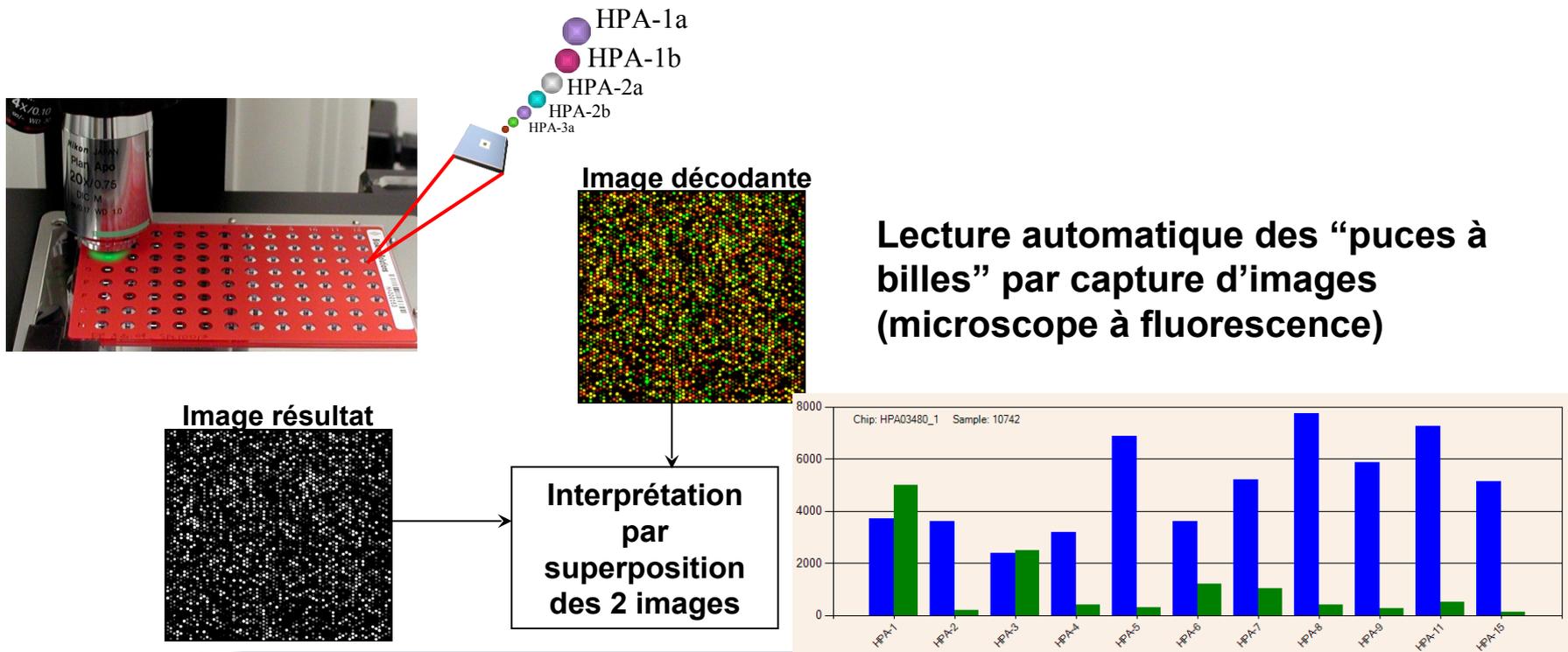
◆ Génomypage à haut débit

- Permet le génotypage simultané de plusieurs antigènes plaquettaires
- Puces à ADN
- Microbilles (Luminex)
- “Puces à billes” (Beadchip)

Rq : Avantage: gain de temps majeur / Inconvénient: coût élevé

Puces à billes (« HPA BeadChip », BioArray Solutions, Immucor)

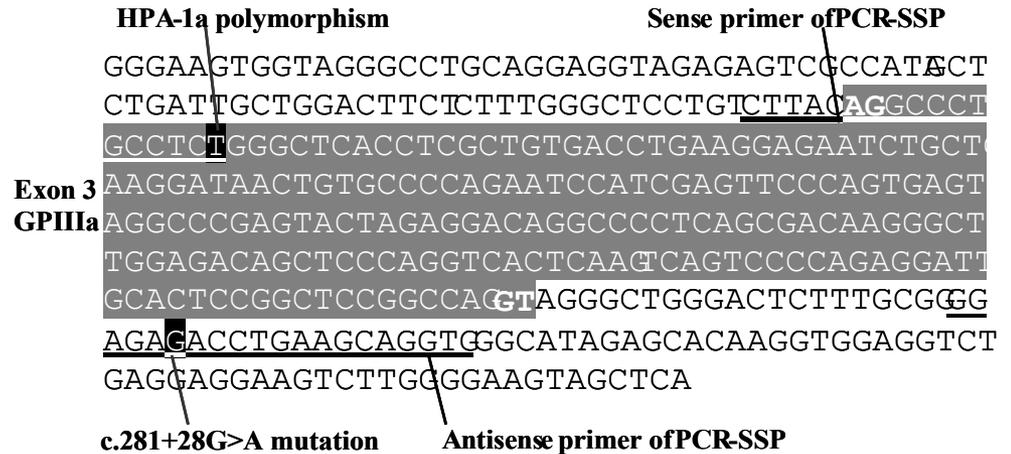
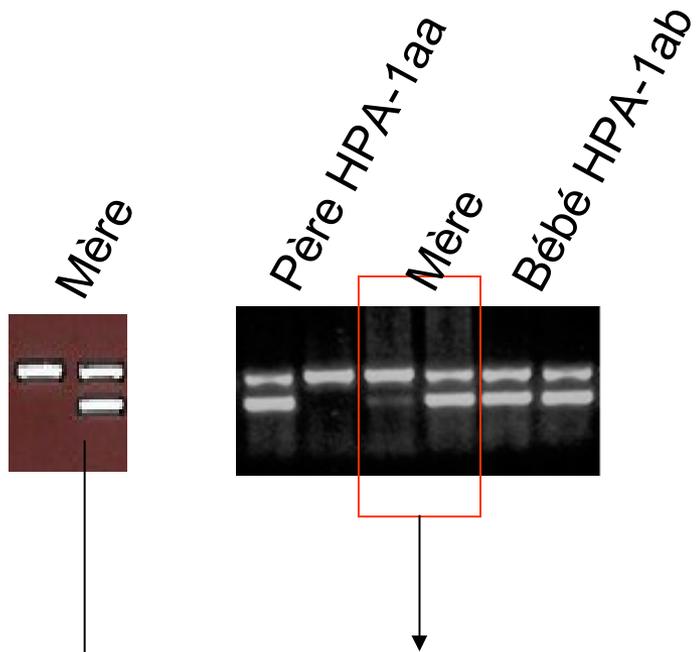
- PCR multiplexe (HPA-1 à -9, -11 et -15)
- génération des amplicons simple brin et marquage fluorescent
- hybridation sur les billes déposées en monocouche sur la lame



◆ En conclusion : expérience du typage plaquettaire

- Phénotypage HPA-1a, -3a et -5b systématique, par MAIPA
- Génotypage à haut débit BioArray,
complété par PCR-SSP ou PCR-RFLP en cas de difficultés
(techniques maison)
- Cas particulier du diagnostic prénatal:
double génotypage foetal par 2 techniques différentes et par 2
techniciens différents

Mutation à l'origine d'une erreur de génotypage



Génotypage / SSP InnoTrain	Génotypage / SSP « maison »	Génotypage / RFLP	Phénotypage HPA-1a
HPA-1bb	Ininterprétable	HPA-1ab	HPA 1a +

INTERET GENOTYPAGE- PHENOTYPAGE PLAQUETTAIRE

Thrombopathies constitutionnelles

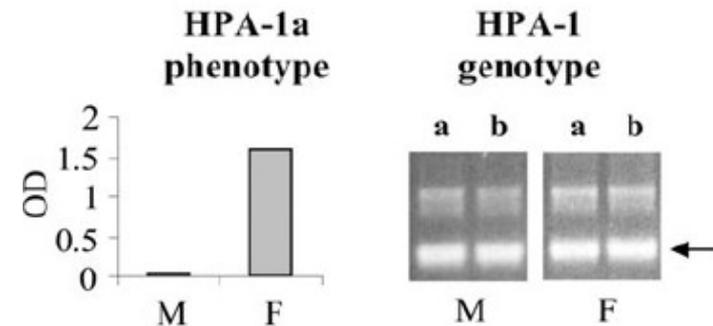
mutation à l'origine d'une absence d'expression d'un complexe glycoprotéique

- Thrombasthénie de Glanzmann: Défaut d'agrégation plaquettaire par déficit total d'expression de GPIIb/IIIa

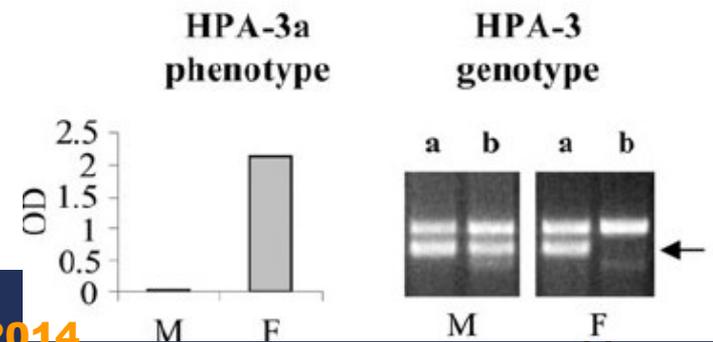
- Génotypage: OK si mutation pas localisée à proximité immédiate du polymorphisme ni sous une amorce de PCR

- Phénotypage: absence d'expression

Family L



Family S



CAT EN FONCTION DU CONTEXTE CLINIQUE

	Prélèvements	Recherche d'anticorps	Typage plaquettaire
Diagnostic d'auto-immunité	Du patient	-AutoAc sériques (MAIPA avec plaquettes de donneurs) -AutoAc fixés aux plaquettes du patient -test autologue	
Diagnostic d'allo-immunisation post-transfusionnelle	Du receveur (et du donneur si possible)	-AlloAc sériques (MAIPA avec plaquettes de donneurs)	-du receveur (et du donneur si possible)
Exploration d'une thrombopénie foetale ou néonatale	De la mère, du père et du nouveau-né	 Attention aux auto-anticorps maternels à l'origine de TNN -Auto et alloAc sériques (MAIPA avec plaquettes de donneurs ET cross-match sur plaquettes du père) -AutoAc fixés aux plaquettes / mère -test autologue / mère	-de la mère, du père et du nouveau-né

CAS PARTICULIER DE LA THROMBOPENIE NEONATALE

CAS CLINIQUE

- ◆ A la naissance, enfant ♀ présentant une thrombopénie sévère à 7 G/L pétéchie et purpura
- ◆ Suspicion d'alloimmunisation antiplaquettaire
- ◆ Demande de bilan de TNN
- ◆ Prise en charge thérapeutique : transfusion plaquettaire phénotypé et correction de la thrombopénie à 228 G/L

CARACTERISTIQUES

- ◆ Correspond à la MHNN pour les plaquettes
- ◆ Alloimmunisation materno-fœtale contre les alloantigènes plaquettaires (HPA)
- ◆ Fréquence chez les Caucasiens 1/800 à 1/1000 naissances
- ◆ Affection transitoire et passive du Nné
- ◆ **Risque majeur = HIC avec séquelles neurologiques**

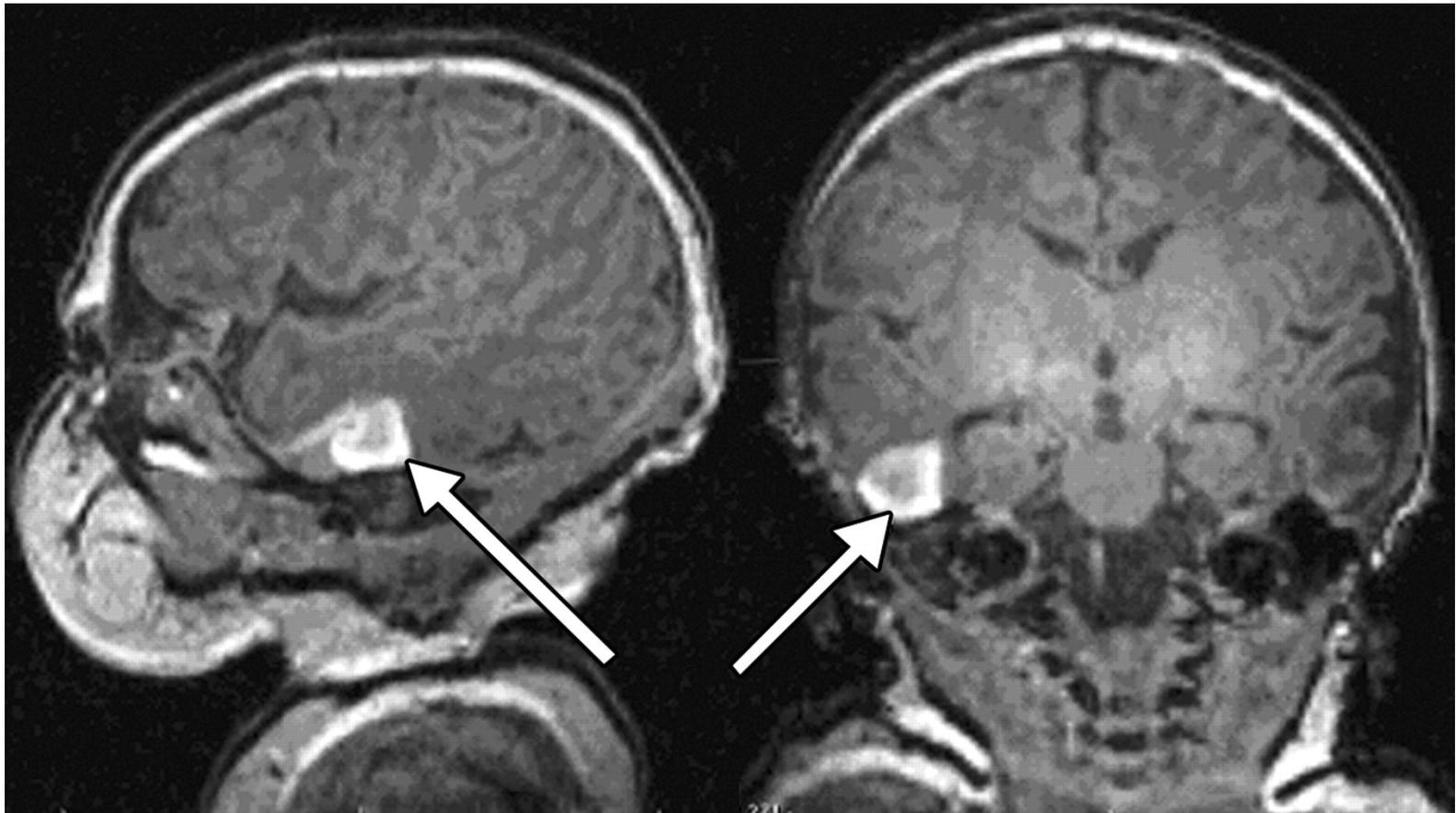
DECOUVERTE D'UNE THROMBOPENIE NEONATALE (TNN)

- ◆ Enfant à terme, souvent le 1er né (contrairement à la MHNN)
- ◆ Signes hémorragiques à la naissance ou très rapidement : pétéchies, purpura
- ◆ Plus rarement hémorragies viscérales, parfois HIC
- ◆ ∅ signes cliniques et thrombopénie isolée
- ◆ attention : PTAI et alloimmunisation

PURPURA



HIC



HIC



ALLOANTICORPS LES PLUS SOUVENT EN CAUSE DANS LES TNN

Chez les Caucasiens

- ◆ Fréquence des Ab : **HPA-1a > HPA-5b > HPA-3a**
- ◆ **Anti HPA-1a et Anti HPA-3a** :
thrombopénie très sévère, NP <50 G/L
- ◆ **Anti HPA-5b** : thrombopénie moins sévère

ALLOANTICORPS LES PLUS SOUVENT EN CAUSE DANS LES TNN

Chez les Asiatiques

◆ Fréquence des Ab : **HPA-4b > HPA-5b**

◆ **Anti HPA-6b et Anti HPA-4b** : thrombopénie
sévère

ALLOANTICORPS LES PLUS SOUVENT EN CAUSE DANS LES HIC

- ◆ 25,5% des cas HPA-1a, 24% HPA-3a, 15% HPA-5b
- ◆ 10% de décès, 20% séquelles neurologiques
- ◆ HIC : en cas ATCD récurrence estimée à 79%, sans ATCD survenue estimée à 7%

IMPORTANCE DU DIAGNOSTIC CLINIQUE

- ◆ Pour la prise en charge de l'enfant au niveau thérapeutique
- ◆ Pour la prise en charge de la mère pour les grossesses ultérieures
- ◆ Eventuellement prise en charge des sœurs de femmes à risque en âge de procréer

DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE D'UNE TNN

◆ **MAIPA Direct** sur plaquettes maternelles: recherche d'autoAb fixés sur les plaquettes (Cas: MAIPA direct négatif)

◆ **MAIPA Indirect** sur sérum maternel : recherche d'autoAb ou alloanticorps circulants (Cas: MAIPA indirect antiHPA-1a)

◆ **Cross Match** entre sérum maternel et plaquettes du père (Cas: CM positif)

◆ **Génotypage plaquettaire**
mère/père/Nné

(Cas: mère HPA-1b/b; père HPA-1a/a; Nné HPA-1a/b)



DIAGNOSTIC ALLOIMMUNISATION MATERNOFOETALE

Repose sur la mise en évidence **de l'Ab
sérique chez la mère**
+ de l'Ag correspondant chez l'enfant

PRISE EN CHARGE PRENATALE

- ◆ Place du **conseil génétique et du DPN** dans le cas père hétérozygote et mère homozygote
- ◆ Réduction des gestes invasifs
- ◆ Surveillance échographique renforcée
- ◆ Quantification des anticorps maternels anti-HPA1a

◆ Quantification des alloAb \neq HPA-1a

- Technique : MAIPA indirect
- Points critiques :
 - nécessité de connaître le terme pour calcul du titre
 - Interférence avec autoAb
 - remplissage du document de suivi de la concentration en allo-Ab \neq HPA-1a
 - réalisation de la quanti 1fois/3sem malgré la mise en route des IVIg hebdomadaires
- Délai de résultat : 2J min/ 15J max (le +svt en accord avec cliniciens)
- Apport : méthode développée pour évaluer la relation entre titre \neq HPA-1a / profondeur de la TNN et HIC + caractère prédictif de l'efficacité thérapeutique  suivi de cohorte en cours

PRISE EN CHARGE DES GROSSESSES A RISQUE

- ◆ Maternité prenant en charge les grossesses à risque (type III)
- ◆ Objectifs du traitement maternel : absence de complications fœtales sévères + NP fœtus/ Nné > 50 G/L
- ◆ Traitement maternel par IgIV+corticoïdes

CONCLUSION

- ◆ **Immunologie plaquettaire** passionnante et en constante évolution
- ◆ **Découverte de nouveaux systèmes HPA :** rôle du laboratoire de référence de l'INTS
- ◆ **Implication de l'Immunologie plaquettaire dans différents champs:**
autoimmunité, alloimmunisation
maternofoetale/posttransfusionnelle, état réfractaire,
thrombopénies induites par les médicaments (TIH....)
et thrombopathies héréditaires constitutionnelles