



UNIVERSITE DU DROIT ET DE LA SANTE - LILLE 2
FACULTE DE MEDECINE HENRI WAREMBOURG
Année : 2017

THÈSE POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT
DE DOCTEUR EN MÉDECINE

**Intérêt du dénombrement des microparticules plaquettaires
par cytométrie en flux dans le suivi thérapeutique des patients
atteints de néoplasies myéloprolifératives Phi négatives**

Présentée et soutenue publiquement le 23 mars 2017 à 18h
au Pôle Formation
Par Zoë THIBAUD

JURY

Président :

Madame le Professeur Sophie SUSEN

Assesseurs :

Monsieur le Professeur Claude PREUDHOMME

Madame le Docteur Nathalie CAMBIER

Directeur de Thèse :

Madame le Professeur Agnès CHARPENTIER

Avertissement

La Faculté n'entend donner aucune approbation aux opinions émises dans les thèses : celles-ci sont propres à leurs auteurs.

Table des matières

Table des illustrations.....	8
Table des abréviations.....	10
Généralités : Les Néoplasies Myéloprolifératives	12
I. Historique	12
II. Définition	13
III. Les néoplasies myéloprolifératives Ph1- (ou BCR/ABL-)	14
a) Épidémiologie.....	15
1. La Polyglobulie de Vaquez.....	15
2. La Thrombocytémie Essentielle.....	16
b) Physiopathologie	16
1. Mutations jouant un rôle dans les NMP.....	17
2. Modèle tumoral.....	26
IV. Tableau clinico-biologique.....	28
a) Polyglobulie de Vaquez	28
1. Circonstances diagnostiques	28
2. Biologie et anatomopathologie	29
3. Démarche diagnostique	30
b) Thrombocytémie Essentielle	30
1. Circonstances diagnostiques	31
2. Biologie et anatomopathologie.....	31
3. Démarche diagnostique	31
4. Complications des NMP.....	33
V. Thérapeutique	34
a) Stratification du risque	35
b) Stratégie thérapeutique	35
c) Traitements cytoréducteurs.....	36
1. Hydroxyurée	37
2. Interféron alpha pegylé.....	37
3. Anagrélide	38
4. Pipobroman.....	38
5. Anti JAK2.....	38

Généralités : Les Microparticules	39
I. Historique et découverte des microparticules	39
II. Définition des microparticules	42
a) Définition	42
b) Nomenclature	43
III. Formation des microparticules	45
a) Enzymes responsables des modifications membranaires	45
1. Rappels sur la membrane cellulaire	45
2. Enzymes impliquées dans la répartition membranaire en lipides	47
b) Enzymes responsables de modifications du cytosquelette	48
c) Formation des microparticules	49
d) Particularités de la voie apoptotique	50
IV. Élimination des microparticules	51
V. Composition des microparticules	52
a) Composition membranaire	52
b) Composition intravésiculaire	54
VI. Rôles des microparticules	55
a) Fonctions dans l'hémostase	56
1. Action procoagulante et prothrombotique	56
2. Fonction anticoagulante	58
b) Rôle dans la modulation du tonus vasculaire	59
c) Rôle dans l'inflammation	60
d) Rôle dans l'angiogenèse	61
e) Rôle dans la modulation de la réponse immunitaire	62
f) Rôle dans la dissémination des pathogènes	63
g) Rôle dans la communication intercellulaire	64
VII. Implication des MPs en pathologie	66
VIII. Microparticules et néoplasies myéloprolifératives Phi négatives : état des lieux.	68
Objectifs	70
I. Objectif principal de l'étude	70
II. Objectifs secondaires de l'étude	71
Matériels et méthodes	72
I. Population	72
a) Recrutement initial	72

b) Population d'étude	73
II. Variables étudiées	74
a) Variables quantitatives.....	75
b) Variables qualitatives	75
c) Constitution des groupes selon la présence d'un traitement cytoréducteur	75
d) Constitution des groupes selon la réponse au traitement cytoréducteur	77
III. Préanalytique.....	80
IV. Analytique.....	80
a) Centrifugation.....	80
b) Conservation.....	81
c) Identification et dénombrement des microparticules	81
d) Propreté du cytomètre.....	82
e) Contrôle de la zone d'analyse	82
f) Marquage des MPs.....	84
g) Analyse sur le cytomètre	86
V. Précisions propres au travail sur la comparaison des deux cytomètres	87
VI. Analyses statistiques.....	91
Résultats	94
I. Populations.....	94
a) Inclusion et diagramme de flux	94
b) Caractéristiques clinico-biologiques des populations au diagnostic.....	95
II. Concentrations en MPs au diagnostic	98
a) Selon les groupes PV, TE et témoins	98
b) Modélisation des concentrations en PMP au diagnostic selon les groupes NMP et témoins	100
III. Évolution des concentrations en PMPs au cours du traitement cytoréducteur.	103
a) Populations.....	103
b) Évolution des concentrations en PMPs de T0 à T6	105
c) Évolution des concentrations en PMPs de T0 à T12	106
d) Évolution des PMPs P-selectine négatives de T0 à T6.....	107
IV. Évolution des concentrations en PMPs selon la réponse au traitement	108
a) Évolution des concentrations en PMPs de T0 à T6 selon la réponse partielle ou l'échec thérapeutique.....	108
b) Évolution des concentrations en PMPs de T0 à T6 selon la réponse partielle, la non réponse biologique, la persistance de signes cliniques et la progression.....	110
V. Facteurs prédictifs au diagnostic de réponse au traitement.....	112

a) Cas des PMPs.....	112
b) Modélisation de la réponse au traitement.....	113
VI. Évaluation du nouveau cytomètre (Navios) pour le dénombrement des PMPs.....	115
a) Comparaison des données mesurées.....	115
b) Étude de la corrélation entre les résultats obtenus.....	116
c) Étude de la concordance entre les résultats obtenus.....	117
d) Illustration par un cas.....	121
Discussion.....	123
I. Caractéristiques clinico-biologiques des populations au diagnostic.....	124
II. Concentrations en MPs au diagnostic.....	124
a) Selon les groupes PV, TE et témoins.....	124
b) Modélisation de la concentration en PMPs au diagnostic selon les groupes néoplasie myéloproliférative et témoins.....	125
III. Évolution des concentrations de PMPs au cours du traitement cytoréducteur.....	126
a) Population.....	126
b) Évolution des concentrations en PMPs de T0 à T6.....	126
c) Évolution des concentrations en PMPs de T0 à T12.....	127
d) Évolution des concentrations en PMPs Psel- de T0 à T6.....	128
IV. Évolution des concentrations en PMPs selon la réponse au traitement.....	130
V. Facteurs prédictifs de réponse au traitement cytoréducteur au diagnostic.....	132
a) Cas des PMPs.....	132
b) Modélisation de la réponse au traitement.....	133
VI. Évaluation du nouveau cytomètre (Navios) pour le dénombrement des PMPs.....	133
a) Comparaison des données mesurées.....	133
b) Étude de la corrélation entre les résultats obtenus.....	134
c) Étude de la concordance entre les résultats obtenus.....	134
Conclusion.....	136
Bibliographie.....	137

TABLE DES ILLUSTRATIONS

FIGURE 1 : FRISE HISTORIQUE DES PRINCIPALES DECOUVERTES CONCERNANT LES SMPs (1–10).....	12
FIGURE 2 : COMPARAISON DE COURBES DE SURVIE	16
FIGURE 3 : ÉPIDÉMIOLOGIE DES PRINCIPALES MUTATIONS <i>DRIVER</i> RETROUVEES DANS LES NMP PH1-	18
FIGURE 4 : ACTIVATION PHYSIOLOGIQUE DES RECEPTEURS A CYTOKINES ET IMPLICATION DE JAK2.	20
FIGURE 5 : POSITION GENOMIQUE DE 36 MUTATIONS IDENTIFIEES DU GENE CALR (9).....	23
FIGURE 6 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE D'UN MODELE DE DEVELOPPEMENT TUMORAL DES NMP.....	26
FIGURE 7 : ALGORITHME DIAGNOSTIQUE POUR LA POLYGLOBULIE DE VAQUEZ ET LA THROMBOCYTEMIE ESSENTIELLE (33).	32
FIGURE 8 : ALGORITHME THERAPEUTIQUE POUR LA THROMBOCYTEMIE ESSENTIELLE ET LA POLYGLOBULIE DE VAQUEZ (33).....	36
FIGURE 9 : MICROSCOPIE ELECTRONIQUE DE MICROPARTICULES CIRCULANTES CHEZ UN PATIENT ATTEINT D'UN SYNDROME CORONAIRE AIGU.	40
FIGURE 10 : MICROSCOPIE ELECTRONIQUE DE MPs ISSUES DE CELLULES ENDOTHELIALES MONOCOUCHEES DE CELLULES ENDOTHELIALES CULTIVEES (A ET B) ET STIMULEES PAR TUMOR NECROSIS FACTOR (C ET D) A DIFFERENTS GROSSISSEMENTS (A ET C X 1500 ; B ET D X 3000) ; DES BOURGEONNEMENTS ET VESICULES DETACHEES SONT POINTES PAR DES FLECHES. (COMBES 1999) (50)	41
FIGURE 11 : DIFFERENTES NOMENCLATURES DES VESICULES EXTRACELLULAIRES,	44
FIGURE 12 : STRUCTURE DE LA MEMBRANE CELLULAIRE.....	46
FIGURE 13 : ENZYMES PARTICIPANT AU MAINTIEN DE L'ASYMETRIE MEMBRANAIRE EN PHOSPHOLIPIDES.	48
FIGURE 14 : BOURGEONNEMENT CELLULAIRE, CONSEQUENCE DE L'AFFLUX CYTOSOLIQUE DE Ca^{2+}	50
FIGURE 15 : PLACE DE LA VOIE ROCK DANS LE PHENOMENE DE VESICULATION LORS DE L'APOPTOSE	51
FIGURE 16 : REPRESENTATION DU CONTENU DES MPs.....	55
FIGURE 17 : ASSEMBLAGE DES COMPLEXES DE COAGULATION SUR LA MEMBRANE PHOSPHOLIPIDIQUE.....	57
FIGURE 18 : MOLECULES LIBEREES ET LEURS PRINCIPALES ACTIONS, EN FONCTION DU TYPE DE MPs.....	61
FIGURE 19 : REPRESENTATION DU CCR5 DANS L'INFECTION CELLULAIRE PAR LE HIV (122).....	64
FIGURE 20 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES MECANISMES IMPLIQUES DANS LA COMMUNICATION ENTRE MPs ET CELLULES....	64
FIGURE 21 : REPRESENTATIONS SCHEMATIQUES DES DELAIS DE SUIVI ET DU TEMPS D'ETUDE ANALYSES CHEZ NOS PATIENTS.	74
FIGURE 22 : REPRESENTATION HIERARCHIQUE DES CRITERES D'INTERET DANS LA POPULATION ETUDIEE.....	76
FIGURE 23 : CONTROLE DE LA REPARTITION DES 3 CATEGORIES (BILLES 3 μ M, BILLES 0,9 μ M, BILLES 0,5 μ M) DE BILLES DU MEGAMIX [®]	83
FIGURE 24 : PROTOCOLE ANALYTIQUE DE MARQUAGE POUR LE DENOMBREMENT DES MICROPARTICULES AVANT PASSAGE SUR LE CYTOMETRE.....	85
FIGURE 25 : PROTOCOLE SIMPLIFIE DE COMPARAISON DES DEUX CYTOMETRES (FC 500 ET NAVIOS).	87
FIGURE 26 : REPARTITION DES 4 CATEGORIES DE BILLES DU MELANGE MEGAMIX PLUS [®] SELON LEUR STRUCTURE ET LEUR INTENSITE DE FLUORESCENCE.....	90
FIGURE 27 : REPARTITION DES BILLES DE 0,3 μ M, 0,5 μ M ET 0,9 μ M DU MEGAMIX PLUS [®] SELON LEUR TAILLE.....	90
FIGURE 28 : DEFINITION DE LA ZONE D'ANALYSE DES MPs SUR LE NAVIOS A L'AIDE DES BILLES MEGAMIX PLUS [®]	90
FIGURE 29 : DIAGRAMME DESCRIPTIF DE LA POPULATION TOTALE ANALYSEE.....	95
FIGURE 30 : REPRESENTATIONS GRAPHIQUES EN BOITES A MOUSTACHES DES CONCENTRATIONS PLASMATIQUES AU DIAGNOSTIC	99
FIGURE 31 : REPRESENTATION GRAPHIQUE EN BOITES A MOUSTACHES DES CONCENTRATIONS PLASMATIQUES EN PMPs AU DIAGNOSTIC EN FONCTION DES GROUPES NMP ET TEMOINS.	100
FIGURE 32 : DIAGRAMME DESCRIPTIF DES PATIENTS ATTEINTS DE NMP SELON LE TRAITEMENT CYTOREDUCTEUR.	104
FIGURE 33 : REPRESENTATION GRAPHIQUE EN BOITES A MOUSTACHES DES CONCENTRATIONS EN PMPs A T0 ET A T6 DANS LES GROUPES NON TRAITES, TRAITES ET TEMOINS.	105
FIGURE 34 : COMPARAISON DES DIFFERENCES DE CONCENTRATIONS PLASMATIQUES EN PMPs A T0, T6 ET T12	107
FIGURE 35 : REPRESENTATION GRAPHIQUE EN BOITES A MOUSTACHES DES CONCENTRATIONS EN PMPs A T0 ET A T6 DANS LES GROUPES « ECHEC THERAPEUTIQUE » ET « REPONSE PARTIELLE AU TRAITEMENT CYTOREDUCTEUR ».	109

FIGURE 36 : DIAGRAMME DESCRIPTIF DE LA POPULATION ATTEINTE DE NMP ANALYSEE SELON LA REPONSE AU TRAITEMENT CYTOREDUCTEUR.	110
FIGURE 37 : REPRESENTATION GRAPHIQUE EN BOITES A MOUSTACHES DES CONCENTRATIONS EN PMPs A T0 ET A T6 DANS LES SOUS-GROUPES EN ECHEC THERAPEUTIQUE (PERSISTANCE DE SIGNES CLINIQUES, PROGRESSION, NON REPONSE BIOLOGIQUE) ET DANS LE GROUPE REPONSE PARTIELLE AU TRAITEMENT CYTOREDUCTEUR.	112
FIGURE 38 : REPRESENTATION GRAPHIQUE DE LA COURBE ROC (<i>RECEIVER OPERATING CHARACTERISTICS</i>) ET DESCRIPTION DU SEUIL OPTIMUM ESTIME (PMP = 1637/ μ L).	113
FIGURE 39 : REPRESENTATION GRAPHIQUE EN BOITES A MOUSTACHES DES CONCENTRATIONS EN PMPs MESUREES SUR NOS 2 CYTOMETRES (CYTOMICS FC500 ET NAVIOS).	116
FIGURE 40 : ÉTUDE DE LA CORRELATION ENTRE LES TECHNIQUES SUR FC500 ET SUR NAVIOS :	116
FIGURE 41 : REPRESENTATION GRAPHIQUE DE L'ETUDE DE LA CONCORDANCE	118
FIGURE 42 : REPRESENTATION GRAPHIQUE DE L'ETUDE DE LA CONCORDANCE	119
FIGURE 43 : REPRESENTATION GRAPHIQUE DE L'ETUDE DE LA CONCORDANCE	119
FIGURE 44 : REPRESENTATIONS GRAPHIQUES DE L'ETUDE DE LA CONCORDANCE SUR LA PLAGE PMPs MOYENNES >8000	120
FIGURE 45 : CYTOGRAMMES ANNEXINE V/CD41 OBTENUS PAR CYTOMETRIE EN FLUX SUR (A) FC500 ET (B) NAVIOS	122
TABLEAU 1 : CLASSIFICATION OMS 2016 DES NEOPLASIES MYELOPROLIFERATIVES.	14
TABLEAU 2 : ÉPIDEMIOLOGIE DES PRINCIPALES MUTATIONS <i>DRIVER</i> -RETROUVEES DANS LES NMP PH1-	18
TABLEAU 3 : TABLEAU DES PRINCIPAUX GENES MUTES DANS LES NMP CLASSIQUES (HORS JAK2, MPL, CALR) (18).	25
TABLEAU 4 : CRITERES DIAGNOSTIQUES DES NMP PH1- SELON LA CLASSIFICATION OMS 2016	29
TABLEAU 5 : CARACTERISTIQUES DES VESICULES EXTRACELLULAIRES (64)	44
TABLEAU 6 : PRINCIPAUX MARQUEURS ANTIGENIQUES DES MPs.	53
TABLEAU 7 : PRINCIPAUX EFFETS BIOLOGIQUES DES MPs.	56
TABLEAU 8 : PRINCIPALES IMPLICATIONS DES MPs EN PATHOLOGIE HEMATOLOGIQUE.	67
TABLEAU 9 : CRITERES DE REPONSE AU TRAITEMENT CYTOREDUCTEUR POUR LA POLYGLOBULIE DE VAQUEZ PROPOSES PAR BAROSI (156).	78
TABLEAU 10 : CRITERES DE REPONSE AU TRAITEMENT CYTOREDUCTEUR POUR LA THROMBOCYTEMIE ESSENTIELLE PROPOSES PAR BAROSI (156).	78
TABLEAU 11 : ANTICORPS, FLUOROCHROMES ET VOLUMES DES DIFFERENTS MARQUAGES DE MPs REALISES.	85
TABLEAU 12 : ANALYSES DESCRIPTIVES ET COMPARAISON DES GROUPES TE, PV ET TEMOINS AU DIAGNOSTIC.	97
TABLEAU 13 : COMPARAISONS DES CONCENTRATIONS DES DIFFERENTS TYPES DE MPs PLASMATIQUES	100
TABLEAU 14 : MODELE DE REGRESSION LINEAIRE : COMPARAISON DES CONCENTRATIONS EN PMPs AU DIAGNOSTIC SELON UNE ANALYSE	102
TABLEAU 15 : MODELE DE REGRESSION LINEAIRE EN FONCTION DE LA VARIABLE REPONSE AU TRAITEMENT SELON UNE ANALYSE	115
TABLEAU 16 : MOYENNES ET DIFFERENCES ENTRE LES MESURES REALISEES SUR LES DEUX CYTOMETRES.	121

TABLE DES ABREVIATIONS

ADN : acide désoxyribonucléique
AMP : adénosine monophosphate
ARN : acide ribonucléique
AVC : accident vasculaire cérébral
CALR : Calréticuline
CD : cluster de différenciation
CE : cellules endothéliales
CHRU : Centre Hospitalier Régional Universitaire
EDTA : acide éthylène diamine tétraacétique
EMP : microparticules dérivant de cellules endothéliales
EPCR : *endothelial protein C receptor*
EPO : érythropoïétine
FITC : isothiocyanate de fluorescéine
FS : *forward scatter*
FT : facteur tissulaire
G-CSF : *Granulocyte-colony stimulating factor*
GH : hormone de croissance
GHICL : Groupement des Hôpitaux de l'Institut Catholique de Lille
GM-CSF : *granulocyte-macrophage-colony stimulating factor*
Hb : hémoglobine
HIV-1 : virus de l'immunodéficience humaine de type 1
HTA : hypertension artérielle
ICAM-1 : *InterCellular Adhesion Molecule 1*
IDE : infirmier(e) diplômé(e) d'état
IL-3 : interleukine 3
IL-5 : interleukine 5
IPSET : *International Prognostic Score of Thrombosis for ET*
ISTH : Société Internationale de Thrombose et d'Hémostase
JAK2 : Janus kinase 2
JH1 : *jak homology domain 1*
JH2 : *jak homology domain 2*
LAM : leucémie aiguë myéloïde
LMC : leucémie myéloïde chronique
MF : myélofibrose
MFP : myélofibrose primitive
MMP : métalloprotéases matricielles
MMP : microparticules monocytaires
MP : microparticules
MPL : *myeloproliferative leukemia*
NFS : numération formule sanguine
NMP : néoplasie myéloproliférative

NO : monoxyde d'azote
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
PC : phosphatidylcholine
PC7 : phycoérythrine cyanine 7
PDGF : *Platelet-derived growth factor*
PE : phosphatidyléthanolamine
PE : phycoérythrine
PFP : *platelet free plasma*
Ph1 : chromosome philadelphie
PL : phospholipides
PMP Psel- : microparticules plaquettaires n'exprimant pas la P-sélectine
PMP : microparticules plaquettaires
PS : phosphatidylsérine
PTT : purpura thrombotique et thrombocytopénique
PV : polyglobulie de Vaquez
ROC : *Receiver Operating Characteristics*
SM : sphingomyéline
SMP : syndrome méloprolifératif
SS : *side scatter*
STAT : *signal transducer and activator of transduction*
TE : thrombocytémie essentielle
TPO : thrombopoïétine
uPa : urokinase
VEGF : *Vascular endothelial growth factor*
vWF : facteur von Willebrand

GENERALITES : LES NEOPLASIES MYELOPROLIFERATIVES

I. Historique

Le terme de « syndromes myéloprolifératifs » (SMP) est décrit pour la première fois par Dameshek en 1951 afin de regrouper des pathologies qui lui semblent liées phénotypiquement (Figure 1). Sa définition englobe 4 pathologies : la Leucémie Myéloïde Chronique (LMC) décrite pour la première fois en 1845 par Benett, la Polyglobulie de Vaquez (PV) décrite en 1892, la Thrombocytemie Essentielle (TE) découverte en 1934, et la Myélofibrose Primitive (MFP) décrite en 1879 (1). La découverte en 1960 par Nowell et Hungerford du chromosome Philadelphie (Ph1) puis de la translocation $t(9;22)$ en 1972, anomalies spécifiques de la LMC au niveau chromosomique, permettent alors de distinguer deux groupes dans ces SMP : les SMP-Ph1 positifs (LMC) et les SMP-Ph1 négatifs (PV, TE, MFP).

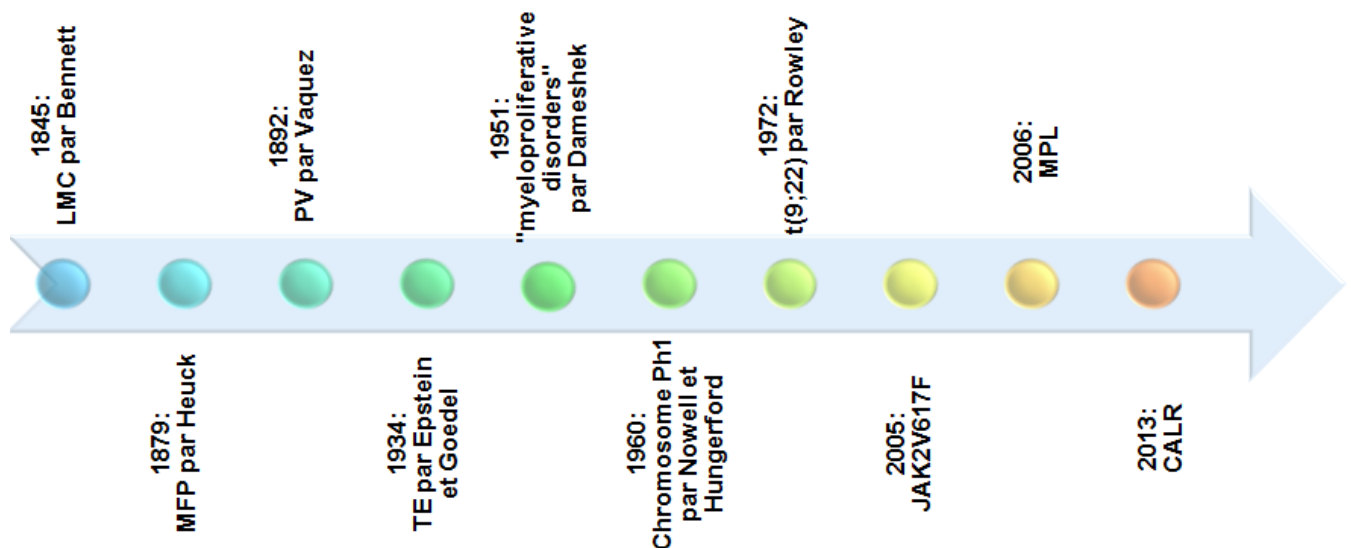


Figure 1 : Frise historique des principales découvertes concernant les SMPs (1–10)

Le terme de « syndromes myéloprolifératifs » a été remplacé par la classification OMS de 2008 en « néoplasies myéloprolifératives » (NMP) ; et la découverte de mutations caractéristiques de ces pathologies, de la Janus kinase 2 ($JAK2^{V617F}$) en 2005, de la *myeloproliferative leukemia* (MPL) (gène codant pour le récepteur à la thrombopoïétine) en 2006, et de la calréticuline (CALR) plus récemment en 2013, ont également permis de faire évoluer cette classification (Figure 1).

II. Définition

Les néoplasies myéloprolifératives (NPM) sont des hémopathies malignes chroniques du tissu myéloïde (moelle osseuse). Elles sont caractérisées par une prolifération clonale et maligne d'une ou plusieurs lignées myéloïdes matures sans blocage de maturation, par un mécanisme d'hypersensibilité ou d'indépendance aux cytokines survenant au niveau de cellules multipotentes.

Les 4 composants principaux des NMP sont la Leucémie Myéloïde Chronique, la Polyglobulie de Vaquez, la Thrombocythémie Essentielle, et la Myélofibrose Primitive, séparés par la classification OMS 2016 en trois groupes : les NMP-Ph1+, les NMP-Ph1- et les autres NMP. Les NMP-Ph1+ et les NMP-Ph1- peuvent être également appelées NMP BCR-ABL1 positives ou négatives, la translocation bcr/abl correspondant à l'anomalie spécifique de la LMC au niveau génique. Ces différentes pathologies ont une expression propre à chacune d'entre elles, des présentations clinico-biologiques et des pronostics différents ; mais elles sont caractérisées par un spectre commun d'anomalies moléculaires, et par des complications communes qui justifient leur réunion au sein de la même classification (Tableau 1).

Tableau 1 : Classification OMS 2016 des néoplasies myéloprolifératives (11)

Néoplasies myéloprolifératives (NMP)	Leucémie Myéloïde Chronique BCR-ABL1-positive	
	Néoplasies myéloprolifératives BCR-ABL1-négatives	Polyglobulie de Vaquez
		Thrombocythémie Essentielle
		Myélofibrose Primitive
		Myélofibrose Primitive au stade préfibrotique
	Autres néoplasies myéloprolifératives	Leucémie Chronique à neutrophiles
		Leucémie Chronique à éosinophiles
		Mastocytoses
		Néoplasies myéloprolifératives inclassables

Dans ce travail nous parlerons uniquement des néoplasies myéloprolifératives Ph1 négatives, et en raison de l'épidémiologie de ces pathologies rares, nous avons fait le choix de développer uniquement la PV et la TE.

III. Les néoplasies myéloprolifératives Ph1- (ou BCR/ABL-)

La Polyglobulie de Vaquez est une hémopathie maligne chronique caractérisée par une polyglobulie sur le plan biologique et dont la clinique est marquée par des signes de myéloprolifération (signes d'hyperviscosité, microvasculaires...). Son risque principal à court, comme à long terme, est la thrombose. L'autre complication majeure à long terme de la PV est la transformation, leucémique ou en myélofibrose secondaire. Les PV sont caractérisées par la présence d'une mutation de JAK2 (V617F ou exon 12) jouant un rôle dans l'activation de la voie JAK/STAT. Le diagnostic de PV est parfois difficile car cette

pathologie, faisant partie des NMP BCR/ABL négatives, est physiopathologiquement proche de la thrombocythémie essentielle et de la myélofibrose primitive. Certaines formes de TE (mutées JAK2) peuvent même évoluer en PV, ce qui conforte l'hypothèse que les PV et TE mutées JAK2 sont en réalité différents phénotypes d'une même néoplasie myéloproliférative (12). La stratégie thérapeutique des PV est fondée sur la gestion du risque thrombotique.

La Thrombocythémie Essentielle est une hémopathie maligne chronique impliquant la lignée mégacaryocytaire, avec au niveau médullaire une hyperplasie mégacaryocytaire et la présence de mégacaryocytes géants. La thrombocytose chronique est le principal signe biologique de cette pathologie. Son diagnostic est difficile puisque la TE reste un diagnostic d'exclusion et ne doit pas être confondue avec un stade précoce d'une autre NMP (stade précoce d'une PV, stade préfibrotique d'une Myélofibrose Primitive). Des mutations sont retrouvées dans environ 75 % des cas (principalement de JAK2, CALR et MPL) et permettent de distinguer les TE JAK2+, phénotypiquement proches des PV, les TE CALR+, maintenant considérées comme entités pathologiques distinctes des autres TE tant au niveau clinique que pronostique, les TE MPL+, et les TE non mutées dites « triple négative » (13). La principale complication des TE est la thrombose et la gestion de ce risque thrombotique est à la base de la stratégie thérapeutique.

a) Épidémiologie

1. La Polyglobulie de Vaquez

L'âge médian au diagnostic est de 65 ans (14). La médiane de survie pour les PVs non compliquées est estimée à environ 14 ans (Figure 2) (15). L'incidence

de la PV est d'environ 2 à 3 cas pour 100 000 habitants par an (16). La prévalence de la PV est d'environ 44 à 57 cas pour 100 000 habitants (17).

2. La Thrombocythémie Essentielle

L'âge médian est de 69 ans au moment du diagnostic initial (14). La médiane de survie pour les TE non compliquées est estimée à environ 20 ans (Figure 2) (15). L'incidence de la TE est d'environ 2 cas pour 100 000 habitants par an (16). La prévalence de la TE est d'environ 38 à 57 cas pour 100 000 habitants (17).

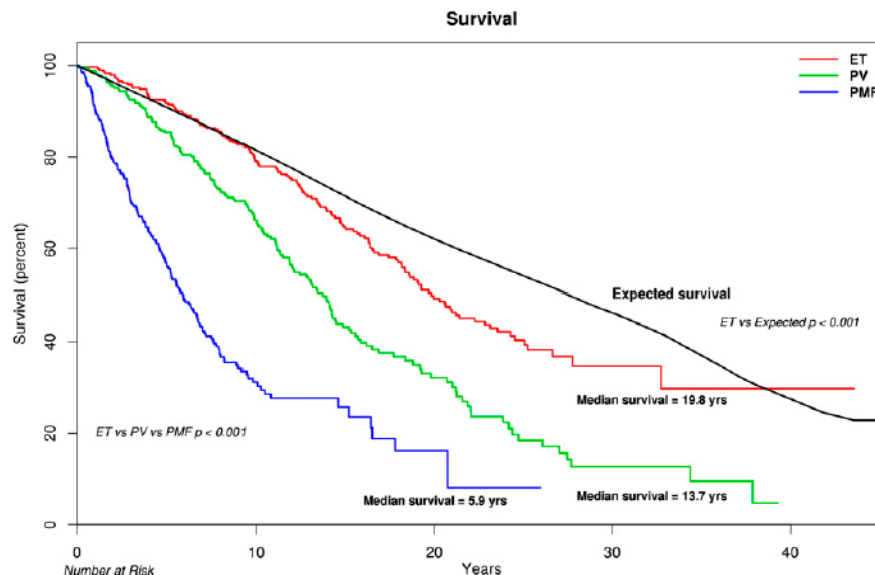


Figure 2 : Comparaison de courbes de survie chez des patients atteints de thrombocythémie essentielle (en rouge) de polyglobulie de Vaquez (en vert), et de myélofibrose primitive (en bleu). Tefferi 2014 (15)

b) Physiopathologie

Les NMP sont caractérisées par une prolifération clonale, sans blocage de maturation, de cellules souches hématopoïétiques présentant des mutations dont les 3 principales sont les mutations du gène de la Janus kinase 2 (JAK2), du gène de la calréticuline (CALR), et du gène de *myeloproliferative leukemia* (MPL) (10) (identifiées chez environ 97 % des patients atteints de NMP (Tableau 2)). Ces

mutations sont dites « mutations *driver* », c'est-à-dire qu'elles confèrent aux cellules dans lesquelles elles existent une capacité anormale de prolifération, et sont impliquées dans le développement cancéreux. Ce sont des mutations initiatrices pour les pathologies dans lesquelles elles sont impliquées.

1. Mutations jouant un rôle dans les NMP

Ces mutations peuvent être regroupées en deux classes :

- Mutations *driver* (ou initiatrices) intervenant directement dans la voie de signalisation des récepteurs aux facteurs de croissance hématopoïétiques en les activant (JAK2, MPL, CALR). Ce sont les plus fréquemment identifiées : elles représentent la quasi-totalité des PV (96 % JAK2 (V617F) et 3 % JAK2 (Exon12)), et une grande partie des TE (55 % JAK2 (V617F), 15 à 24 % CALR et 4 % MPL). Dans 16 à 25 % des cas de TE, la mutation principale n'est pas retrouvée, on parle de « triple négatif » (Tableau 2 ; Figure 3).
- Autres mutations associées aux NMP
 - Les mutations des gènes intervenant dans la régulation épigénétique ne sont pas spécifiques des NMP (LTK, TET2, DNMT3A, IDH1/2, EZH2, ASXL1,...). Les gènes de régulation épigénétique peuvent réguler l'activité de gènes sans en modifier la séquence d'ADN. Ces mutations coexistent souvent avec les mutations de signalisation.
 - La mutation du gène TP53 a été décrite dans des cas de NMP. Le gène TP53 est un gène suppresseur de tumeur se situant sur le

chromosome 17. Cette mutation prédispose aux transformations leucémiques (18).

Tableau 2 : Épidémiologie des principales mutations *driver*-retrouvées dans les NMP Ph1-

	PV	TE	MFP
JAK2(V617F)	96 %	55 %	65 %
JAK2(Exon12)	3 %	rares	rares
CALR(19p13.2)	rares	15 à 24 %	25 à 35 %
MPL(1p34)	rares	4 %	8 %

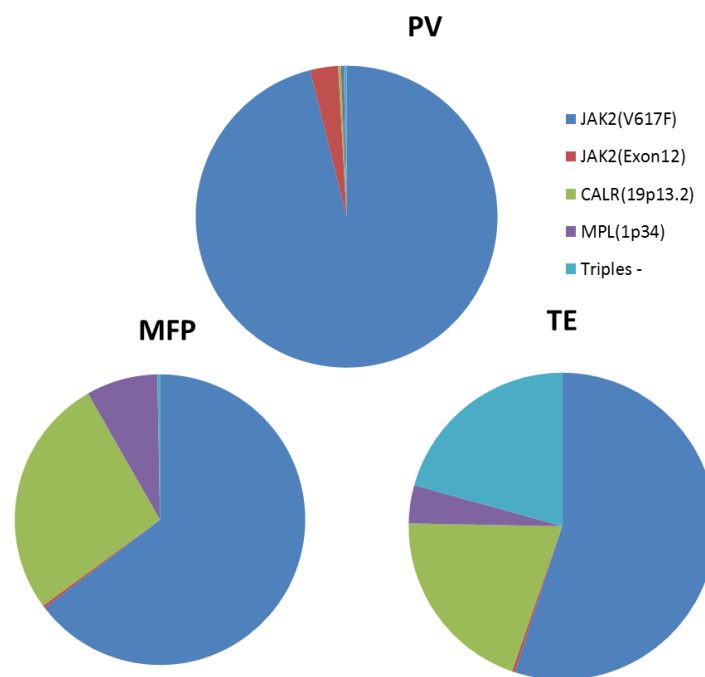


Figure 3 : Épidémiologie des principales mutations *driver* retrouvées dans les NMP Ph1-
Les principales mutations *driver* sont JAK2, CALR, MPL. En cas d'absence de toutes ces mutations, on parle de patients au statut « triple négatif »

Historiquement et en matière d'épidémiologie, la mutation du gène de JAK2 est la principale mutation responsable des NMP.

JAK2

Le gène JAK2 se situe sur le bras court du chromosome 9. La protéine JAK2 est une protéine cytoplasmique à activité tyrosine kinase. JAK2 est constituée d'un domaine kinase JH1 (JAK Homology domain 1) et d'un domaine catalytique inactif pseudo-kinase JH2 (JAK Homology domain 2), JH2 étant le régulateur négatif de l'activité kinase de JH1. La protéine JAK2 participe à la transduction de la voie de signalisation de facteurs de croissance hématopoïétiques : l'érythropoïétine (EPO), la thrombopoïétine (TPO) et le Granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) ; mais interagit aussi avec les récepteurs de la prolactine, de l'hormone de croissance (GH), de l'interféron γ , du GM-CSF (granulocyte-macrophage-colony stimulating factor), de l'interleukine 3 (IL-3) et de l'interleukine 5 (IL-5) (19).

Rappel de la situation physiologique

Ces étapes sont illustrées par la Figure 4.

1. La fixation des facteurs de croissance sur leur récepteur entraîne la dimérisation du récepteur et la phosphorylation de JAK2.

2. Ceci entraîne l'activation de la voie STAT (*signal transducer and activator of transduction*) par phosphorylation puis dimérisation du facteur de transcription STAT ; et dans le même temps l'activation des voies RAS/MAP kinases et PI3K/AKT qui jouent également un rôle dans la prolifération et la différenciation cellulaire (18).

3. STAT est alors transloqué vers le noyau où il active la transcription de gènes régulateurs de la myéloprolifération et de la myélodifférenciation.

4. La régulation négative du signal s'effectue par auto-inhibition de JAK2, conduisant à la terminaison du signal et l'internalisation du récepteur.

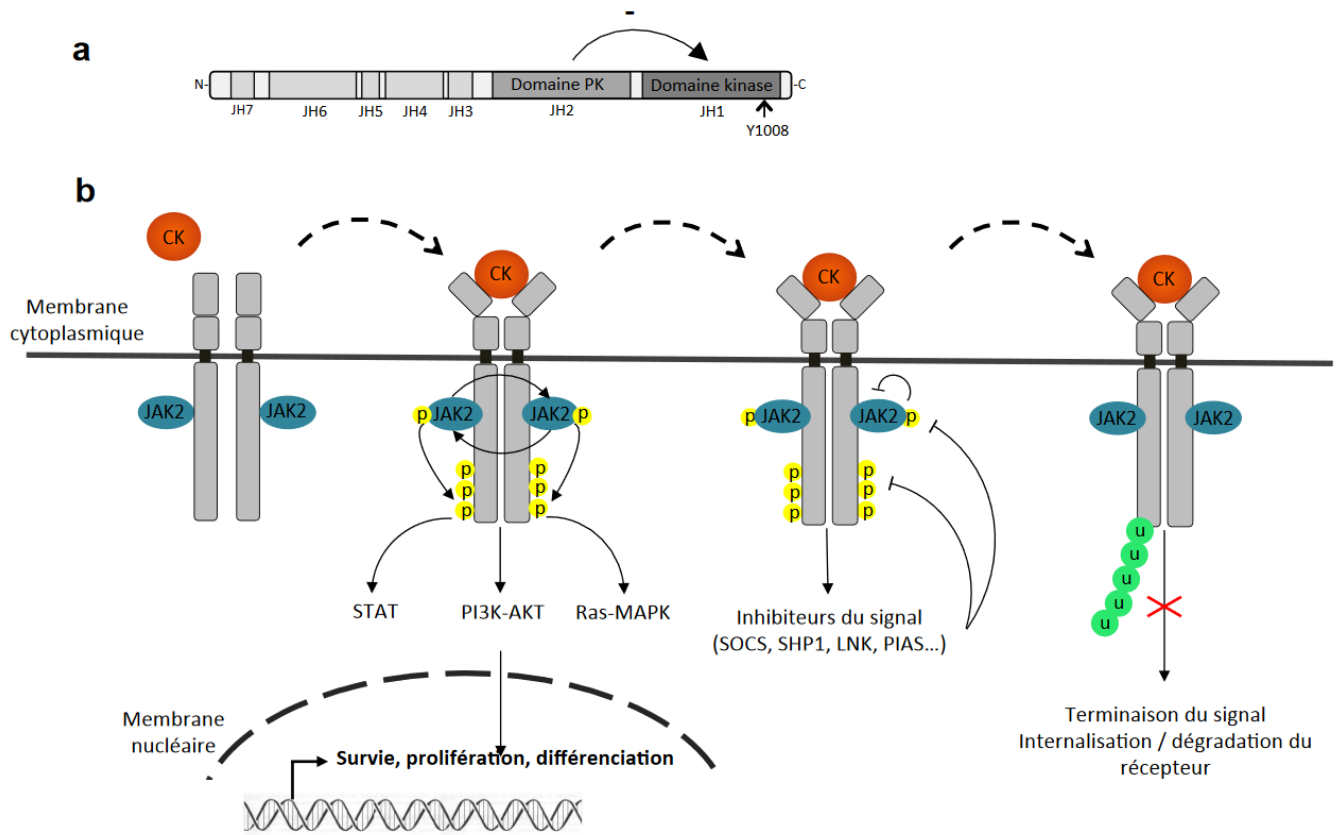


Figure 4 : Activation physiologique des récepteurs à cytokines et implication de JAK2.

(a) : Structure de JAK2. Le domaine pseudo-kinase (PK, JH2) inhibe le domaine kinase JH1. JH : *jak homology domain*.
 (b) : Mécanisme d'activation du récepteur par liaison de la cytokine. La liaison de la cytokine entraîne l'activation des molécules JAK2 par transphosphorylation, permettant le recrutement de molécules de signalisation. Les voies de signalisation en aval (STAT, PI3K, MAPK) sont alors activées, induisant la survie, la prolifération et la différenciation des cellules myéloïdes. La régulation négative du signal s'effectue par auto-inhibition de JAK2, conduisant à la terminaison du signal et l'internalisation du récepteur.

Pasquier, 2015 (20)

En situation de néoplasie myéloproliférative

La mutation V617F touche l'exon 14 du gène JAK2. Au niveau moléculaire elle entraîne la substitution d'une guanine par une thymidine en position 1849, et par conséquent elle conduit au niveau protéique à la substitution d'une valine par une phénylalanine au niveau du codon 617. Cette région appartient au domaine JH2,

domaine pseudo-kinase de la protéine JAK2, et dont l'activité est la régulation négative de JAK2.

La mutation V617F aboutit donc à une levée de l'inhibition de JAK2 par son domaine régulateur, ce qui a pour effet une activation constitutive de JAK2. La mutation entraîne alors la différenciation, la prolifération et la survie des lignées érythroblastique et/ou mégacaryocytaire malgré l'absence d'érythropoïétine (EPO) ou de thrombopoïétine (TPO) (21).

Mutations de l'exon 12

Les mutations de l'exon 12 de JAK2 touchent la protéine JAK2 entre ses domaines SH2 et JH2. Elles ont pour conséquence une modification structurale de la protéine perturbant l'activité fonctionnelle de la protéine (18).

MPL

Le gène MPL est localisé sur le chromosome 1 et code pour le récepteur à la thrombopoïétine (facteur de croissance de la lignée mégacaryocytaire). Le récepteur à la TPO est associé à la protéine JAK2 qui permet à la fois la transduction du signal, et à la fois la stabilité et l'expression de la protéine MPL (ou récepteur à la thrombopoïétine) à la surface cellulaire. Après liaison de la TPO à son récepteur, la voie JAK2 entraîne l'activation de plusieurs voies de signalisation (STAT, PI3K, MAPK) qui favorisent la survie, la prolifération ainsi que la différenciation des cellules de la lignée mégacaryocytaire, la maturation des mégacaryocytes et l'activation des plaquettes (22).

La plupart des mutations concernent un acide aminé (un tryptophane) en position 515 (W515) au niveau de la jonction entre les domaines transmembranaire et cytoplasmique. Cette région est définie comme étant un *hotspot*, lieu à haut risque de mutations. Les deux mutations les plus fréquentes sont W515L (substitution d'un tryptophane en leucine) et W515K (substitution d'un tryptophane en lysine). Ces différentes mutations entraînent l'activation de la voie de signalisation JAK2/STAT et confèrent au récepteur, et donc aux cellules, une indépendance de croissance vis-à-vis de la TPO (18).

CALR

En Physiologie

Le gène de la calréticuline est situé sur le bras court du chromosome 9 (19p13.2) et possède 9 exons.

La calréticuline est une protéine multifonctionnelle, principalement présente dans le réticulum endoplasmique où elle participe à la bonne formation des glycoprotéines et à l'homéostasie calcique. En effet le domaine C-terminal de CALR possède une région acide (donc électronégative) permettant à la protéine de lier le calcium. Le domaine C-terminal de CALR comporte également une séquence KDEL (lysine, acide aspartique, acide glutamique, leucine) qui participe à sa rétention dans le réticulum (10,23).

En situation de néoplasie myéloproliférative

De nombreux variants (Figure 5), dont deux majoritaires, ont été décrits dans les NMP. En effet, dans environ 85 % des cas, la mutation est soit une délétion de 52 paires de bases (dite type 1 : L367fs*46), soit une insertion de 5 paires de bases (dite type 2 : K385fs*47) (9,10).

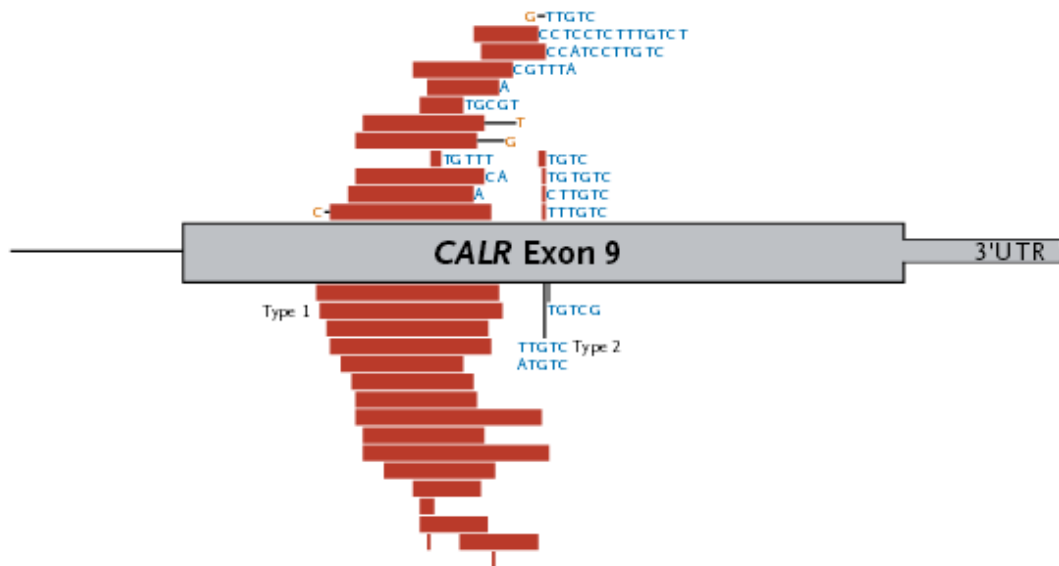


Figure 5 : Position génomique de 36 mutations identifiées du gène CALR (9).
 Les 2 mutations principales sont la mutation dite de type 1 : L367fs*46 (délétion de 52 paires de bases) et la mutation dite de type 2 : K385fs*47 (insertion de 5 paires de bases).

Les mutations touchant l'exon 9 de CALR ont pour conséquence un décalage du cadre de lecture entraînant une perte du motif KDEL dans la protéine finale. La perte de ce motif serait à l'origine d'une perte de la localisation dans le réticulum endoplasmique de la protéine. Les mutations de CALR sont aussi à l'origine d'une modification de la charge de la partie C-terminale par remplacement d'acides aminés acides par des acides aminés basiques, perturbant ainsi le rôle de CALR dans l'homéostasie calcique (18,24). D'après des modèles cellulaires, une mutation de CALR est associée à une prolifération cellulaire augmentée et à l'activation de la voie STAT, de la même manière que les mutations de JAK2 (9).

Chez les patients atteints de Thrombocythémie Essentielle, la présence de la mutation de CALR est maintenant considérée comme une entité distincte tant au niveau moléculaire que clinique. Elle est corrélée à un âge jeune, un sexe masculin, une valeur de plaquettes plus élevée, des valeurs de leucocytes et d'hémoglobine plus basses, et un risque thrombotique plus faible (13,25).

Remarque

Initialement décrites comme mutuellement exclusives, ces mutations (JAK2, MPL, CALR) pourraient en réalité coexister. Des cas ont été décrits où plusieurs mutations principales étaient retrouvées chez le même patient (26,27). Dans le cas où plusieurs mutations principales seraient identifiées dont CALR, les études évoquent le caractère initiateur (*driver*) de CALR puisque présente dans tous les clones mutés observés, tandis que l'autre mutation principale ne serait que *passenger* (ou de progression) (23).

Autres mutations

D'autres mutations sont décrites dans les NMP, certaines concernant les gènes des voies de signalisation cellulaire (C-KIT, JAK/STAT...), de l'épigénétique (TET2, IDH1 et 2, DNMT3A...), du gène suppresseur de tumeurs TP53, ou de l'épissage (18). Les principales sont regroupées dans le Tableau 3.

Tableau 3 : Tableau des principaux gènes mutés dans les NMP classiques (hors JAK2, MPL, CALR) (18).

Gènes	Chromosome	Protéine	Fonction	Rôle physiologique	Type de mutation	Fréquence dans les SMP (%)			Impact fonctionnel des mutations
						PV	TE	MFP	
<i>LNK</i> (SH2B3)	12	SH2B adapter protein 3	Signalisation	Régulation négative de l'activation de JAK2	Substitutions ou délétions hotspot sur l'exon 2	Rare	Rare	5-8	Perte Ink chez souris conduit à un SMP (splénomégalie et thrombocytose) et accélère développement SMP dû à JAK2 V617F
<i>CBL</i>	11	Casitas B-lineage Lymphoma (c-CBL)	Signalisation	Ubiquitine Ligase Participe à la régulation négative des tyrosines kinases	Substitution ou délétion hotspot sur les exons 8/9	Rare	2	6	Perte fonction ubiquitine ligase et activation prolongée tyrosines kinases après stimulation cytokinique Une mutation conduit à LAM chez la souris
<i>NRAS</i>	1	NRAS	Signalisation	GTPase voie MAPK	Substitutions hotspot codon 12	-	-	5	Augmentation signalisation MAPK, augmentation prolifération et auto-renouvellement des cellules souches
<i>NF1</i>	17	Neurofibromine	Signalisation	Régulation négative voie MAPK en hydrolysant GTP	Substitutions, délétions ou insertions	-	-	6	Souvent associée à délétion autre copie du gène Activation dérégulée de la voie MAPK et SMP chez la souris
<i>TP53</i>	17	p53	Cycle cellulaire	Intégrité génome lors cycle cellulaire	Substitutions ou délétion	-	-	2	Mutations perte de fonction Promotion transformation leucémique
<i>TET2</i>	4	TET2	Épigénétique	Hydroxylation des 5méthylcytosines	Substitutions ou délétions	10	8	10-18	Hyperméthylation Perte expression chez souris conduit à une LMMC
<i>IDH1/2</i>	2/15	Isocitrate déshydrogénase 1 et 2	Épigénétique	Catalysent la décarboxylation de l'isocitrate en α -KG, cofacteur de TET2	Substitutions hotspot sur exon 4	1,9	0,8	4	Néo-enzyme transforme isocitrate en 2-HG qui inhibe TET et KDM. Hyperméthylation ADN et histones
<i>DNMT3A</i>	2	ADN méthyltransférase 3A	Épigénétique	Méthylation <i>de novo</i> des cytosines	Substitutions ou délétions, tout le gène et hotspot R882	7	-	15	Hypométhylation globale. Mutation R882 a un effet dominant négatif avec modification expression génique et conduit à une LMMC chez souris
<i>EZH2</i>	7	Enhancer of Zeste Homolog 2	Épigénétique	Partie catalytique du complexe polycomb PRC2	Substitutions ou délétions	3	Rare	13	Perte de fonction avec diminution de la triméthylation de l'histone H3K27 et modification de l'expression de certains gènes
<i>SUZ12</i>	17	Suppressor of Zeste 12	Épigénétique	Partie du complexe polycomb PRC2	Substitutions ou délétions	3	-	-	Diminution de la triméthylation de l'histone H3K27
<i>ASXL1</i>	20	Additionnal Sex Comb Like 1	Épigénétique	Interaction avec complexes polycomb PRC1 et PRC2	Substitutions, insertions ou délétions	7	4	26	Mutations aboutissent à protéine tronquée Diminution de la triméthylation de H3K27 et modification expression certains gènes Délétion chez souris conduit à un phénotype de MDS
<i>SRSF2</i>	17	Serine/arginine-rich factor 2	Epissage	Facteur d'épissage des ARN pré-messagers	Substitutions hotspot P95	2	2	17	Mutations P95 modifient épissage et expression certains gènes (dont <i>EZH2</i>) P95H conduit à un MDS chez souris.
<i>SF3B1</i>	2	Splicing factor 3B subunit 1	Epissage	Facteur d'épissage des ARN pré-messagers	Substitutions hotspot sur exons 4 et 5	-	5	6,5	Mutations induisent perturbations de l'épissage de certains ARN
<i>IKZF1</i>	7	Ikaros	Transcription	Facteur de transcription (plusieurs isoformes)	Délétions	-	-	Rare	Rôle sur la mégacaryopoïèse (délétion chez souris conduit à prolifération)
<i>SETBP1</i>	18	SET-binding protein 1	Peu connu	Interagit avec protéine SET	Substitutions hotspot sur exon 6	-	-	2,5	Inhibition protéine phosphatase 2A (PP2A) via SET et augmentation expression gènes <i>HOXA</i>

2. Modèle tumoral

La physiopathologie des NMP n'est toujours pas parfaitement expliquée. Plusieurs modèles tumoraux sont proposés dont un des principaux est celui des mutations additionnelles (gènes de l'épigénétique, de l'épissage ou TP53) associées aux mutations diagnostiques (28).

Seules les mutations *driver* permettent de générer le phénotype de NMP. Les mutations additionnelles pourraient quant à elles prédisposer à la survenue d'une NMP si elles surviennent avant la mutation *driver*. En revanche si les mutations additionnelles surviennent après la mutation *driver*, elles modifieraient l'histoire de la maladie en favorisant la transformation leucémique ou fibrotique des NMP (Figure 6).

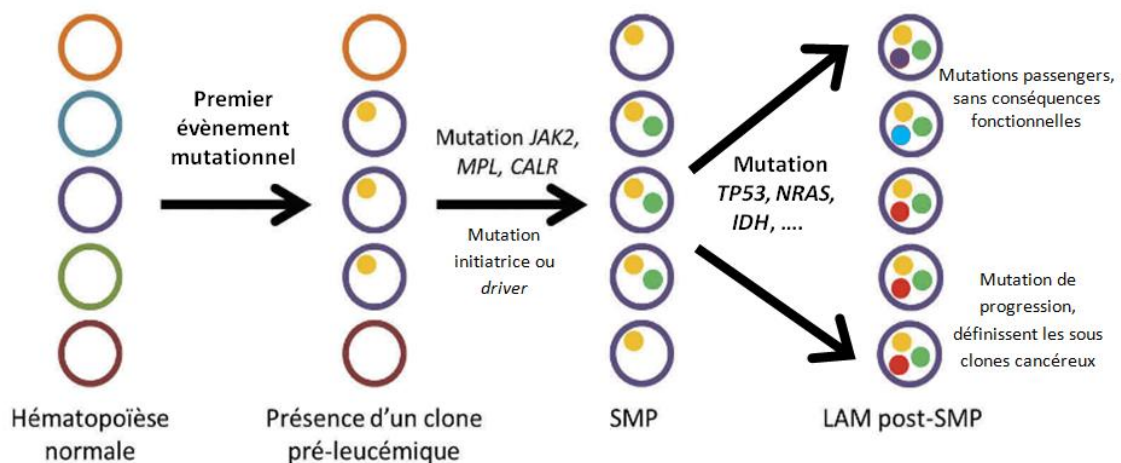


Figure 6 : Représentation schématique d'un modèle de développement tumoral des NMP adaptée de Luque Paz (18)

Le principal modèle tumoral décrit dans la physiopathologie des NMP consiste en 3 grands événements :

- l'existence d'un premier événement mutationnel somatique, le plus souvent d'un gène de l'épigénétique, entraîne une hématopoïèse

clonale. Cette mutation à elle seule n'est pas forcément pathologique puisque parfois retrouvée chez des sujets sains,

- l'arrivée d'un deuxième évènement mutationnel conduit à la transformation en NMP (JAK2, MPL, CALR). On parle ici de mutation initiatrice ou *driver*,
- d'autres évènements mutationnels, dits de progression, aboutissent à l'évolution de la pathologie avec risque de transformation en myélofibrose secondaire ou en leucémie. Des mutations *passenger*, sans conséquence fonctionnelle, peuvent coexister et séparer différents clones.

Certains cas ont également été rapportés où une mutation *driver* était identifiée chez des patients, sans développement associé de NMP. En 2015 une étude portant sur la présence et la charge allélique de la mutation JAK2^{V617F} décrivait 0,5 % de sa population d'étude (JAK2^{V617F} positive) comme étant saine de toute pathologie hématologique, et 2,5 % de cette même population ne présentait pas de NMP. Ces données confortent le modèle physiopathologique selon lequel plusieurs évènements mutationnels aboutissent à une NMP et pas seulement la mutation *driver* (29).

À l'inverse d'autres modèles excluent le rôle des mutations somatiques précoces et s'appuient uniquement sur la mutation principale (JAK2, CALR, MPL), en argumentant que les mutations somatiques ne sont pas toujours retrouvées chez les patients, et en montrant que les NMP pouvaient être la conséquence d'une seule cellule souche hématopoïétique mutée JAK2^{V617F} (30).

IV. Tableau clinico-biologique

a) Polyglobulie de Vaquez

La maladie de Vaquez entraîne une polyglobulie vraie (définie par une augmentation du volume globulaire $>125\%$) dont le risque majeur à court terme est la thrombose tandis que le risque à long terme est la transformation en leucémie aiguë ou en myélofibrose. Elle reste cependant compatible avec une survie prolongée.

1. Circonstances diagnostiques

- Le contexte peut être asymptomatique avec diagnostic fortuit, le plus souvent, par anomalies de l'hémogramme.
- Le diagnostic peut être évoqué devant l'existence de signes cliniques : signes généraux (asthénie, sueurs nocturnes...), signes d'hyperviscosité (céphalées, vertiges, troubles visuels, acouphènes), signes microvasculaires (migraines, paresthésies, érythromélgies), érythrose cutanéomuqueuse d'apparition progressive touchant principalement le visage et les mains, prurit à l'eau (aquagénique), splénomégalie.
- Dans certains cas le diagnostic de PV est évoqué devant la présence de complications (31) : événements thrombotiques artériels (accident vasculaire cérébral, infarctus du myocarde...) plus fréquents que veineux (de localisation atypique, thrombophlébite cérébrale, thrombose de vaisseaux digestifs...), signes de transformation (évolution en myélofibrose secondaire, leucémie aiguë).

2. Biologie et anatomopathologie

La principale anomalie biologique est la polyglobulie : une augmentation de l'hémoglobine (>18,5 g/dL chez l'homme, >16,5 g/dL chez la femme) et/ou de l'hématocrite (un hématocrite >54 % chez l'homme ou >47 % chez la femme) doivent faire évoquer le diagnostic de PV. Elle peut être associée à une hyperleucocytose modérée à type de polynucléose neutrophile et à une thrombocytose dans deux cas sur trois.

La biologie permet également l'identification des mutations initiatrices : 96 % des PV sont mutées JAK2(V617F) et 3 % JAK2(Exon12).

Le frottis médullaire ne montre la plupart du temps pas d'anomalie. La biopsie ostéo-médullaire (BOM) retrouve une hyperplasie globale avec excès de mégacaryocytes.

Tableau 4 : Critères diagnostiques des NMP Ph1- selon la classification OMS 2016

	Polyglobulie de Vaquez	Thrombocytémie Essentielle
Critères majeurs	1) Hématocrite >49 % chez l'homme, >48 % chez la femme ou hémoglobine >16,5 g/dL chez l'homme, >16g /dL chez la femme 2) BOM montrant une prolifération excessive panmyéloïde, incluant une prolifération de mégacaryocytes polymorphes et matures 3) Mutation JAK2 ^{V617F} ou mutation JAK2 Exon12	1) Numération plaquettaire >450 G/L 2) BOM montrant une prolifération mégacaryocytaire avec nombre augmenté de grands mégacaryocytes matures au noyau hyperlobé 3) Pas de critère OMS évoquant une LMC BCR-ABL1+, une PV, une MFP, un syndrome myélodysplasique ou une autre néoplasie myéloïde 4) Présence d'une mutation JAK2, CALR ou MPL
Critères mineurs	EPO sérique normale ou subnormale	Présence d'un autre marqueur clonal ou absence de signe en faveur d'une thrombocytose réactionnelle
Diagnostic	3 critères majeurs ou les deux premiers critères majeurs + 1 mineur	4 critères majeurs ou les trois premiers critères majeurs + 1 mineur
BOM : biopsie ostéo-médullaire, LMC : Leucémie Myéloïde Chronique, PV : Polyglobulie de Vaquez, MFP : Myélofibrose Primitive		

3. Démarche diagnostique

En cas de suspicion diagnostique devant des perturbations biologiques, la démarche consiste d'abord en l'élimination d'une polyglobulie secondaire et l'affirmation de la polyglobulie vraie, puis en la recherche d'éléments en faveur d'une NMP de type maladie de Vaquez. Cette démarche repose avant tout sur la recherche des principales mutations responsables de PV et sur les autres critères OMS 2016 (Tableau 4).

Une fois la polyglobulie vraie établie, le diagnostic de maladie de Vaquez nécessite l'association des 3 critères majeurs ou des 2 premiers critères majeurs + 1 mineur (Tableau 4).

Les critères OMS de 2016 pour le diagnostic de PV intègrent le résultat de la biopsie ostéo-médullaire en critère majeur plutôt que mineur (critères 2008) afin d'aider le diagnostic lors de bilan mutationnel négatif et de dépister précocement la fibrose. Ces nouveaux critères intègrent également l'hématocrite en critère majeur et plus seulement l'hémoglobine (Tableau 4).

b) Thrombocytémie Essentielle

La Thrombocytémie Essentielle touche la lignée mégacaryocytaire et se traduit par une thrombocytose chronique à l'hémogramme >450 G/L. Dans le cas d'un bilan mutationnel négatif, la TE est, d'une certaine manière, un diagnostic d'exclusion. En effet, pour affirmer le diagnostic de TE, il ne faut aucun critère laissant évoquer une autre NMP, une autre pathologie hématologique ou un caractère secondaire de la thrombocytose. Sa gravité est principalement due à ses complications que sont les hémorragies et les thromboses.

1. Circonstances diagnostiques

- Le contexte est le plus souvent asymptomatique et le diagnostic fortuit par anomalies de l'hémogramme.
- Certains patients présentent des anomalies cliniques au diagnostic : présence d'une splénomégalie (1/3 des cas), rarement existence d'un prurit aquagénique (ce prurit est décrit dans certaines formes de TE à plus haut risque de complications thrombotiques et d'évolution (32)).
- Le diagnostic peut être évoqué devant des signes de complications : hémorragiques (notamment avec des chiffres très élevés de plaquettes), thromboses artérielles plus fréquentes que veineuses.

2. Biologie et anatomopathologie

La thrombocytose >450 G/L est la principale anomalie biologique.

La biologie moléculaire permet l'identification des mutations initiatrices : 55 % des TE sont mutées JAK2^{V617F}, 15 à 24 % mutées CALR et 4 % mutées MPL. Dans 16 à 25 % des cas de TE, la mutation principale n'est pas retrouvée, on parle de « triple négatif ».

Le frottis médullaire et la biopsie ostéo-médullaire montrent une richesse médullaire normale ou augmentée, ainsi qu'une hyperplasie mégacaryocytaire associée à la présence de mégacaryocytes géants et hypersegmentés.

3. Démarche diagnostique

Elle consiste tout d'abord en l'élimination d'une thrombocytose secondaire (syndrome inflammatoire, asplénisme, carence martiale, certains syndromes

myélodysplasiques, autres NMP...) et consiste ensuite en l'affirmation de la Thrombocythémie Essentielle grâce aux critères OMS 2016 (Tableau 4).

Selon la classification OMS 2016, le diagnostic de TE nécessite la présence des 4 critères majeurs ou des 3 premiers critères majeurs + 1 critère mineur (Tableau 4).

En pratique, pour confirmer le diagnostic de PV ou de TE, la recherche de mutation $JAK2^{V617F}$ va être réalisée dans un premier temps, et c'est en cas de négativité de cette mutation que l'exploration de l'EPO et la recherche de mutation de $JAK2$ (Exon12) pour la PV et des mutations CALR et MPL pour la TE vont être réalisées. La BOM étant partie intégrante du diagnostic d'après les nouveaux critères 2016, celle-ci sera systématiquement réalisée en fin de démarche diagnostique, étant donné son caractère invasif. Cette démarche est résumée dans la Figure 7.

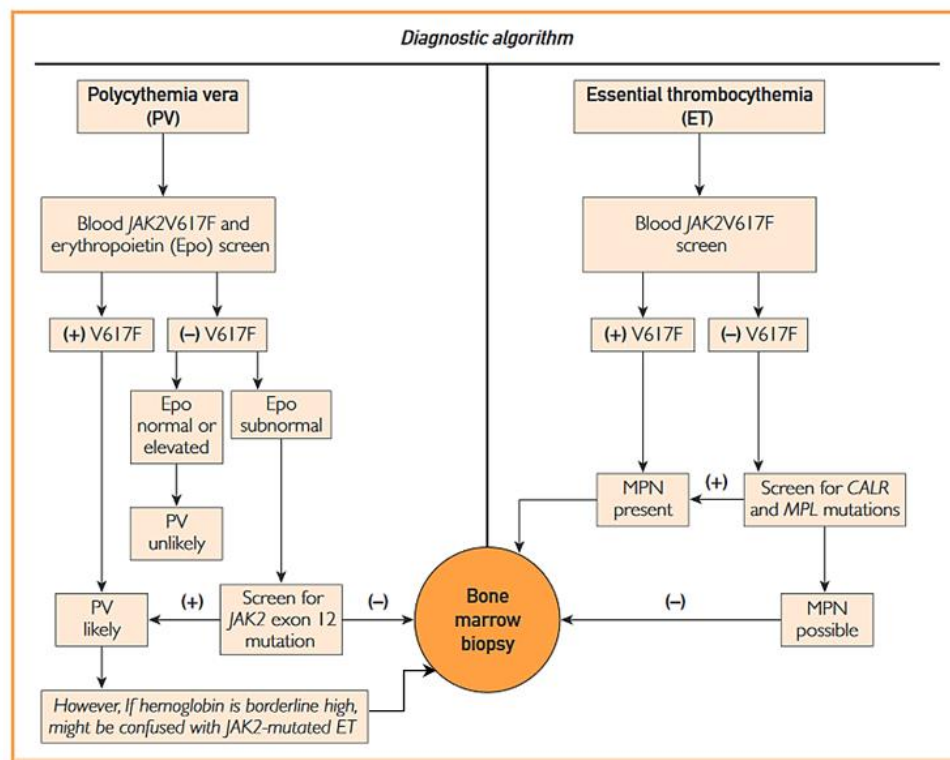


Figure 7 : Algorithme diagnostique pour la Polyglobulie de Vaquez et la Thrombocythémie Essentielle (33).

4. Complications des NMP

Complications vasculaires

Thromboses

Les thromboses sont les principales complications des NMP avec une prévalence de 45 %, en sont souvent le mode de découverte, et sont, chez les patients atteints de PV, la première cause de décès. Les thromboses sont une complication à court terme comme à long terme des NMP. Les thromboses artérielles sont plus fréquentes que les thromboses veineuses dans la PV (environ 60 % artérielles, 40 % veineuses) comme dans la TE (environ 90 % artérielles, 10 % veineuses). Elles peuvent être fatales (accident vasculaire cérébral (AVC), infarctus myocardique...) et c'est pourquoi leur prévention est l'objectif majeur du traitement (31,34). Certains scores d'aide à la stratification ont d'ailleurs été développés, tels que le score IPSET (*International Prognostic Score of Thrombosis for ET*) pour la TE (35).

Pour les patients atteints de PV, l'âge, l'hypertension artérielle (HTA) et l'existence d'un antécédent thrombotique sont des facteurs de risque avérés de thromboses. Chez les patients atteints de TE, la présence de facteurs de risque cardiovasculaires, la mutation JAK2^{V617F}, le sexe masculin sont également considérés comme des facteurs de risque de thrombose (35).

Hémorragies

Les hémorragies sont également les principales complications des TE, notamment lorsque la thrombocytose est majeure (>1500 G/L), et conditionnent la prise en charge des patients atteints de TE. Ce risque hémorragique est expliqué

actuellement par plusieurs théories. Il peut être, par exemple, lié à la thrombopathie associée à la thrombocytose ou à l'apparition d'un syndrome de von Willebrand acquis (36).

Transformation des NMP

À long terme, les NMP ont pour complication majeure la transformation en myélofibrose secondaire ou en leucémie aiguë, qui est alors associée à un pronostic très péjoratif. Les facteurs de risque de transformation sont l'âge, la leucocytose au diagnostic, les anomalies au caryotype, des antécédents de traitement par agent alkylant (37). Dans les LAM secondaires aux NMP, hormis les mutations *driver*, les mutations les plus souvent retrouvées sont les mutations de ASXL1, SRSF2, IDH1/2, LNK, NRAS et TP53 (la plus péjorative et la plus associée à la transformation) (18). Le risque de transformation leucémique ou fibrotique à 20 ans est estimé à 10-20 % pour les patients atteints de PV, et 5-10 % pour la TE (33).

V. Thérapeutique

À l'heure actuelle, les thérapies cytoréductrices ne permettent pas la guérison des NMP. L'objectif des thérapies dans la PV et la TE est de diminuer leur morbi-mortalité par la prévention des complications thrombotiques et hémorragiques, mais sans augmenter le risque de saignement ou de transformation maligne. Un autre objectif majeur du traitement est la qualité de vie des patients par le contrôle des symptômes microvasculaires et des signes liés à l'hyperviscosité. La stratification des patients en groupes à différents niveaux de risque permet une stratégie thérapeutique adaptée et conditionnée par le risque thrombotique ou hémorragique des patients.

Le contrôle des facteurs de risque cardiovasculaire doit également être pris en charge pour la prévention des thromboses.

a) Stratification du risque

Le risque de complication des patients atteints de NMP est évalué par la recherche de facteurs de risque liés d'une part à la pathologie et d'autre part au patient. Les facteurs prédictifs de thrombose artérielle actuellement reconnus sont : l'âge supérieur à 60 ans, les antécédents de thromboses, les facteurs de risque cardiovasculaires, l'hyperleucocytose supérieure à 11 G/L et la présence de la mutation JAK2 (36). Le sexe masculin serait quant à lui associé à la survenue de thromboses veineuses. L'existence d'une thrombocytose majeure (>1000 G/L) a été mise en évidence comme étant un facteur de risque hémorragique plutôt que thrombotique dans la TE (38).

b) Stratégie thérapeutique

Le traitement de la PV repose en urgence sur les saignées si l'hématocrite est supérieur à 55 % chez la femme, 60 % chez l'homme, ou si l'hémoglobine est >20 g/dL et s'il existe des signes de gravité tels qu'un syndrome d'hyperviscosité ou des signes de thrombose. Les saignées sont un excellent traitement de l'urgence puisqu'elles permettent une diminution rapide de l'hématocrite. Les saignées peuvent également être utilisées comme traitement de fond, elles ne sont pas leucémogènes mais augmentent le risque de thrombose et de myélofibrose secondaire. Elles ne sont donc pas recommandées en première intention.

Pour les PV de bas risque thrombotique, l'aspirine seule suffit. Tandis que pour les PV de haut risque, un traitement cytoréducteur est mis en place. Le schéma est globalement le même pour les TE. Chez les patients atteints de TE, les patients

avec un faible risque thrombotique peuvent être traités par aspirine à faible dose uniquement, voire une simple surveillance en cas de l'absence de mutation de JAK2. Les patients atteints de TE à plus haut risque reçoivent en plus de l'aspirine un traitement cytoréducteur (Figure 8).

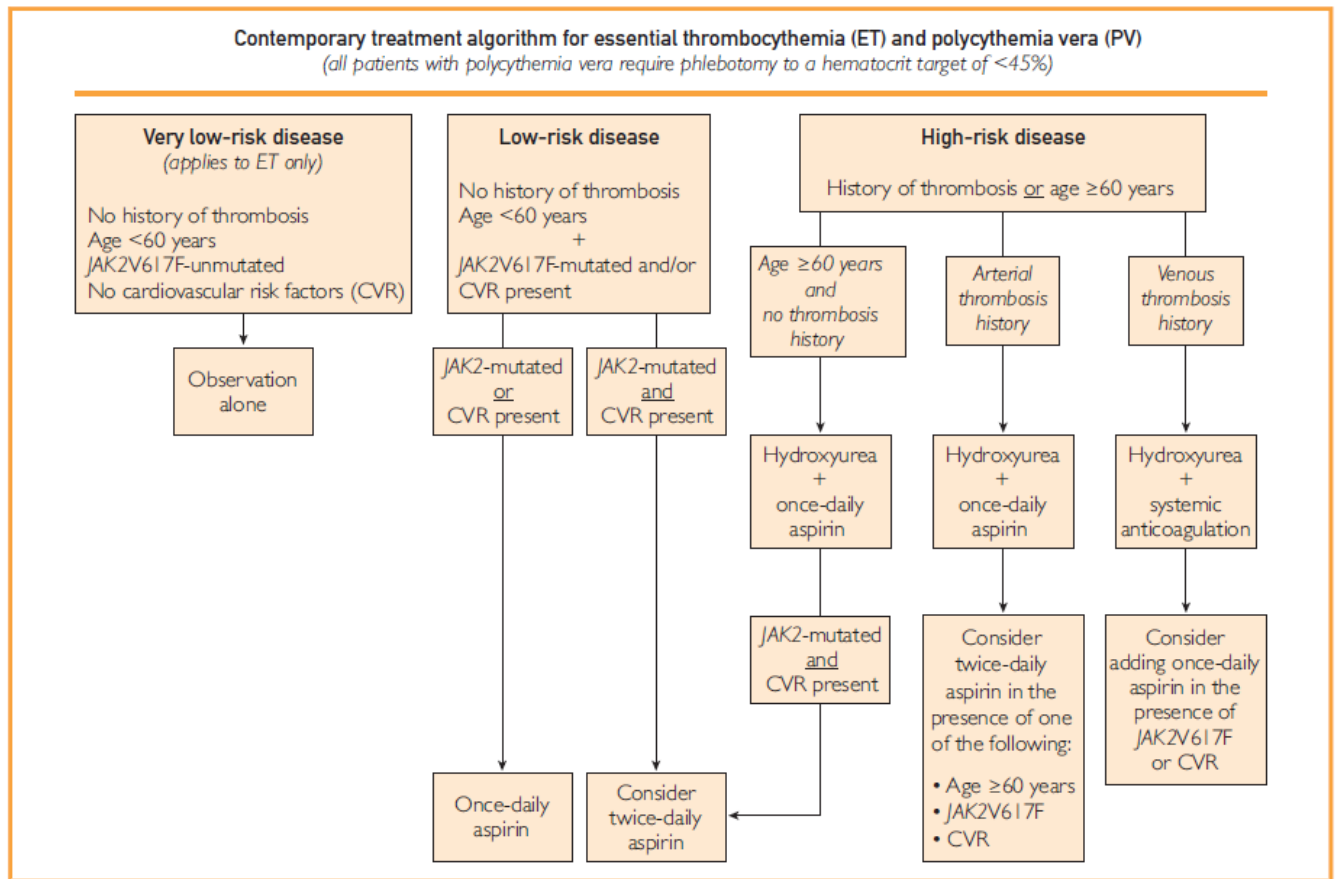


Figure 8 : Algorithme thérapeutique pour la Thrombocythémie Essentielle et la Polyglobulie de Vaquez (33).

c) Traitements cytoréducteurs

Les traitements cytoréducteurs sont toujours associés à un traitement antiagrégant plaquettaire, l'aspirine dans la plupart des cas.

L'Hydrea® (hydroxyurée) est le traitement cytoréducteur de première ligne par son efficacité et son absence de risque de transformation leucémique. En cas d'échec du traitement ou de non tolérance, on utilise en seconde ligne l'anagrélide

(Xagrid®) chez les sujets atteints de TE, le pipobroman (Vercyte®) chez les patients atteints de PV et l'interféron alpha pegylé chez les patients jeunes. En cas de grossesse, les antiagrégants plaquettaires associés à l'interféron alpha pegylé doivent être envisagés.

1. Hydroxyurée

L'hydroxyurée ou Hydrea® agit par inhibition de la synthèse de l'ADN sans altérer la synthèse de l'ARN ni celle des protéines. Son action est rapide et s'exerce essentiellement sur la moelle osseuse. Ce traitement inhibe d'abord la granulopoïèse, puis la thrombopoïèse et, en dernier lieu, l'érythropoïèse. Ces effets sont rapidement réversibles après l'interruption du traitement.

Cette molécule possède de nombreux effets secondaires (pancytopénies, troubles digestifs, stomatites...) qui imposent parfois un changement de traitement. Elle est de plus contre-indiquée pendant la grossesse et environ 10 % des patients y sont résistants (39).

2. Interféron alpha pegylé

L'interféron permet une diminution significative de la synthèse de l'ADN, de l'ARN et des protéines. Il est décrit que l'interféron exerce ainsi une activité anti-proliférative à l'égard des cellules tumorales. Le traitement par interféron alpha 2a pegylé a montré son efficacité dans la PV et la MFP, principalement sur les clones tumoraux portant la mutation JAK2^{V617F} ou CALR (40).

C'est une ancienne molécule pour laquelle on observe un regain d'intérêt actuellement, principalement en raison de son indication chez la femme enceinte, et également en raison de son caractère non leucémogène.

3. Anagrélide

L'anagrélide ou Xagrid® est un inhibiteur de l'adénosine monophosphate (AMP) cyclique phosphodiesterase III. L'anagrélide agit de façon sélective sur les plaquettes. Le mécanisme d'action spécifique par lequel l'anagrélide réduit le nombre de plaquettes se fait par retardement de la maturation des mégacaryocytes et par réduction de leur taille et de leur ploïdie.

L'anagrélide pourrait être responsable d'une augmentation du risque de transformation en myélofibrose secondaire ainsi que de thromboses artérielles et d'accidents hémorragiques.

4. Pipobroman

Le pipobroman ou Vercyte® est un agent alkylant, dérivé de l'acide méthane sulfonique. Le pipobroman a pour effet principal l'altération de la granulopoïèse, et impacte particulièrement la lignée myéloïde. Ce traitement possède un effet leucémogène, augmentant avec la durée du traitement.

5. Anti JAK2

Le ruxolitinib ou Jakavi® est un anti-néoplasique de la classe des inhibiteurs de protéines-tyrosine kinases. Il inhibe la signalisation JAK/STAT et la prolifération cellulaire. Il est indiqué dans le traitement de la splénomégalie et des symptômes liés à la myélofibrose primitive et à la myélofibrose secondaire à la maladie de Vaquez ou à la Thrombocythémie Essentielle. Des études récentes ont également montré l'intérêt de cette molécule dans le traitement des PV non compliquées de fibrose : traitement de la splénomégalie, des symptômes, et contrôle de l'hématocrite (41).

GENERALITES : LES MICROPARTICULES

I. Historique et découverte des microparticules

Les microparticules (MPs) sont des structures vésiculaires mesurant 0,1 à 1 μm et sont issues du bourgeonnement membranaire de toutes les cellules sanguines et endothéliales après activation ou apoptose. Les MPs ont des origines multiples (cellules hématopoïétiques telles que plaquettes, érythrocytes, monocytes et cellules non hématopoïétiques) et des fonctions variées (rôles dans la coagulation, l'inflammation, la communication intercellulaire,...). Leur identification initiale s'est faite à la fois par leur observation directe en microscopie électronique et par l'identification de leurs propriétés fonctionnelles lors de travaux sur la coagulation.

Dès 1946, Erwin Chargaff et Randolph West observent la conservation des propriétés coagulantes d'un plasma dénué de plaquettes, idée allant à l'encontre des idées de l'époque. Peu après, les auteurs parviennent à montrer qu'une centrifugation à haute vitesse (31 000 g) de ce même plasma dénué de plaquettes permet une diminution majeure de ses capacités de coagulation, et supposent, de ce fait, l'existence d'un facteur précipitable à haute vitesse, ayant un rôle dans la génération de thrombine (42).

Quelques années plus tard, en 1955, les travaux d'O'Brien confirment les données précédentes en étudiant les propriétés coagulantes du plasma (43).

En 1967, Peter Wolf affirme l'existence de minuscule matériel dérivé des plaquettes et distinguable d'elles par centrifugation à haute vitesse, qu'il nomme

alors « *platelet dust* », plus tard appelé microparticules. Il les décrit comme riches en phospholipides et en facteur plaquettaire 3, et montre leurs propriétés coagulantes (44).

En 1969, Cooper et Jandl décrivent la perte de phospholipides et de cholestérol membranaires sur une population d'érythrocytes, proportionnelle à la diminution de la surface érythrocytaire, et ceci sans perte de fonction objectivée (45).

En 1971, Crawford remarque que les microparticules identifiées par Peter Wolf prennent leur origine soit depuis la surface externe de la membrane plaquettaire soit depuis sa surface intracellulaire. L'auteur décrit les microparticules comme étant des « sacs d'apparence granuleuse et hétérogène et à paroi fine en microscopie électronique » (Figure 9). L'hypothèse de bourgeonnement est alors émise quant à leur origine (46).

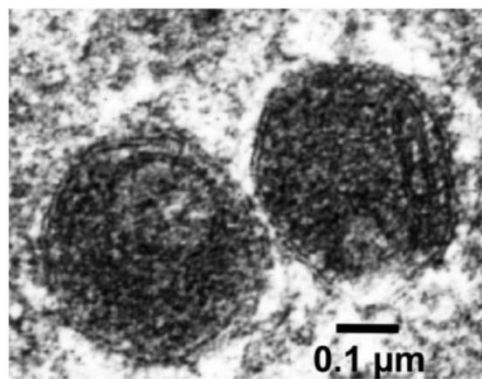


Figure 9 : Microscopie électronique de microparticules circulantes chez un patient atteint d'un syndrome coronaire aigu. 2006 (47)

En 1975, Ruby et Robert MacDonald suggèrent que les érythrocytes produiraient des vésicules exposant des sialoglycoprotéines spécifiques de la membrane des globules rouges. Les auteurs suggèrent que les microparticules dérivent des cellules sanguines normales, tant au niveau plaquettaire qu'érythrocytaire (48).

En 1990, l'équipe de Hamilton émet l'hypothèse de l'existence de microparticules provenant de cellules non hématopoïétiques. En effet, celle-ci observe dans le surnageant de cultures de cellules endothéliales mises en présence de complément, de petits éléments membranaires aux propriétés procoagulantes, qu'elle décrit comme étant des vésicules portant les mêmes antigènes que les cellules dont elles dérivent (49).

Les travaux de Combes en 1999 (Figure 10) étudient plus en détail leur morphologie, ainsi que leurs caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles (50).

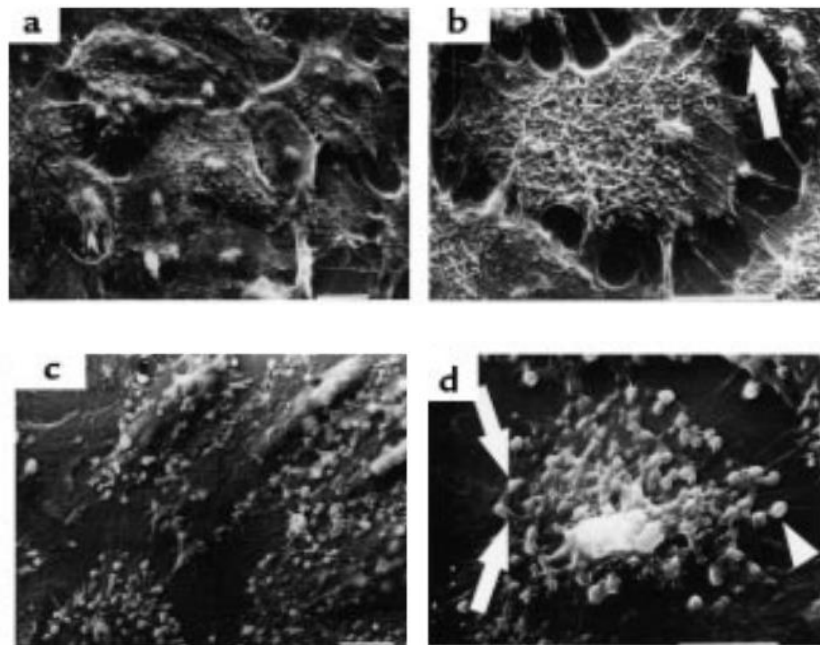


Figure 10 : Microscopie électronique de MPs issues de cellules endothéliales
Monocouches de cellules endothéliales cultivées (a et b) et stimulées par tumor necrosis factor (c et d) à différents grossissements (a et c x 1500 ; b et d x 3000) ; des bourgeonnements et vésicules détachées sont pointés par des flèches. (Combes 1999) (50)

Pendant les années 2000, de nombreux travaux de recherche ont été menés à propos des microparticules. Leur implication dans les phénomènes thrombotiques de certaines pathologies (telles que les cancers) a été décrite, tout comme leur augmentation dans certaines pathologies systémiques (telles que le diabète et l'hypertension artérielle) (51,52).

En 2006, Flaumenhaft, ouvrant la voie pour de nouvelles pistes de recherche, décrit les origines et formation des microparticules plaquettaires et met en évidence leur origine principalement mégacaryocytaire, et non pas plaquettaire (53).

II. Définition des microparticules

Les microparticules (MPs) ont d'abord été considérées lors de leur découverte comme des déchets cellulaires inertes dépourvus de toute fonction biologique. Au fur et à mesure des travaux de recherche, il est devenu évident qu'elles étaient en réalité des particules douées de fonctions biologiques. Devant l'étendue des travaux, il est devenu nécessaire de proposer une définition et une nomenclature standardisée de ces MPs.

a) Définition

Une première définition a été proposée par le sous-comité de standardisation en biologie vasculaire de la Société Internationale de Thrombose et d'Hémostase (ISTH) lors de sa conférence de 2005. Cette définition fut établie afin de distinguer les MPs des autres vésicules extracellulaires, telles que les exosomes, ectosomes et corps apoptotiques, différentes par leurs tailles, structures et modes de formation.

Les MPs sont actuellement définies comme des structures vésiculaires hétérogènes mesurant 0,1 à 1 μm . Les MPs issues d'érythrocytes sont généralement décrites comme de taille inférieure aux autres MPs, soit environ 0,15 μm (54). Les MPs circulantes sont issues après activation ou apoptose de toutes les cellules sanguines et endothéliales par bourgeonnement membranaire. Elles sont dépourvues de noyau et de capacité de synthèse. Les MPs contiennent une quantité

variable de phosphatidylsérine (PS) sur leur surface membranaire. Elles possèdent également des fonctions et phénotypes propres aux cellules dont elles dérivent (55–57).

Au niveau sanguin, les MPs plaquettaires (PMP) sont les plus abondantes et représentent environ 70 % à 90 % des MPs mesurées (58). Elles dérivent pour une petite fraction des plaquettes activées, et pour la majorité d'entre elles des mégacaryocytes (53). Ces PMPs sont distinguables via l'expression de CD62P : les PMPs dérivées de plaquettes activées sont CD62P positives tandis que les PMPs dérivant des mégacaryocytes sont CD62P négatives (59,60).

b) Nomenclature

Depuis toujours les termes pour définir ces vésicules sont multiples (Figure 11). Actuellement il persiste un débat quant à leur dénomination. Dans ce travail, nous respecterons la dénomination proposée par l'*International Society on Thrombosis and Haemostasis* (ISTH), puisque c'est l'usage du laboratoire. Nous les appellerons donc microparticules.

Les MPs font partie du groupe des vésicules extracellulaires, de la même manière que les exosomes ou les corps apoptotiques dont elles sont distinctes (Tableau 5) (61,62). Récemment, l'*International Society on Extracellular Vesicles* a proposé de les dénommer microvésicules (63).

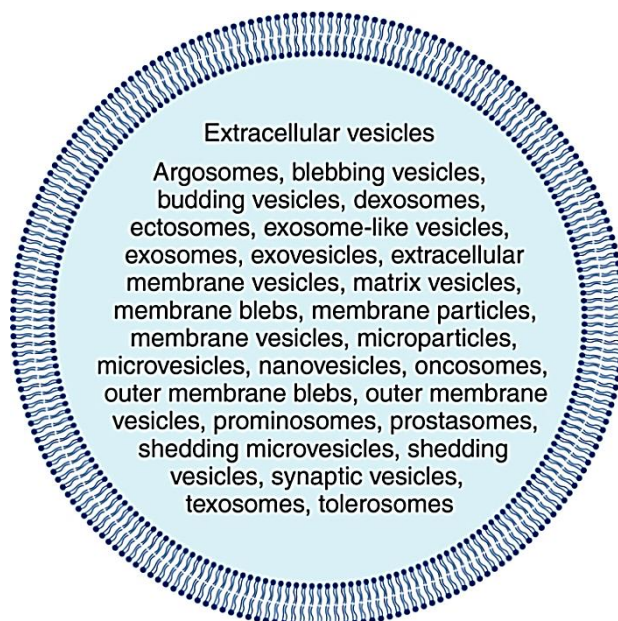
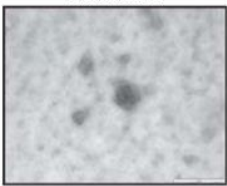
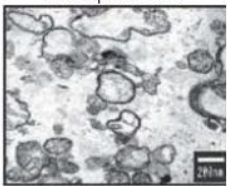
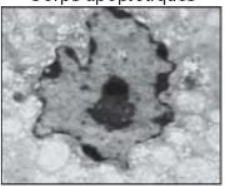


Figure 11 : Différentes nomenclatures des vésicules extracellulaires, d'après la littérature et différentes sociétés scientifiques ou médicales. (Van der Pol - 2016) (63)

Tableau 5 : Caractéristiques des vésicules extracellulaires (64)

	Exosomes	Microparticules				Corps apoptotiques
						
Formation	Exocytose	Bourgeoisement membranaire				Apoptose
Taille	40-100 nm	0,1-1 µm				0,5-4 µm
Marqueurs	Tétraspaines (CD63, CD81)	MPP CD42b CD31 CD41/CD61 CD62P	MPEry CD235a	MPL CD45 CD14 CD11a CD11b	MPEndo CD31 CD51 CD54 CD62E CD105 CD146	Histones ADN
Expression de PS	-	+				+
Méthode d'obtention	Centrifugation > 100 000 g	Centrifugation < 100 000 g				Centrifugation < 100 000 g

MPP : MP plaquettaires ; MPEry : MP érythrocytaires ; MPL : MP leucocytaires ; MPEndo : MP endothéliales ; PS : phosphatidylsérine.

Les exosomes sont des petites vésicules, dont la taille varie de 40 à 100 nm, d'origine endocytaire, issues de la fusion de corps multivésiculaires provenant de l'appareil de Golgi avec la membrane plasmique. Elles ne présentent pas de PS en surface, ne possèdent pas les mêmes antigènes que les MPs et n'ont pas leurs propriétés (65).

Les corps apoptotiques, quant à eux, ont une taille plus importante que les MPs allant de 0,5 à 4 μm , proviennent de la fragmentation des cellules apoptotiques et contiennent des résidus nucléaires des cellules dont ils sont issus (66).

III. Formation des microparticules

La connaissance des mécanismes de formation *in vivo* des MPs reste incomplète, mais nous disposons actuellement de modèles *in vitro* permettant de décrire leur processus de fabrication : les MPs circulantes sont issues, par bourgeonnement membranaire, de toutes les cellules sanguines et endothéliales après activation ou apoptose. C'est à travers le schéma plaquettaire que nous allons le présenter, puisqu'il est le plus documenté.

La réorganisation et la courbure du feuillet membranaire, les modifications du cytosquelette sont les principaux mécanismes permettant le bourgeonnement et la libération des MPs.

a) Enzymes responsables des modifications membranaires

Avant tout, il est nécessaire de rappeler comment se présente la membrane cellulaire au repos.

1. Rappels sur la membrane cellulaire

La membrane cellulaire est composée de deux couches phospholipidiques, dont la composition et distribution en phospholipides (PL) sont asymétriques (Figure 12, Figure 13) (67).

En effet, au niveau du feuillet externe, sont principalement localisés les phospholipides dont la tête polaire est une choline :

- phosphatidylcholine (PC)
- sphingomyéline (SM).

Au niveau du feuillet interne de la membrane, sont distribués de façon prépondérante les aminophospholipides (68,69) :

- phosphatidylsérine (PS) chargée négativement
- phosphatidyléthanolamine (PE)

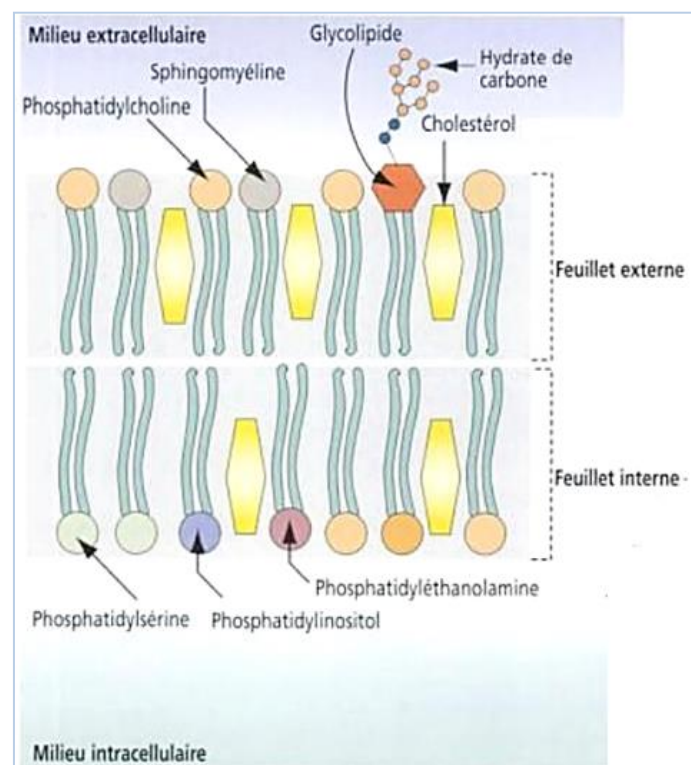


Figure 12 : Structure de la membrane cellulaire.

Histologie et biologie cellulaire : Une introduction à l'anatomie pathologique, Kierszenbaum (69).

Le cholestérol est un composant essentiel de la membrane plasmique de par son rôle à jouer dans la fluidité membranaire.

Le feuillet externe est principalement constitué de phosphatidylcholine, sphingomyéline et phosphatidyléthanolamine.

Le feuillet interne (chargé négativement) est quant à lui constitué de phosphatidylsérine, phosphatidylinositol et phosphatidyléthanolamine.

Cette répartition est un processus actif et est maintenue au repos grâce à un système enzymatique à plusieurs composants (70).

2. Enzymes impliquées dans la répartition membranaire en lipides

- a) La **flippase** est une translocase ATP-dépendante spécifique des PS et PE, qui permet leur maintien par un processus actif depuis le versant externe vers le versant interne. Elle est active au repos, l'augmentation du Ca^{2+} cytosolique inhibe son activité (71).
- b) La **floppase** est une translocase ATP-dépendante ayant une action sur les lipides donc non spécifique, permettant leur transfert du feuillet interne vers le feuillet externe. Elle est inactive au repos cellulaire (71,72).
- c) La **scramblase** permet le transfert de phospholipides de manière aspécifique et bidirectionnelle, d'un feuillet à l'autre. Elle est également inactive au repos puisqu'à activité calcium-dépendante (71,73).

Lors du repos cellulaire, c'est l'association de l'activité de la flippase et de l'inactivité de la floppase et de la scramblase qui permet le maintien de l'asymétrie.

Lors de l'activation cellulaire, l'augmentation de la concentration en calcium intracellulaire entraîne donc une inhibition de la flippase et une activation de la floppase et de la scramblase conduisant à une exposition de PS sur le feuillet externe de la membrane plasmique (Figure 13).

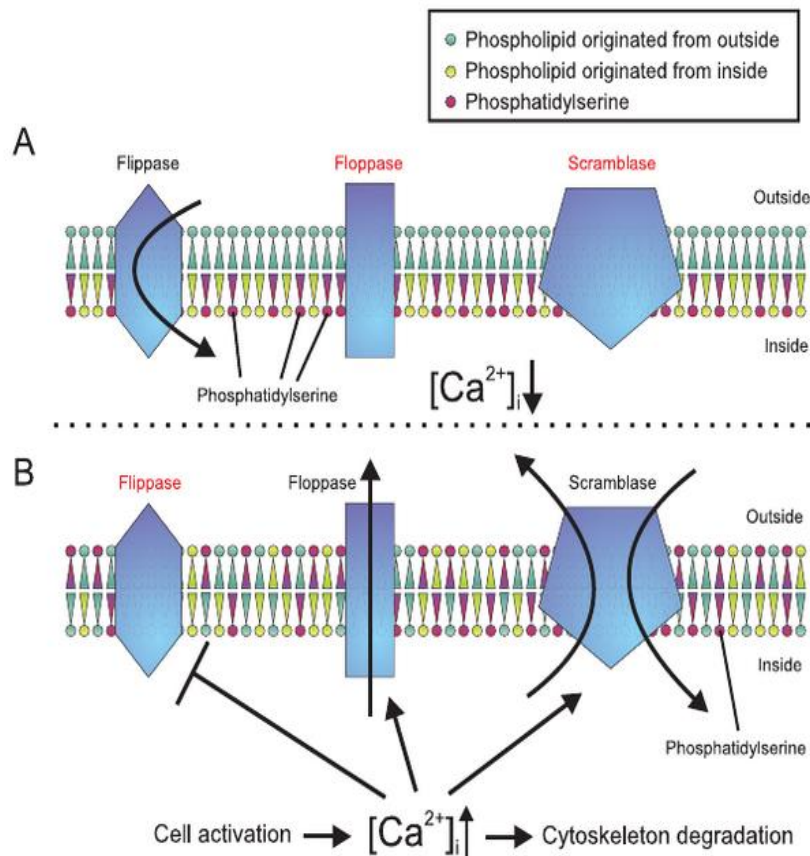


Figure 13 : Enzymes participant au maintien de l'asymétrie membranaire en phospholipides.

A : au repos, $[Ca^{2+}]_i$ cytosolique faible, B : augmentation cytosolique de la $[Ca^{2+}]_i$, activation des enzymes participant à la formation de MP. Burnier - Thrombosis and Haemostasis (74)

b) Enzymes responsables de modifications du cytosquelette

Deux autres enzymes ont un rôle important dans la formation des MPs par leur activité sur le cytosquelette. Elles sont inactives au repos, actives lors de l'activation cellulaire et permettent alors la vésiculation de la cellule.

- a) La **gelsoline** est spécifique des plaquettes. Elle dégrade la coiffe protéique des filaments d'actine du cytosquelette et permet ainsi la réorganisation du cytosquelette et la contraction plaquettaire. Son activité est Ca^{2+} dépendante.
- b) La **calpaïne** est une cystéine protéase qui permet le clivage des filaments du cytosquelette et ainsi le remodelage plaquettaire. Elle est également à activité Ca^{2+} dépendante (75).

Lors de l'activation cellulaire (ici plaquettaire), on aura donc une activation de la gelsoline et de la calpaïne entraînant une modification de l'architecture de la cellule par clivage des filaments d'actine et rupture du cytosquelette (Figure 14).

c) Formation des microparticules

Lors de l'apoptose ou de l'activation cellulaire, en réponse à un stimulus, l'association de la réorganisation des feuilletts lipidiques et du cytosquelette permet la formation de MPs (Figure 14) (68) :

1. Augmentation brutale du Ca^{2+} cytosolique depuis le réticulum endoplasmique.
2. Inhibition de la flippase et activation de la floppase et de la scramblase entraînant une exposition rapide de PS sur le feuillet externe de la membrane plasmique.
3. Surcharge transitoire en phospholipides au niveau externe par l'influx tardif et compensatoire de PC ou de SM entraînant une courbure de la membrane (76).
4. En parallèle, activation de la gelsoline et de la calpaïne ayant pour conséquence une modification de l'architecture de la cellule par clivage des filaments d'actine et rupture du cytosquelette (77).
5. Bourgeonnement et libération des microparticules.

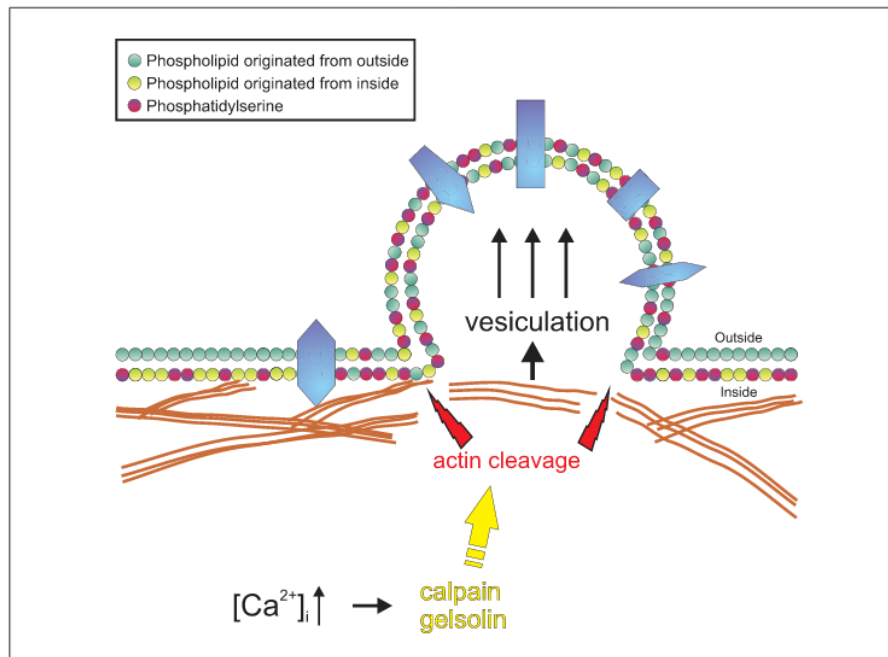


Figure 14 : Bourgeonnement cellulaire, conséquence de l'afflux cytosolique de Ca^{2+} .
 Burnier - Thrombosis and Haemostasis (74)

C'est parce que les MPs sont produites par bourgeonnement depuis les cellules activées ou en voie d'apoptose, et donc possédant la même membrane, qu'elles expriment à leur surface des antigènes propres aux cellules dont elles dérivent.

d) Particularités de la voie apoptotique

Lors de la formation de MPs dans le cadre d'un stimulus de type apoptotique, une deuxième voie de modifications du cytosquelette peut s'associer à la précédente.

Cette voie apoptotique met en jeu les protéines Rho, ROCK-1 et Caspase-3. Rho et Caspase-3 sont des protéines activées lors de l'apoptose. ROCK-1 est une kinase elle-même activée par Rho et Caspase-3, elle appartient à la superfamille des Ras et agit en phosphorylant les chaînes légères de la myosine (78). Les chaînes de myosine modifiées exercent alors des forces contractiles sur le cytosquelette,

provoquant une modification de sa configuration et un bourgeonnement cellulaire (Figure 15) (79).

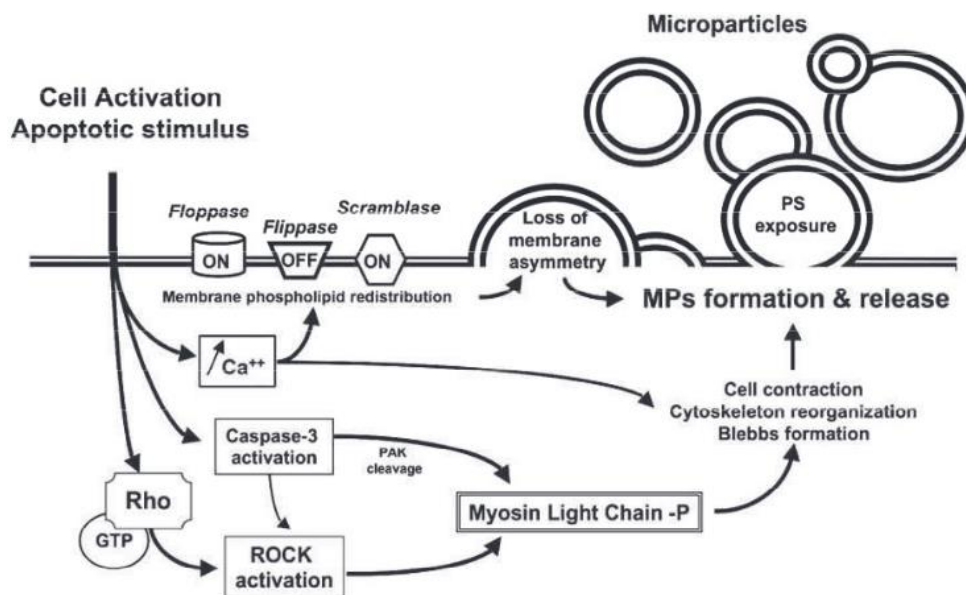


Figure 15 : Place de la voie ROCK dans le phénomène de vésiculation lors de l'apoptose.
Boulanger C. Hypertension 2006

IV. Élimination des microparticules

À l'inverse des plaquettes dont la durée de vie est conséquente, (environ 10 jours), celle des MPs est estimée à quelques heures chez l'homme : environ 5 h 30 min d'après l'équipe de Rank (80). Chez l'animal, leur durée de vie est même décrite comme encore plus brève : elle est estimée chez les lapins à environ 10 minutes (81), et environ 30 minutes chez la souris (53).

En l'état actuel des connaissances, l'élimination des MPs se fait principalement dans la rate (82).

Deux mécanismes principaux d'élimination des MPs sont envisagés (83) :

- Un mécanisme direct qui met en jeu la phagocytose par les macrophages à cause de l'expression de PS à la surface des MPs.

- Un mécanisme indirect lié à l'opsonisation (processus par lequel une molécule recouvre la membrane d'une cellule cible pour favoriser sa phagocytose) par diverses protéines telles que la Protéine S, son homologue structural Gas-6, ou encore par le complément.

V. Composition des microparticules

Les MPs sont des vésicules dont la membrane phospholipidique exprime des antigènes spécifiques de leurs cellules d'origine, et certains antigènes dépendants du stimulus responsable de leur formation.

a) Composition membranaire

Lipides membranaires

Les MPs étant issues du bourgeonnement de la membrane cellulaire, leur membrane est constituée d'une bicouche lipidique riche en phospholipides, en particulier en PS au niveau du feuillet externe (chargées négativement).

La composition lipidique de la membrane varie en fonction du type de MPs et du stimulus de formation. L'équipe de Bernimoulin et Waters montrait par exemple des variations dans l'expression en PS en étudiant la libération de MPs au niveau monocyttaire par le biais de deux stimulations différentes (lipopolysaccharide ou P-selectine) (84).

Antigènes membranaires

Les MPs expriment sur leur membrane des antigènes dont certains sont permanents (propre à la nature de la cellule dont elles dérivent) et d'autres variables (antigènes liés au contexte de formation des MPs).

Les antigènes permanents sont le reflet des molécules exprimées de manière constitutive par les cellules dont proviennent les MPs, ce qui permet la catégorisation des MPs (Tableau 6).

Les antigènes variables sont exprimés par les cellules parentales en fonction du stimulus entraînant la libération des MPs (2,3).

La variabilité phénotypique des MPs est à l'origine des nombreuses propriétés physiopathologiques qui leur sont attribuées. Par exemple les PMPs peuvent exprimer diverses molécules fonctionnelles jouant un rôle dans l'adhésion des plaquettes activées à l'endothélium ; telles que la P-sélectine (ou CD62P) présente sur les PMPs libérées par des plaquettes activées (85).

Tableau 6 : Principaux marqueurs antigéniques des MPs.
En fonction des cellules dont elles proviennent, utiles en CMF pour leur identification et quantification.

	Cellules endothéliales	Monocytes	Polynucléaires neutrophiles	Plaquettes	Érythrocytes
PS	+	+	+	+	+
CD144	+	-	-	-	-
CD14	-	+	-	-	-
CD11b	-	+	+	-	-
CD41 (GpIIb)	-	-	-	+	-
CD62P (P-selectine)	+	-	-	+ (Si plaquettes activées)	-
CD142 (FT)	+ (Si inflammation)	+ (Si inflammation)	+	+	-
Glycophorine A (CD235a)	-	-	-	-	+
PS : phosphatidylsérine, FT : facteur tissulaire					

L'équipe de Jimenez a ainsi montré la diversité antigénique des MPs en 2003, en cultivant des cellules endothéliales et en les soumettant à différents stimuli (86). Les MPs endothéliales (EMP) libérées lors d'un phénomène d'apoptose présentaient de fortes quantités de PS, et des marqueurs constitutifs représentatifs de la lignée endothéliale tels que le CD31. Différemment, les EMPs induites par stimulation par le TNF- α (*Tumour Necrosis Factor*) présentaient de fortes quantités d'antigènes induits tels que le CD62E (E-sélectine).

b) Composition intravésiculaire

Les composants intravésiculaires des MPs sont nombreux et variés (Figure 16) et proviennent, de la même manière que les antigènes membranaires, des cellules dont les MPs dérivent. On y trouve, par exemple, de l'information génétique (ARNm, micro ARN), des éléments protéiques ou encore des facteurs de transcription. Les MPs peuvent contenir des protéines telles que des enzymes métaboliques, des protéines d'adhésion, de fusion, de signalisation, des protéines associées au cytosquelette ou au nucléosome (87).

De la même manière que l'expression antigénique membranaire dépend du type cellulaire et du mode de libération, le contenu intravésiculaire dépend de ces mêmes conditions. L'équipe de Choi décrit par exemple en 2007 le modèle des MPs dérivées de cellules tumorales dans le cas du cancer du côlon. Ils montrent que ces MPs possèdent de multiples protéines impliquées dans la tumorigenèse, par exemple la protéine Fas (88).

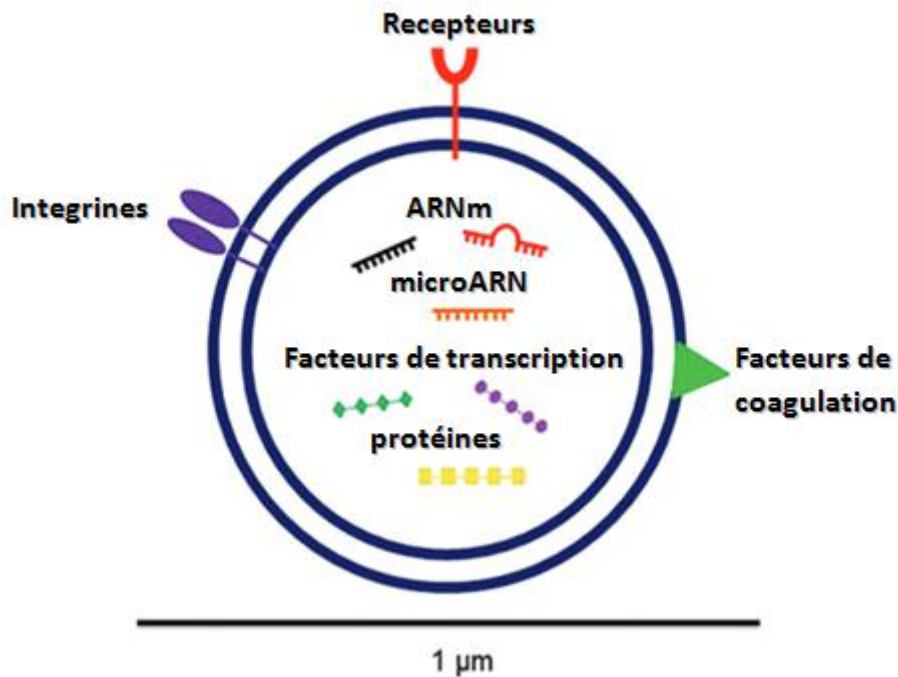


Figure 16 : Représentation du contenu des MPs.

Elles expriment de nombreux composants intracellulaires ou membranaires venant des cellules dont elles sont issues.

Au niveau intravésiculaire : facteurs de transcription, microARN, ARN messagers, protéines.

Au niveau membranaire : phospholipides, récepteurs membranaires, intégrines, protéines membranaires.

Inspiré de Hargett and Bauer (89)

VI. Rôles des microparticules

Les MPs peuvent provenir de cellules pathologiques, telles les MPs de cellules cancéreuses. Différemment, les MPs peuvent être une réponse de l'organisme à une pathologie et peuvent être libérées par des cellules physiologiques. Les variations des compositions membranaire et intravésiculaire des MPs sont la cause de la variété de leurs fonctions. Depuis leur découverte en 1967, plusieurs travaux ont suggéré que les MPs possèdent un réel rôle biologique en physiologie et en pathologie. L'hémostase, le tonus vasculaire, l'inflammation, l'angiogenèse, la modulation de la réponse immunitaire, la communication intercellulaire, la dissémination de pathogènes sont les domaines dans lesquels les MPs jouent un rôle (Figure 18, Tableau 7).

Tableau 7 : Principaux effets biologiques des MPs.
Morel 2005 (90)

Domaine d'action / pathologie	Effets biologiques	Origines cellulaires des MP
Hémostase, coagulation, thrombose	Exposition de PSer, transport de FT, de P-sélectine, de thrombomoduline, de PAF, de prostacycline	Ubiquitaire, plaquettes, endothélium, monocytes
Vasomotricité	Régulation de l'expression de la NO synthase et cavéoline, majoration du stress oxydatif, transport de TXA2 et de prostacycline	Endothélium, plaquettes
Remodelage vasculaire	Protéolyse, invasion de la membrane basale	Endothélium
Inflammation	Induction de la synthèse de cytokines pro et anti-inflammatoires (TGFβ)	Plaquettes, leucocytes
Adhésion cellulaire	Augmentation de l'expression de cytoadhésines sur les cellules cibles	Plaquettes, leucocytes
Angiogenèse	Recrutement de progéniteurs	Plaquettes, cellules tumorales
Réponse immune	Tolérance immune via l'apoptose de lymphocytes T médiés par Fas, augmentation de la réponse immune (néoantigènes)	Cellules tumorales, trophoblastiques, ubiquitaire
Cancer	Angiogenèse, tolérance immune, résistance aux cytotoxiques	Cellules tumorales, plaquettes
SIDA	Transmission de corécepteurs du VIH CCR5, CXCR4	Monocytes, plaquettes, mégacaryocytes

a) Fonctions dans l'hémostase

1. Action procoagulante et prothrombotique

L'action procoagulante des MPs se fait par l'intermédiaire de diverses molécules qu'elles expriment ou dont elles sont constituées, par exemple la phosphatidylsérine, le facteur tissulaire, le facteur von Willebrand.

Les phospholipides membranaires

Les propriétés coagulantes des MPs sont principalement dues à leur composition membranaire en phospholipides. En effet, la PS, présente en grande quantité sur la membrane des MPs, est un phospholipide anionique auquel se lient des protéines de la coagulation. La PS permet l'assemblage des complexes

prothrombinase (Xa-Va) et tenase (IXa-VIIIa) et ainsi la génération de thrombine (Figure 17) (91,92). L'équipe de Pereira a d'ailleurs mis en évidence une relation entre quantité de MPs et production de thrombine chez une série de patients atteints de syndrome des anti-phospholipides (93). L'implication de la PS dans la synthèse de la thrombine est l'une des principales voies d'action des MPs dans la coagulation.

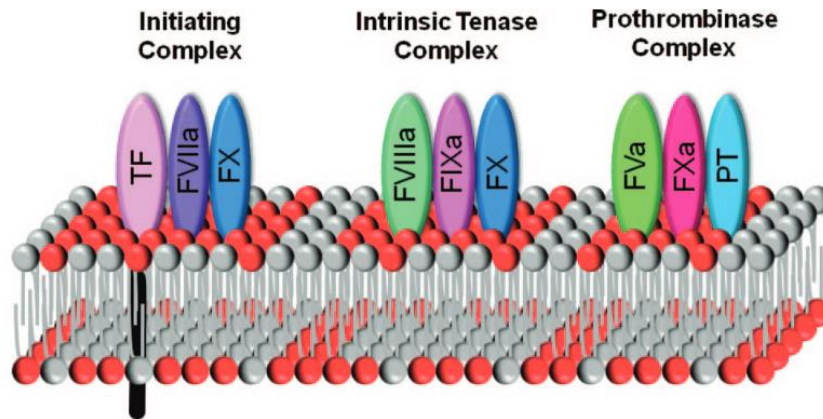


Figure 17 : Assemblage des complexes de coagulation sur la membrane phospholipidique. La membrane phospholipidique riche en PS (en rouge) permet l'assemblage de différents complexes de coagulation. TF : facteur tissulaire, PT : prothrombine (Owens, 2011) (82)

Le facteur tissulaire

L'expression de FT par les plaquettes ou les PMPs est actuellement discutée (94).

Le FT est une protéine membranaire exprimée en temps normal par des cellules extravasculaires comme les fibroblastes. Le FT peut également être exprimé en situation pathologique par des cellules vasculaires, monocytaires ou tumorales, et par leurs MPs respectives (95,96). Le FT est un cofacteur du facteur VII, et initiateur principal de la cascade de coagulation physiologique (voie extrinsèque). Il est également connu pour son implication en pathologie : principal déclencheur des anomalies de coagulation artérielles ou veineuses (97).

D'après certains auteurs, les MPs exprimant du FT jouent un rôle dans l'initiation et la propagation de la coagulation (Figure 18). Deux théories principales existent à ce sujet actuellement. La première est que les PMPs elle-mêmes exprimeraient le FT tandis que la deuxième est que certaines MPs dérivant de monocytes pourraient exprimer le FT et se lier à des plaquettes activées, initiant la coagulation (82,98).

Le facteur von Willebrand

Des travaux sur les EMPs dans le cadre de purpuras thrombotiques et thrombocytopéniques (PTT) ont montré l'expression de facteur von Willebrand (vWF) à la surface des EMPs. Le vWF est un des éléments participant à l'hémostase primaire en permettant l'adhésion des plaquettes à l'endothélium lésé.

Par exemple, une étude réalisée à ce sujet en 2005 sur des sujets atteints de PTT montre qu'en présence de ristocétine, plus de 95 % des plaquettes et EMPs forment des agrégats, que ces EMPs expriment du vWF principalement de haut poids moléculaire, et que celui-ci permet une plus grande stabilité des agrégats formés (99).

Autres

L'équipe d'Andrews a décrit la richesse en Mac-1 des MPs granulocytaires. Mac-1 est une intégrine, récepteur du complément, qui joue un rôle dans l'adhésion des granulocytes, et participe à la formation du thrombus via l'activation plaquettaire (100).

2. Fonction anticoagulante

Le récepteur à la protéine C activée

De manière opposée, des MPs aux propriétés anticoagulantes sont libérées physiologiquement, et de manière exacerbée lors de sepsis ou d'états inflammatoires.

Le principal mécanisme décrit est lié à la libération de MPs riches en *endothelial protein C receptor* (EPCR), récepteur à la protéine C activée dont l'activité est à la fois anticoagulante (par inactivation de facteurs de coagulation) et anti-inflammatoire. La protéine C activée liée à l'EPCR exprimé par les MPs inactive les facteurs procoagulants Va et VIIIa, et diminue donc la production de thrombine (101,102).

b) Rôle dans la modulation du tonus vasculaire

Via des médiateurs

Les MPs, principalement les EMPs libérées en contexte pathologique, sont capables d'induire une dysfonction endothéliale aiguë par action sur les cellules endothéliales (CE), et ainsi de modifier les propriétés vasomotrices des vaisseaux concernés.

Il a été décrit *in vitro*, que la stimulation des CE par les PMP, augmentées dans des vaisseaux pathologiques, entraînait la libération de cytokines, molécules de signalisation cellulaire et l'expression de molécules d'adhésion, et permettait également l'augmentation de certains antigènes à la surface endothéliale. L'ensemble de ces éléments entretenirait ainsi l'inflammation vasculaire et, de la même manière, les dysfonctions endothéliales (103).

Rôle du monoxyde d'azote

Un autre mécanisme d'action spécifique des MPs libérées lors de pathologies cardiaques consiste en une réduction de la libération de monoxyde d'azote (NO).

Le NO est le principal médiateur de la relaxation vasculaire via l'acétylcholine (104). Dans une étude réalisée sur aorte de rat *in vitro*, les EMPs provenant de culture de cellules endothéliales provoquaient une réduction de production de NO, une libération d'ions superoxydes et entraînaient ainsi une diminution de la vasodilatation vasculaire (105). Les mêmes effets furent également observés chez l'homme, lors de travaux concernant des patients atteints de pathologies myocardiques aiguës (106).

Voie des cyclooxygénases

Les travaux de Pfister montrent que les PMPs permettent d'augmenter la synthèse de cyclooxygénase 2 (COX2) par les cellules endothéliales (Figure 18). COX 2 est une enzyme permettant la transformation d'acide arachidonique en thromboxane A₂, molécule possédant entre autres une activité vasoconstrictrice (107).

c) Rôle dans l'inflammation

Les phospholipides membranaires

Les phospholipides oxydés de la membrane des MPs sont capables d'induire l'activation des récepteurs du facteur d'activation plaquettaire présents sur les cellules endothéliales et leucocytaires, et de mimer ainsi leur action (rôles dans l'agrégation plaquettaire, l'inflammation, la dégranulation mastocytaire, ...) (108).

Médiateurs de l'inflammation

Les MPs sont capables d'augmenter la synthèse et l'expression de molécules d'adhésion à la surface des cellules avec lesquelles elles interagissent. L'étude *in vitro* de l'adhésion monocytes/cellules endothéliales de veine ombilicale humaine (HUVEC) montre l'augmentation d' *InterCellular Adhesion Molecule 1* (ICAM-1) (CD54), molécule permettant la migration cellulaire, sur les CE en présence de PMPs (Figure 18) (109).

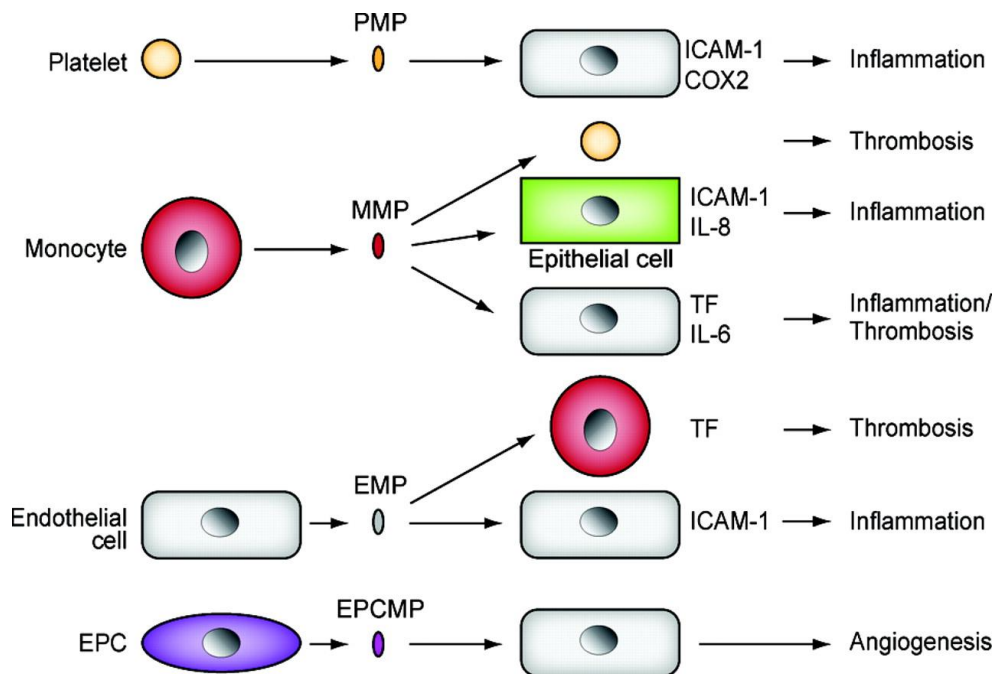


Figure 18 : Molécules libérées et leurs principales actions, en fonction du type de MPs.
EPC= cellules précurseurs endothéliales TF= facteur tissulaire (Nigel Mackman) (82)

d) Rôle dans l'angiogenèse

La protéolyse matricielle

Les MPs issues de cellules tumorales participent à la protéolyse matricielle par le biais de métalloprotéases. Les métalloprotéases (par exemple MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9) sont des enzymes qui permettent la dégradation de la matrice extracellulaire et jouent un rôle en physiologie (cicatrisation,

embryogenèse,...) comme en pathologie (invasion tumorale, pathologies vasculaires...) L'implication des MPs dans la protéolyse se fait par exemple via l'activation de l'urokinase (uPA) par certaines MPs. L'uPA est une enzyme dont l'action principale est la dégradation du plasminogène (102). L'implication des MPs dans ce mécanisme peut se faire également via les EMPs favorisant l'action de MMP-2 et MMP-9 en contexte post-ischémique (110), ou des MPs issues de cellules épithéliales gingivales favorisant l'action de MMP-1 et MMP-3 dans les pathologies parodontales (111).

La prolifération et la migration des cellules endothéliales

La prolifération et la migration des cellules endothéliales sont favorisées par les MPs grâce à l'expression de cytokines favorisant la prolifération vasculaire (*vascular endothelial growth factor* (VEGF), *platelet-derived growth factor* (PDGF)) à leur surface (112).

Certaines MPs issues de lymphocytes T activés ou en voie d'apoptose favorisent la néovascularisation grâce à une voie de libération de NO (113).

La composition lipidique membranaire des MPs issues de cellules tumorales, notamment en sphingomyéline, est également décrite comme favorisant la prolifération vasculaire (114).

e) Rôle dans la modulation de la réponse immunitaire

La voie apoptotique Fas/Fas Ligand

Les MPs participent à la modulation immune lors du premier trimestre de la grossesse. Le principal mécanisme responsable de la tolérance immune lors de la grossesse est la voie apoptotique Fas/Fas Ligand par son action dans la destruction

de lymphocytes activés dirigés contre des antigènes paternels. Des études montrent que les MPs participent à la libération de ce complexe Fas/Fas Ligand, et par conséquent à ce processus complexe de tolérance immune en situation de grossesse (115).

Le mécanisme est proche pour l'échappement immunitaire des cellules cancéreuses. Les MPs cancéreuses induisent la libération de Fas/Fas Ligand cytoplasmique chez les cellules de l'immunité, à la différence des cellules non cancéreuses où le Fas/Fas Ligand est uniquement présent de manière membranaire. Sa présence cytoplasmique entraîne l'apoptose cellulaire, et permet aux cellules tumorales d'échapper aux défenses cellulaires. Ce mécanisme a, par exemple, été observé lors de cancers ovariens métastasés (116).

À l'inverse, les MPs participent également à l'exacerbation de cette réponse immune. Une augmentation des MPs pourrait entraîner une persistance de la mise en contact de protéines cibles avec le système immunitaire par exemple dans certaines pathologies auto-immunes comme le lupus, participant ainsi à l'entretien de la maladie (50).

f) Rôle dans la dissémination des pathogènes

Les MPs participent à la dissémination de divers pathogènes. Elles jouent un rôle dans la dissémination ou la progression tumorale (117), et dans la dissémination infectieuse (118) comme les virus ou les prions (119,120). Elles participent par exemple à la dissémination du virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (HIV-1) par transfert du récepteur CCR5, principal co-récepteur macrophagique du virus (Figure 19) (121).

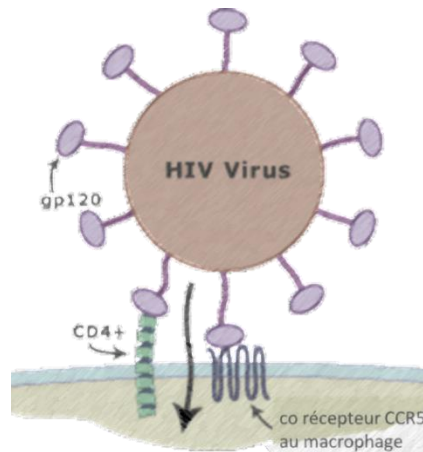


Figure 19 : Représentation du CCR5 dans l'infection cellulaire par le HIV (122).

g) Rôle dans la communication intercellulaire

Deux mécanismes sont décrits à propos de l'implication des MPs dans la communication intercellulaire (Figure 20) (118). Premièrement, celles-ci sont capables de stimuler directement des cellules cibles par le biais d'interactions avec leurs récepteurs. Deuxièmement, les MPs peuvent transférer à une cellule cible des molécules qu'elles possèdent (des récepteurs, des protéines, du matériel génétique...) (118,123,124).

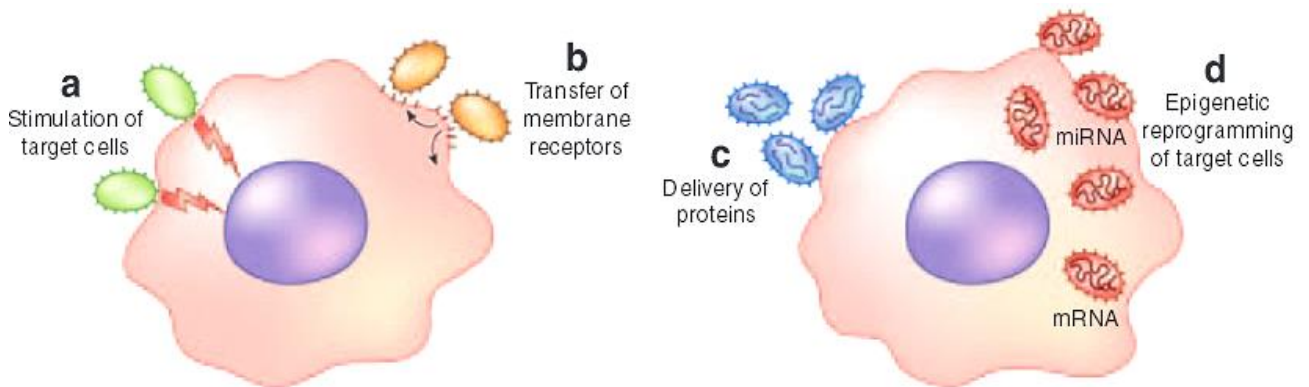


Figure 20 : Représentation schématique des mécanismes impliqués dans la communication entre MPs et cellules.
 (a) Les MPs peuvent agir comme un complexe messager par interaction directe (ligand/récepteur) avec des cellules cibles. (b) Les MPs permettent le transfert de protéines membranaires tels les récepteurs. (c) Les MPs peuvent transférer des protéines cytoplasmiques ou des pathogènes à des cellules cibles. (d) Les MPs permettent l'échange de matériel génétique comme des ARNm, microARN ou des facteurs de transcription d'une cellule à l'autre.
 (Camussi 2010) (123)

À titre d'exemple des interactions directes MP/cellules, nous avons mentionné précédemment le rôle des PS membranaires dans l'activation de la cascade de coagulation ou l'expression de sphingomyéline à la surface des MPs capable d'induire l'angiogenèse.

À propos du transfert de récepteurs, nous avons déjà abordé dans ce travail le cas du complexe Fas/Fas L jouant un rôle dans l'apoptose et du CCR5 jouant un rôle dans l'invasion par le HIV. Nous pouvons citer également le transfert de molécules d'adhésion, les intégrines telles que CD41 depuis les PMPs vers les cellules endothéliales participant ainsi à leur activité procoagulante (109).

Au sujet du transfert protéique depuis les MPs vers les cellules cibles, nous pouvons donner pour exemple le transfert de caspase-1, inducteur d'apoptose, depuis des MPs issues de monocytes activés par certaines endotoxines vers des cellules musculaires lisses vasculaires (125).

Le transfert *in vivo* de matériel génétique fonctionnel entre cellules grâce aux MPs est une des découvertes majeures de ces dernières années. L'équipe de Ridder l'illustre en étudiant les interactions, et notamment le transfert de micro ARN, dans un contexte inflammatoire entre MPs issues de cellules hématopoïétiques et le cerveau (126) ou en contexte tumoral (127).

Ces divers rôles sont évidemment imbriqués et complexes. Il est parfois difficile de les distinguer les uns des autres.

Tous les mécanismes ne sont pas encore élucidés, et certains doivent encore être démontrés *in vivo*.

VII. Implication des MPs en pathologie

Les MPs étant formées après l'activation cellulaire et l'apoptose, il est logique que leur nombre soit augmenté dans de nombreuses pathologies. Les travaux de recherche s'emploient actuellement à prouver leur présence, et surtout à exploiter ces informations afin d'en faire des facteurs diagnostiques, pronostiques ou d'utilité thérapeutique. Les MPs ont un véritable rôle à jouer de biomarqueur dans plusieurs pathologies.

Une multitude de pathologies sont associées à une augmentation des MPs circulantes, notamment les pathologies systémiques inflammatoires, les maladies auto-immunes, les pathologies cardiovasculaires (comme l'HTA, l'artériosclérose, l'infarctus), les pathologies cancéreuses, etc. (47,52,93,96,106).

Les principales pathologies hématologiques pour lesquelles il est établi que les MPs jouent un rôle sont développées dans le Tableau 8.

Les MPs peuvent être un marqueur d'activation cellulaire (128), un marqueur d'activité pathologique (129), diagnostique (130), ou pronostique (131), un indicateur de risque (132), une cible thérapeutique, ou encore un indicateur de réponse pharmacologique (133), mais aussi un ainsi qu'un marqueur d'intégrité des produits sanguins (134).

Tableau 8 : Principales implications des MPs en pathologie hématologique.
 PMPs : microparticules plaquettaires, EMPs : microparticules endothéliales, d'après György 2011 (135)

Physio/pathologies	Type de microparticules	Comportement des MPs	Références
Hématopoïèse	MPs de cellules mésenchymateuses	Implications des MPs dans l'hématopoïèse, dans la réparation des lésions post-irradiation	(136)
Hémoglobininurie paroxystique nocturne	EMPs	Augmentation des EMPs circulantes	(137)
Drépanocytose	EMPs, PMPs, MPs érythrocytaires	Augmentation des PMPs, EMPs et MPs érythrocytaires circulantes, d'autant plus en cas de crise	(138,139)
Purpura thrombopénique immunologique	PMPs	Augmentation des PMPs en phase aiguë, diminution en phase chronique	(140)
Purpura thrombotique thrombocytopénique	EMPs	Augmentation des EMPs circulantes	(141)
Néoplasies myéloprolifératives	EMPs, PMPs, MPs érythrocytaires	Augmentation des EMPs, PMPs et MPs érythrocytaires dans la Thrombocythémie Essentielle, la Polyglobulie de Vaquez et la Myélofibrose Primitive	(128,142–144)
Myélome	PMPs, MPs de plasmocytes pathologiques	Élévation des PMPs circulantes, élévation des MPs plasmocytaires lors des thérapeutiques	(133,145)
Leucémie lymphoïde chronique	MPs de lymphocytes B pathologiques	Augmentation des MPs issues de cellules lymphoïdes en réponse au système immunitaire	(146)
Leucémie aiguë myéloblastique	MPs de cellules blastiques	Augmentation des MPs avec la sévérité de la leucémie	(129)

VIII. Microparticules et néoplasies myéloprolifératives Phi négatives : état des lieux.

Dès 2002, l'équipe de Villmow mettait en évidence une élévation des différentes MPs chez les patients atteints de NMP, avec notamment une différence significative des valeurs de PMPs chez les PV, TE, et myélofibroses par rapport aux témoins sains (147).

L'équipe de Trappenburg a montré en 2009 que les patients atteints de TE avaient un nombre de MPs circulantes plus élevé que les témoins sains et que ces MPs exprimaient principalement des marqueurs plaquettaires et endothéliaux suggérant une activation plaquettaire et endothéliale chez ces patients (144).

Des études plus récentes ont permis de faire le lien entre élévation des MPs et hypercoagulabilité dans les NMP (143,148–150).

L'équipe de Han a décrit en 2013 une élévation des PMPs majorée chez les patients atteints de myélofibrose primitive par rapport aux autres NMP Phi négatives. Cette équipe décrit par la même occasion une absence de différence des valeurs de PMPs entre les groupes PV et TE, et des variations de certaines catégories de MPs entre les groupes JAK2 muté et JAK2 non muté (151).

En 2015, une équipe décrivait le rôle des MPs dans l'hypercoagulabilité des NMP Phi négatives par le biais d'une technique fonctionnelle, Zymuphen MP Activity[®]. Cette technique est un test fonctionnel permettant la mesure de l'activité procoagulante des MPs via la synthèse de thrombine. Cette équipe montre alors une activité procoagulante des MPs plus élevée chez les patients atteints de NMP par rapport aux témoins sains, et également plus élevée chez les patients atteints de PV

par rapport aux patients atteints de TE. Une activité procoagulante plus élevée était également décrite chez les patients mutés JAK2^{V617F} plutôt que chez les non mutés JAK2^{V617F}, et chez les patients sans traitement cytoréducteur plutôt que chez les patients traités (152).

En 2016, les équipes des laboratoires du GHICL et du CHRU de Lille montrent que les patients atteints de TE mutés JAK2^{V617F} ont des concentrations en PMPs circulantes plus élevées que les patients mutés CALR ou « triple négatif ». Ils observent également que les patients mutés JAK2 possèdent une activité procoagulante liée au MPs plus élevée au diagnostic que les patients mutés CALR ou « triple négatif ». Ces résultats suggèrent que les MPs pourraient être en partie responsables des différences de risque thrombotique selon le statut mutationnel existant chez les TE (143).

OBJECTIFS

Les néoplasies myéloprolifératives sont des pathologies dont l'un des enjeux principaux est la gestion du risque thrombotique, justifiant le fait que la stratégie thérapeutique soit fondée sur la maîtrise du risque thrombotique via les traitements antiagrégants plaquettaires et les traitements cytoréducteurs. L'implication des microparticules dans les mécanismes de la thrombose est maintenant décrite dans de nombreuses études (153), notamment dans les néoplasies myéloprolifératives où les PMPs sont augmentées (151). Cependant, malgré une stratégie thérapeutique bien menée et des signes biologiques évocateurs de rémission, certains patients présenteront encore des complications thrombotiques (154,155). Puisque les PMPs sont impliquées dans le risque thrombotique des NMP et que le traitement cytoréducteur diminue le risque thrombotique sans toutefois l'éliminer, nous nous sommes intéressés à l'implication des MPs dans ces phénomènes thrombotiques sous traitement cytoréducteur bien conduit.

I. Objectif principal de l'étude

L'objectif principal de ce travail a consisté à évaluer les conséquences de l'instauration d'un traitement cytoréducteur sur la concentration des PMPs circulantes. Pour cela nous avons étudié les concentrations plasmatiques en PMPs dans une population de patients atteints de NMP Ph1- avant et après instauration d'un traitement cytoréducteur et nous les avons comparées à des patients non traités ainsi qu'à des témoins sains.

II. Objectifs secondaires de l'étude

Nos objectifs secondaires étaient au nombre de quatre :

- comparer les MPs au diagnostic entre nos groupes malades et témoins afin de confirmer les données de la littérature.

- évaluer l'intérêt de la numération des PMPs plasmatiques comme biomarqueur de la réponse au traitement cytoréducteur.

- évaluer l'intérêt de la numération des PMPs au diagnostic comme outil prédictif de la réponse au traitement.

- par ailleurs, l'acquisition d'un nouveau cytomètre (Navios, Beckman Coulter®) au cours de notre projet nous a conduits à envisager soit le transfert du protocole sur ce nouveau cytomètre (Navios) soit la poursuite des mesures de MPs sur l'ancien cytomètre (Cytomics FC500). Afin de faire un choix, nous avons comparé les performances de nos deux cytomètres lors d'un travail réalisé en parallèle du projet principal.

MATERIELS ET METHODES

I. Population

Ce travail a été réalisé en complément d'une étude bicentrique entre le Groupement des Hôpitaux de l'Institut Catholique de Lille (GHICL) et le Centre Hospitalier Régional Universitaire (CHRU) de Lille menée depuis 2011 et dont le GHICL est le promoteur. Cette étude s'intitule « Rôle des microparticules procoagulantes circulantes dans l'hypercoagulabilité des néoplasies myéloprolifératives chroniques Philadelphia négatives », et a pour investigateur coordonnateur le Professeur Agnès Charpentier, pour responsable scientifique le Professeur Sophie Susen, et pour co-investigateurs ayant participé à l'inclusion des patients le Docteur Nathalie Cambier, le Docteur Matthieu Wemeau, le Professeur Christian Rose et le Professeur Jean-Loup Demory.

a) Recrutement initial

Il s'agit d'une étude prospective bicentrique (GHICL et CHRU de Lille), constituée de deux groupes patients et témoins. Pendant une période de 2 ans tous les patients ont été inclus consécutivement lors du diagnostic et avant tout traitement cytoréducteur. Après l'inclusion, les patients étaient suivis de manière semestrielle.

Concernant la population de patients, les critères d'inclusion étaient :

- Âge supérieur à 18 ans
- Diagnostic avéré de néoplasie myéloproliférative Phi négative (PV, TE ou MFP) selon les critères de l'OMS 2008
- Information reçue et consentement au protocole

Et les critères de non-inclusion au sein de la population de patients étaient :

- Grossesse
- Patients sous tutelle ou curatelle, privés de libertés ou en situation d'urgence

Concernant la population de témoins, les critères d'inclusion étaient :

- Sujets sans pathologie hématologique maligne, ayant des numérations formule sanguine et plaquettaire normales
- Absence d'antécédent thromboembolique personnel
- Absence de facteur de risque thromboembolique établi : thrombophilie connue, cancers, et autres maladies associées à un risque thrombotique
- Absence de grossesse
- Non fumeurs
- Absence de traitement contraceptif œstrogénique chez les femmes

b) Population d'étude

Pour la réalisation de ce travail, les patients présentant une Myélofibrose Primitive ont été exclus. En effet la Myélofibrose Primitive est une pathologie rare et nous disposons de trop peu de patients pour être représentatif malgré le recrutement bicentrique de l'étude.

Le suivi a été fait sur une période maximale de 3 ans. Nous avons fait le choix de ne travailler que sur les patients présentant un suivi suffisant pour l'étude cinétique des concentrations de MPs circulantes : notre population d'étude était donc constituée de patients ayant eu au moins une visite de suivi à 6 ou 12 mois à partir de la visite d'inclusion. Les patients perdus de vue ont donc été exclus, car ne permettaient pas une analyse cinétique des MPs.

Les patients ont été évalués au diagnostic avant tout traitement cytoréducteur (à la première visite), puis tous les 6 mois. Pour les patients traités, nous avons appelé « T0 » la visite correspondant à la décision de mise sous traitement cytoréducteur, et « T6 » la visite correspondant à 6 mois de traitement cytoréducteur (Figure 21 B). Pour les patients non traités, la visite au diagnostic se confond avec le T0, et le temps T6 correspond au 6^{ème} mois de suivi. Il en est de même pour le temps T12 (Figure 21 A).

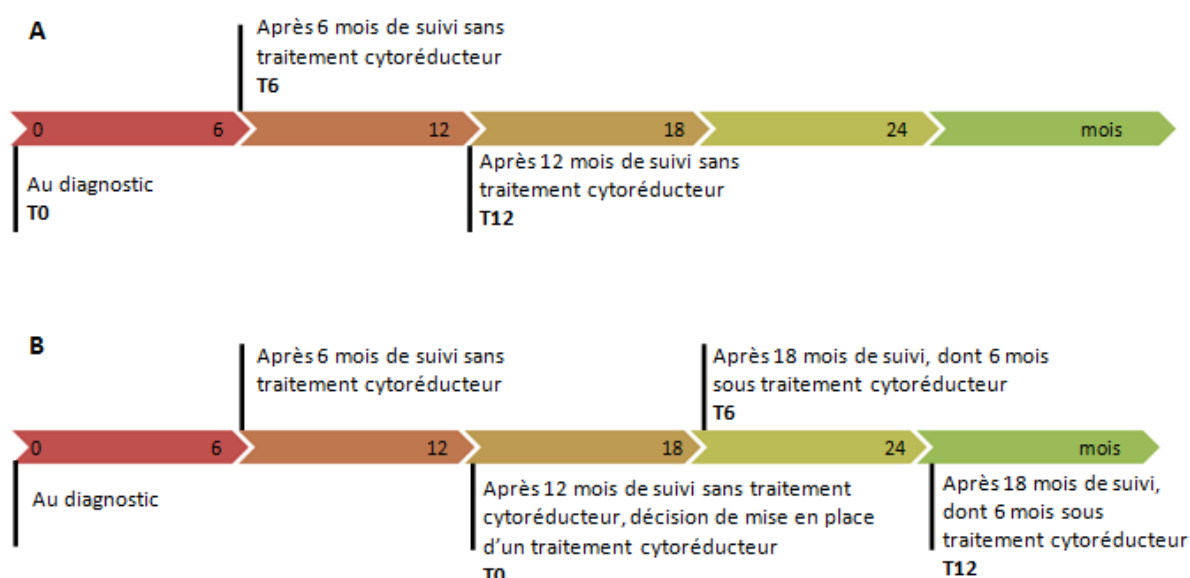


Figure 21 : Représentations schématiques des délais de suivi et du temps d'étude analysés chez nos patients. Cas (A) d'un patient non traité par traitement cytoréducteur (B) et d'un patient ayant bénéficié d'un traitement cytoréducteur.

II. Variables étudiées

La collecte des données médicales dans les dossiers des patients s'est faite sans connaître le résultat du dénombrement des MPs. Ces données ont été consignées dans une base de données anonymisée et resteront confidentielles.

a) Variables quantitatives

Les variables quantitatives que nous avons étudiées sont les concentrations en PMPs, en MPs dérivant d'hématies, en MPs exprimant la P-selectine et en MPs dérivant de cellules endothéliales.

Nous avons également recueilli les numérations formules sanguines, hémocrite et âge de nos patients.

b) Variables qualitatives

Nous avons étudié certaines variables qualitatives telles que les pathologies intercurrentes (HTA, diabète, obésité, dyslipidémie, antécédents de néoplasie ou de thrombose), les traitements pouvant augmenter les MPs (traitement œstroprogestatif, traitement hypolipémiant) et le statut tabagique ou non du patient. Nous avons aussi recueilli le statut mutationnel de nos patients, leur sexe, le type de NMP dont ils étaient atteints, la présence de traitement antiagrégant plaquettaire et/ou de traitement cytoréducteur, la réponse au traitement cytoréducteur, ainsi que l'évolution clinique de la pathologie.

c) Constitution des groupes selon la présence d'un traitement cytoréducteur

Nos patients ont été répartis en deux groupes selon leur statut thérapeutique (Figure 22) : le groupe de patients traités est constitué des patients recevant un traitement cytoréducteur par Hydrea[®], Xagrid[®], Vercyte[®] ou interféron, tandis que le groupe de patients non traités est constitué des patients n'ayant pas reçu de traitement cytoréducteur. Tous nos patients traités ont reçu en première ligne de l'Hydrea[®]. La constitution de ces groupes ne tient pas compte du traitement éventuel par un antiagrégant plaquettaire.

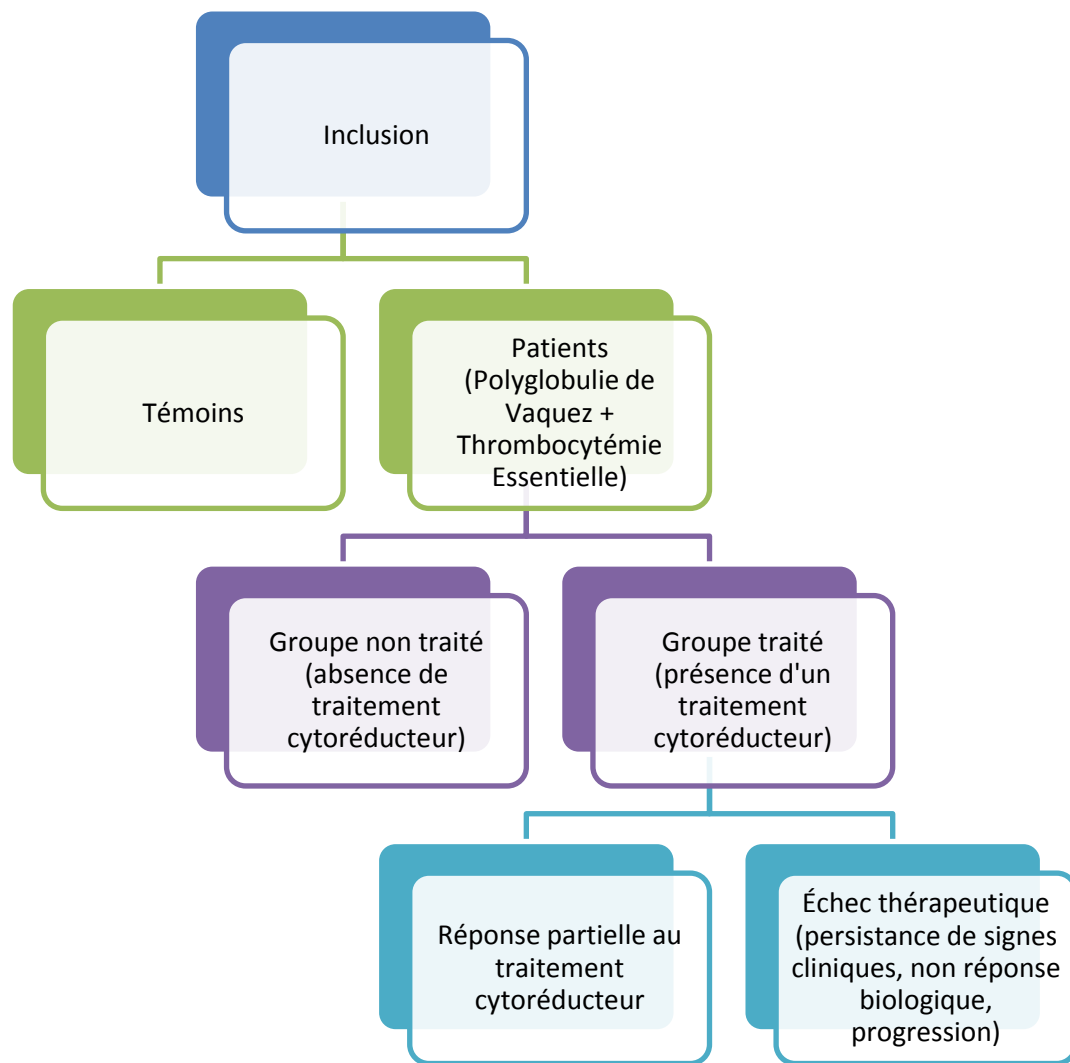


Figure 22 : Représentation hiérarchique des critères d'intérêt dans la population étudiée.

La plupart de nos patients du groupe traités se sont vus prescrire un traitement cytoréducteur suite à leur visite d'inclusion (première visite). Un petit nombre de patients cependant a été suivi pendant plusieurs mois avant de bénéficier d'un traitement cytoréducteur. Pour ces derniers, si le nombre de points de suivi le permettait, nous avons fait le choix d'étudier séparément les deux phases thérapeutiques (avant et après traitement cytoréducteur) afin de renforcer notre effectif de patients du groupe non traités.

d) Constitution des groupes selon la réponse au traitement cytoréducteur

Pour évaluer la réponse au traitement cytoréducteur nous avons utilisé les critères proposés par l'équipe de G. Barosi en 2013 qui permettaient de définir 4 groupes : rémission complète, rémission partielle, absence de réponse et progression. Les critères nécessaires à la distinction entre rémission complète et partielle différaient uniquement par le résultat de la BOM (critère D, Tableau 9 et Tableau 10) (156).

Nous avons considéré comme nécessaire la présence de tous les critères de rémission proposés par Barosi pendant au moins 2 visites consécutives afin d'affirmer une réponse thérapeutique. Pour cela nous avons évalué la réponse au traitement cytoréducteur à 6 et 12 mois de traitement. Les patients remplissant l'ensemble de ces critères ont été réunis dans un groupe que nous avons intitulé « réponse partielle ».

**Tableau 9 : Critères de réponse au traitement cytoréducteur pour la Polyglobulie de Vaquez
proposés par Barosi (156).**

Critères de réponse pour la PV	
Rémission complète : nécessite la présence de tous les critères ci-dessous	
A	Résolution durable ou large amélioration des signes cliniques associés incluant hépatosplénomégalie palpable
B	Rémission biologique durable définie par un hémocrite <45 % sans saignées, plaquettes $\leq 400 \times 10^9/L$, leucocytes $<10 \times 10^9/L$
C	Absence de progression, d'évènement thrombotique ou hémorragique
D	Rémission histologique sur la moelle osseuse
Rémission partielle : nécessite la présence de tous les critères ci-dessous	
A	Résolution durable ou large amélioration des signes cliniques associés incluant hépatosplénomégalie palpable
B	Rémission biologique durable définie par un hémocrite <45 % sans saignées, plaquettes $\leq 400 \times 10^9/L$, leucocytes $<10 \times 10^9/L$
C	Absence de progression, d'évènement thrombotique ou hémorragique
D	Absence de rémission histologique sur la moelle osseuse
Absence de réponse	Toute situation de réponse ne remplissant pas les critères de rémission partielle
Progression	Transformation en fibrose secondaire, syndrome myélodysplasique, leucémie aiguë secondaire

**Tableau 10 : Critères de réponse au traitement cytoréducteur pour la Thrombocytemie Essentielle
proposés par Barosi (156).**

Critères de réponse pour la TE	
Rémission complète : nécessite la présence de tous les critères ci-dessous	
A	Résolution durable ou large amélioration des signes cliniques associés incluant hépatosplénomégalie palpable
B	Rémission biologique durable définie par des plaquettes $\leq 400 \times 10^9/L$, leucocytes $<10 \times 10^9/L$, absence d'érythromyélocytose
C	Absence de progression, d'évènement thrombotique ou hémorragique
D	Rémission histologique sur la moelle osseuse
Rémission partielle : nécessite la présence de tous les critères ci-dessous	
A	Résolution durable ou large amélioration des signes cliniques associés incluant hépatosplénomégalie palpable
B	Rémission biologique durable définie par des plaquettes $\leq 400 \times 10^9/L$, leucocytes $<10 \times 10^9/L$, absence d'érythromyélocytose
C	Absence de progression, d'évènement thrombotique ou hémorragique
D	Absence de rémission histologique sur la moelle osseuse
Absence de réponse	Toute situation de réponse ne remplissant pas les critères de rémission partielle
Progression	Transformation en PV, fibrose secondaire, syndrome myélodysplasique, leucémie aiguë secondaire

L'obstacle majeur de cette démarche consiste dans le fait que les critères de Barosi exigent la réalisation d'une biopsie ostéo-médullaire (critère D, Tableau 9 et Tableau 10) afin de pouvoir affirmer la réponse complète au traitement. En effet,

d'après Barosi, seul le résultat de cette biopsie ostéo-médullaire permet la distinction entre réponse partielle et réponse complète au traitement. La réalisation d'une biopsie ostéo-médullaire est toutefois un examen controversé par les cliniciens français, les patients de notre étude n'ont donc pas eu cette analyse. Pour cette raison, nous n'avons pu distinguer ces 2 groupes « rémission partielle » et « rémission complète », et nous parlerons donc uniquement pour l'ensemble de ces patients de « réponse partielle au traitement » afin de tenir compte d'une potentielle absence de rémission histologique.

Par ailleurs, les patients ne répondant pas aux critères de rémission partielle ont été réunis en un seul groupe que nous avons intitulé « échec au traitement cytoréducteur » (Figure 22). Parmi ces patients, nous avons identifié 3 causes d'échec : « persistance de signes cliniques », « non réponse biologique » et « progression ».

Le groupe « persistance de signes cliniques » était constitué de patients ayant des symptômes liés à la NMP, à type de troubles microcirculatoires ou d'hyperviscosité sanguine (céphalées, vertiges, flou visuel, paresthésies, acouphènes, prurit à l'eau, érythromélgies, organomégalies), quelle que soit leur réponse biologique. Le groupe intitulé « non réponse biologique » était constitué de patients ne présentant pas de signes cliniques de NMP ou de signes de progression, mais dont le bilan biologique ne respectait pas les critères proposés par Barosi. La « progression » était définie par la survenue d'un évènement thrombotique, hémorragique, ou d'une transformation survenant lors du suivi.

III. Préanalytique

Lors de chaque consultation nécessaire au suivi des patients de l'étude, un échantillon de sang était recueilli sur tube citraté de 5 mL par ponction veineuse au pli du coude pour dénombrement des MPs, et un deuxième échantillon sur tube EDTA (acide éthylène diamine tétraacétique) pour réalisation de la numération formule sanguine (NFS). Ces prélèvements étaient effectués par un ou une infirmier(e) diplômé(e) d'état (IDE) du service de consultations d'hématologie. Le tube citraté est de type Vacutainer® (BD Diagnostics, USA) et contient 0,129 mol/L de citrate de sodium. Pour la ponction veineuse, une aiguille de 21 G était utilisée.

Le tube citraté était acheminé au laboratoire (au laboratoire d'hémostase du Centre de Biologie Pathologie pour les prélèvements du CHRU ou au laboratoire de l'hôpital St-Philibert pour les prélèvements du GHICL) par coursier dans un délai inférieur à 2 h. Le transport par coursier permettait de limiter les interférences liées à la génération *in vitro* de MPs par agitation du tube.

IV. Analytique

a) Centrifugation

Chaque prélèvement a été traité par double centrifugation afin d'obtenir du plasma déplaqueté (*platelet free plasma*, PFP). Ces étapes de centrifugations consistaient d'abord en une centrifugation à une vitesse de 2500 g (4000 tours/minute) pendant 15 minutes à température ambiante. Le plasma surnageant était ensuite décanté en cône eppendorf® en laissant environ 1 cm de plasma dans le tube primaire afin de ne pas contaminer le plasma avec des plaquettes. Ce plasma pauvre en plaquettes (PPP) était de nouveau centrifugé en cône eppendorf® à la

vitesse de 2500 g pendant 15 minutes à température ambiante. Le PFP était alors décanté en laissant de nouveau un résidu au-dessus du culot, d'environ 10 % du volume, afin d'éviter de nouveau toute contamination par les plaquettes. La présence de plaquettes dans le prélèvement interfère avec l'identification de PMPs en raison de leur immunophénotype identique en cytométrie en flux, et peut entraîner une génération artéfactuelle de MPs lors des cycles de congélation/décongélation (55–57).

b) Conservation

Après l'étape de double centrifugation, chaque prélèvement était aliquoté dans des cryotubes afin d'être immédiatement congelé à -80 °C. Cette étape devait avoir lieu dans les 4 heures suivant le prélèvement.

c) Identification et dénombrement des microparticules

Les MPs sont des fragments (0,1 à 1 µm) de membrane des cellules dont elles dérivent. Les PMPs sont donc des fragments de membrane plaquettaire libérés lors de l'activation plaquettaire ou de l'apoptose mégacaryocytaire. Par leur mécanisme de production, elles sont riches en phosphatidylsérine et expriment à leur surface des antigènes propres aux cellules dont elles dérivent tel le CD41 pour les PMPs. Elles expriment de plus des antigènes liés au mécanisme ou au contexte de production, comme le CD62P pour les PMPs dérivant de plaquettes activées (85).

Le dénombrement des MPs dans notre travail était réalisé par cytométrie en flux. Cette technique permet l'analyse des cellules et des MPs en suspension dans un liquide les entraînant une à une vers un faisceau laser. La détection de la dispersion de la lumière (scattering) et de la fluorescence émise permet une analyse simultanée des caractéristiques physiques et de la composition antigénique. C'est

donc une technique adaptée à notre problématique puisqu'elle permet l'identification des MPs, par leur taille ainsi que par l'étude de l'expression de leurs antigènes membranaires, et leur dénombrement (157).

Au laboratoire de l'hôpital St-Philibert (GHICL), le cytomètre est un Cytomics FC500 de chez Beckman Coulter®. Afin de mesurer au mieux les MPs et d'obtenir des résultats fiables et reproductibles, notre protocole technique s'inspire du protocole standardisé recommandé par Robert et coll. en 2009 (157). Pour le cytomètre FC500, la limite inférieure de détection recommandée par Robert est de 0,5 μm afin de ne pas prendre en compte le bruit de fond de l'appareil.

d) Propreté du cytomètre

La taille des MPs (0,1 à 1 μm) les rend difficiles à discriminer des impuretés qui polluent une de nos principales fenêtres d'analyse (taille/structure). Pour cette raison le cytomètre doit être le plus propre possible. Avant chaque série d'analyses, la propreté est vérifiée par réalisation d'un blanc échantillon : analyse d'un tube contenant 0,5 à 1 mL d'eau stérile, selon les mêmes réglages que nos mesures de MPs. Au bout d'une minute d'acquisition, la moyenne du nombre d'évènements par seconde doit être inférieure à 5. Si ce n'est pas le cas, la procédure peut être répétée jusqu'à 3 fois. En cas d'échec au bout de ces 3 fois, une procédure de nettoyage à l'éthanol dilué à 50 % doit être réalisée.

e) Contrôle de la zone d'analyse

Le réglage initial puis le contrôle avant chaque série des zones d'analyse des MPs se font à l'aide d'un mélange de billes fluorescentes calibrées en concentration et en taille. Notre réactif est le Megamix® de chez BioCytex, il contient des billes de 0,5 et 0,9 μm calibrées en concentration (2 billes 0,5 μm pour 1 bille 0,9 μm)

permettant d'encadrer la fenêtre d'analyse des MPs, ainsi que des billes de 3 μm permettant de repérer la zone de localisation des plaquettes.

Des contrôles de la bonne position des zones d'analyse et de la bonne répartition des différentes billes étaient réalisés avant chaque série par analyse d'un échantillon d'environ 0,5 mL de Megamix® (Figure 23).

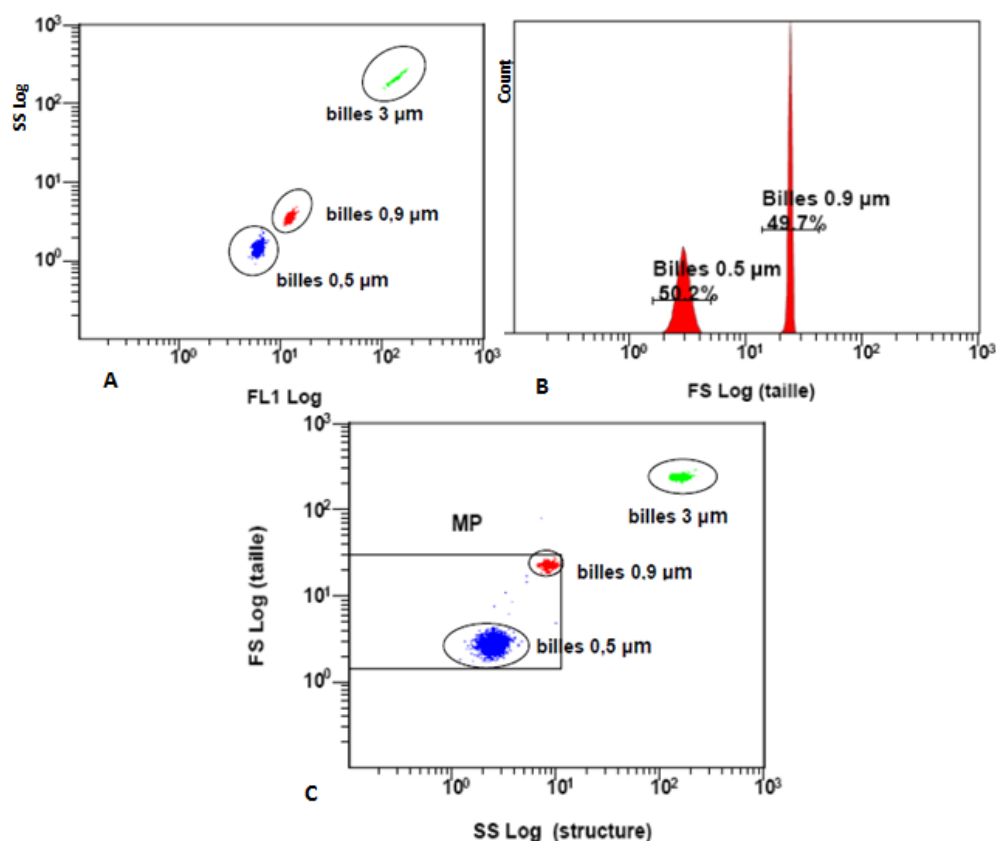


Figure 23 : Contrôle de la répartition des 3 catégories (billes 3 μm , billes 0,9 μm , billes 0,5 μm) de billes du Megamix® selon (A) leur structure et leur intensité de fluorescence en FL1, (B) leur taille (le pourcentage de billes 0,5 μm doit être compris entre 48 et 52 %), (C) leur taille et leur structure. La fenêtre d'analyse des MPs doit englober et être tangente aux nuages des billes de 0,5 μm et 0,9 μm .

La première étape consistait à contrôler la bonne position des billes Megamix® sur le graphique FL1 log x Side Scatter (SS) Log, en position FL=1. Les différentes billes devaient être bien séparées les unes des autres et doivent se situer dans les zones préalablement définies par leur intensité de fluorescence. La compensation en FL1 ou en SS peut aider au bon réglage du cytomètre pour cette étape (Figure 23 A).

La deuxième étape de contrôle concernait l'histogramme Forward Scatter (FS) Log x Count conditionné sur les billes de 0,5 et 0,9 μm , en position FS = 1. Seules les billes de 0,5 μm et 0,9 μm étaient représentées sur cet histogramme. Le pourcentage de billes de 0,5 μm devait être compris entre 48 et 52 %, et les deux populations de billes devaient être suffisamment discriminées (l'existence d'une vallée entre les deux pics permet de s'assurer de cette bonne discrimination). Le respect de ces consignes permettait le meilleur compromis entre la bonne détection des MPs et la détection du bruit de fond (Figure 23 B).

La troisième étape concernait le graphique SS Log x FS Log, sur lequel la fenêtre d'analyse des MPs devait englober et être tangente aux nuages billes de 0,5 μm et billes de 0,9 μm . La zone définie par les billes de 3 μm ne devait pas être englobée dans la fenêtre MPs, puisqu'elle correspond à la zone des plaquettes (Figure 23 C).

f) Marquage des MPs

Les principales étapes de marquage des MPs sont résumées dans la Figure 24.

Les aliquots de PFP étaient décongelés au bain-marie à 37 °C. 30 μL de PFP étaient ajoutés aux anticorps couplés aux fluorochromes préalablement déposés au fond d'un tube à cytométrie. Chaque catégorie de MPs était marquée selon une combinaison différente d'anticorps (Tableau 11). Une incubation de 30 min à température ambiante était nécessaire afin de permettre la fixation des anticorps sur leur cible antigénique. Nos anticorps étaient l'annexine V-FITC (fixée par les MPs sans spécificité associée à une origine), le CD62P-PE (fixé par les MPs exprimant la P-sélectine), le CD235a-PE (fixé par les MPs dérivant d'hématies), le CD41-PC7

(fixé par les MPs dérivant de plaquettes) et le CD144-PE (fixé par les MPs dérivant de cellules endothéliales), tous de la société Beckman Coulter®.

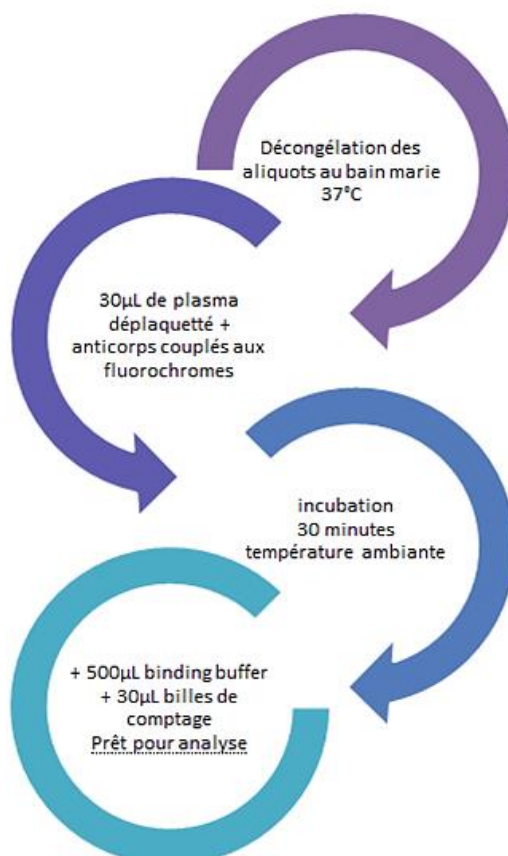


Figure 24 : Protocole analytique de marquage pour le dénombrement des microparticules avant passage sur le cytomètre.

Tableau 11 : Anticorps, fluorochromes et volumes des différents marquages de MPs réalisés.

Fluorochromes	FITC	PE	PC7	MPs détectées
Tube 1	Annexine V	CD144	CD41	EMPs
Volume	1 µL	10 µL	5 µL	
Tube 2	Annexine V	CD62P	CD41	MPs exprimant la P-selectine, PMPs
Volume	1 µL	10 µL	5 µL	
Tube 3	Annexine V	CD235a	CD41	HeMPs
Volume	1 µL	10 µL	5 µL	
MPs : microparticules, EMPs : microparticules dérivant de cellules endothéliales, PMPs : microparticules plaquettaires, HeMPs : microparticules dérivant d'hématies				

Après la période d'incubation, 500 μ L de *binding buffer* étaient ajoutés au mélange PFP-anticorps, auxquels étaient ensuite rajoutés 30 μ L de billes de comptage de type Flow-count™ dont la concentration est connue.

Le *binding buffer* est une solution polyionique dont le principal intérêt est de favoriser le marquage de la phosphatidylsérine par l'Annexine V. Les billes fluorosphères Flow-Count™ sont une suspension de billes fluorescentes permettant de déterminer des valeurs absolues en cytométrie en flux. Chaque bille émet à longueur d'onde entre 525 nm et 700 nm lorsque la longueur d'onde du laser d'excitation est de 488 nm. Elles sont de taille et de fluorescence uniformes, et calibrées en concentration.

g) Analyse sur le cytomètre

L'acquisition sur le cytomètre devait être réalisée pendant 60 secondes, à vitesse lente. Les différents anticorps et le réglage au préalable des zones d'intérêt du cytomètre permettaient d'identifier plusieurs populations de MPs : les MPs Annexine V+, dites MPs totales, les PMPs (Annexine V+, CD41+), les PMPs coexprimant la P-selectine, les MPs issues de cellules endothéliales (EMPs), et les MPs issues d'hématies (HeMPs).

Le calcul de la concentration en MPs dans l'échantillon se faisait grâce aux billes de comptage de type FlowCount™, dont le volume utilisé pour l'analyse et la concentration étaient connus. Les volumes d'échantillon patient (de PFP) et de billes de comptage devaient être similaires. La formule permettant le calcul de la concentration en billes est décrite ci-dessous :

Concentration en MPs

$$= \frac{(\text{nombre d'évènements MPs} \times \text{concentration en billes de comptage})}{\text{nombre de billes comptées}}$$

V. Précisions propres au travail sur la comparaison des deux cytomètres

L'acquisition d'un nouveau cytomètre (Navios, Beckman Coulter®) au cours de notre projet nous a permis de travailler sur la comparaison des performances des deux cytomètres lors d'un travail réalisé en parallèle du projet principal.

40 prélèvements sélectionnés aléatoirement parmi les échantillons utilisés pour notre étude ont été analysés en parallèle sur les deux cytomètres. Pour ce travail, seule la comparaison des PMPs a été simultanément réalisée sur les deux cytomètres (Figure 25).

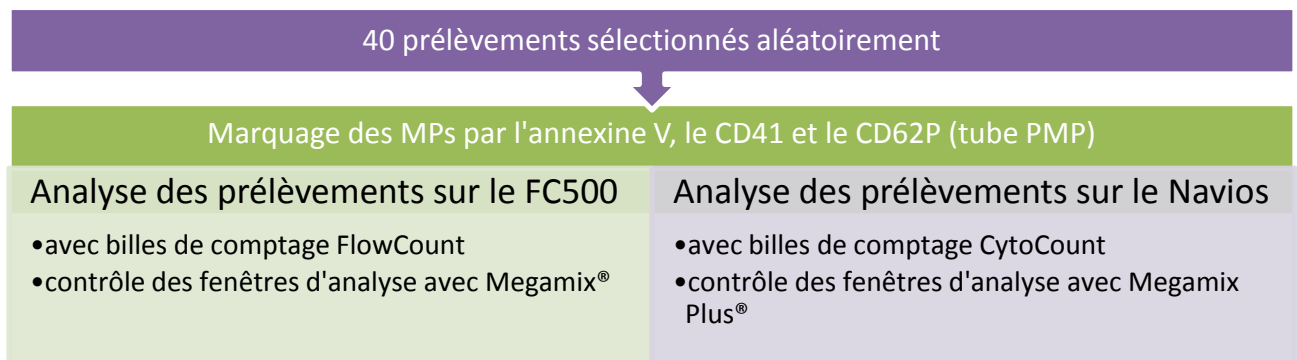


Figure 25 : Protocole simplifié de comparaison des deux cytomètres (FC 500 et Navios).

Pour le passage sur le Cytomics FC500, Beckman Coulter®, le protocole d'analyse était similaire à celui décrit précédemment lors de la mesure des MPs pour leur étude cinétique.

Pour le passage sur le Navios (Beckman Coulter®) nous avons choisi après étude de la bibliographie (158) de respecter les recommandations faites par le fournisseur afin d'optimiser les performances de l'appareil : ceci impliquait un changement de deux réactifs définis ci-après. Les volumes et le reste du protocole technique étaient identiques au protocole utilisé pour le dénombrement sur le FC500.

Pour le réglage des zones d'analyse du cytomètre, nous avons choisi d'utiliser le Megamix Plus FSC® contenant un mélange de 4 billes calibrées en concentration et en taille (0,1 µm, 0,3 µm, 0,5 µm, 0,9 µm) (159).

Le ratio numérique intrinsèque de 2 : 1 entre la population de billes de 0,3 µm et celle de 0,5 µm permettait le réglage fin du seuil FS. La présence de billes supplémentaires de 0,1 µm permettait d'affiner les réglages et donc la sensibilité du cytomètre, et la présence de billes de 0,3 µm permettait la mesure de MPs de plus petite taille (de 0,3 à 1 µm). Les billes de 0,9 µm correspondaient à la limite haute de la fenêtre d'analyse des MPs.

Le contrôle des réglages du cytomètre par le Megamix Plus® consistait à vérifier, sur le cytogramme FL1 Log x SS Log, avec pour FL1 seuil = 1, que les quatre populations majoritaires de billes se situaient bien dans leurs régions précédemment positionnées, et que les doublets ne contaminaient pas ces régions (régions A, B, C, D, Figure 26).

Sur l'histogramme FS Log x Count conditionné sur les billes de 0,3, 0,5 et 0,9 µm, nous devions vérifier que 3 pics individuels pouvaient bien être discriminés. Un chevauchement des pics pouvait suggérer une trop faible résolution en FS (Figure 27 A).

Sur un deuxième histogramme FS Log x Count conditionné sur les billes de 0,3 et 0,5 μm , nous devons vérifier la bonne répartition des billes (environ 2 billes 0,3 μm pour 1 bille 0,5 μm). Cela correspondait donc à des pourcentages d'environ 68 % de billes 0,3 μm (63 à 73 %) et environ 32 % de billes 0,5 μm (Figure 27 B). Sur ce même histogramme, avec FS = 10, les billes de 0,3 μm devaient représenter 48 à 52 % des billes.

Un histogramme FS Log x SS Log permettait de définir la zone d'analyse des MPs. La partie inférieure de la zone d'analyse correspondait au seuil fixé de 0,3 μm et était représentée par l'emplacement des billes mesurant 0,3 μm . La partie supérieure de la zone d'analyse était définie par l'emplacement des billes de 0,9 μm . Les billes de 0,5 μm se trouvaient au milieu de la zone d'analyse et permettaient de séparer les petites MPs des grandes MPs (Figure 28).

Nous avons utilisé comme billes de comptage les billes CytoCount™ de chez Dako, en effet celles-ci mesurent 5,2 μm de diamètre et sont de taille inférieure aux billes FlowCount™. Les billes CytoCount™ sont excitées à 488 nm et leur émission lumineuse se situe entre 530 et 700 nm.

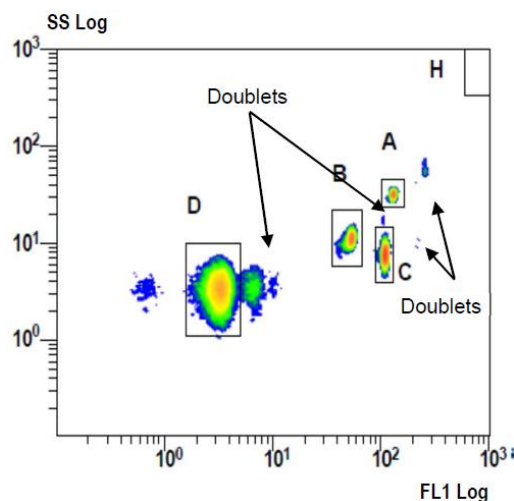


Figure 26 : Répartition des 4 catégories de billes du mélange Megamix Plus® selon leur structure et leur intensité de fluorescence
(billes A : 0,9 μm , billes B : 0,5 μm , billes C : 0,3 μm , billes D : 0,1 μm).

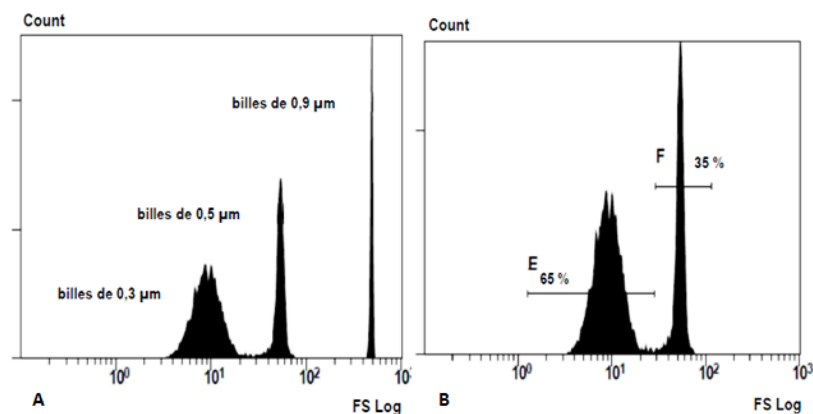


Figure 27 : Répartition des billes de 0,3 μm , 0,5 μm et 0,9 μm du Megamix Plus® selon leur taille.
A : La résolution du cytomètre permet une bonne discrimination de trois pics individuels correspondant à ces 3 types de billes.
B : Les réglages du cytomètre permettent d'obtenir des fractions des billes de 0,3 μm (E) et des billes de 0,5 μm (F) conformes aux recommandations fournisseur.

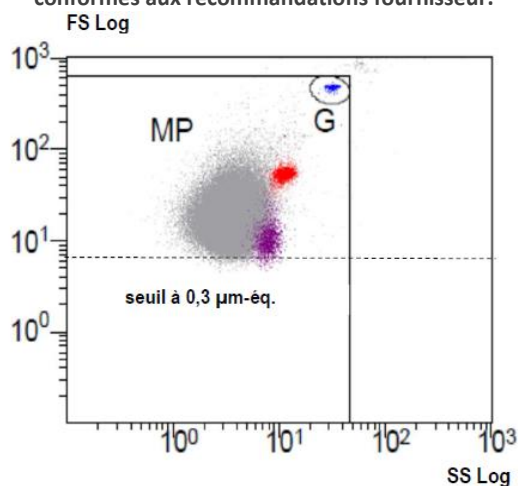


Figure 28 : Définition de la zone d'analyse des MPs sur le Navios à l'aide des billes Megamix Plus®.
La partie inférieure de la zone d'analyse correspond à l'emplacement des billes mesurant 0,3 μm (en violet). La partie supérieure est définie par l'emplacement des billes de 0,9 μm (en bleu). Les billes de 0,5 μm (en rouge) correspondent à la zone de séparation des petites MPs et des grandes MPs.

VI. Analyses statistiques

Les analyses statistiques étaient réalisées à l'aide du logiciel SAS[®] (SAS Institute version 9.4, Cary, NC, USA).

Les paramètres qualitatifs étaient décrits par les effectifs et pourcentages. Les paramètres quantitatifs étaient exprimés en médiane [intervalle interquartile] ou moyenne +/- écart-type selon la distribution observée. Le caractère gaussien des distributions des différentes variables était contrôlé par le test de Shapiro-Wilk.

Les comparaisons entre les différentes populations étaient réalisées par l'intermédiaire des tests de Student pour les variables quantitatives, après vérification de l'homogénéité des variances par le test de Levène. En cas de comparaison de plus de 2 groupes, les variables quantitatives étaient comparées par un test d'ANOVA ou de Kruskal-Wallis (selon la distribution de chaque groupe), suivi de comparaisons multiples par les tests post-hoc de Tukey ou de Dunn. Les variables qualitatives étaient comparées par le test d'homogénéité du CHI² ou de Fisher en cas d'effectifs théoriques insuffisants.

La concentration en PMPs au diagnostic sur l'ensemble de la population était étudiée par un modèle de régression linéaire par l'intermédiaire de la PROC MIXED dans SAS, dans le but d'estimer les différences entre les groupes de patients et de témoins après ajustement sur de potentiels facteurs confondants. La variable dépendante était log-transformée en cas de distribution non-normale sur l'ensemble de la population avec pour conséquence l'expression des effets estimés en pourcentage d'augmentation de la variable réponse par unité de la covariable. Après réalisation d'analyses univariées avec vérification de la linéarité de la relation pour

les variables continues, un modèle multivarié était construit à partir des variables ayant une p-value $<0,20$ en univarié.

L'évolution des concentrations de PMPs au cours du temps a été étudiée par l'intermédiaire de modèles d'ANOVA ou de Kruskal-Wallis (selon la distribution de chaque groupe), suivi de comparaisons multiples par les tests post-hoc de Tukey ou de Dunn avec prise en compte des données répétées. Étaient testés les effets de l'initiation ou non d'un traitement cytoréducteur dans un premier temps, puis, parmi les patients traités, de l'apparition ou non d'une réponse au traitement.

Les facteurs prédictifs de réponse au traitement cytoréducteur étaient recherchés par régression logistique, en utilisant la méthode du maximum de vraisemblance ajusté selon Firth pour les échantillons de petite taille. L'hypothèse de linéarité était systématiquement contrôlée pour les variables continues qui étaient dichotomisées sur la médiane de la distribution générale en cas de non-respect de cette hypothèse. Concernant la variable « concentration de PMPs », le seuil le plus pertinent était exploré par construction de courbes ROC, avec recherche du seuil maximisant la sensibilité et la spécificité selon la formule de Youden (sensibilité + spécificité – 100 %). Après réalisation des analyses univariées pour chaque variable, les variables pour lesquelles la p-value était $<0,20$ étaient incluses dans le modèle multivarié. En tant que variable d'intérêt, la concentration en PMPs était forcément incluse dans le modèle.

L'étude des performances du nouveau cytomètre Navios de la société Beckman Coulter® par rapport à l'automate FC500 a été conduite comme une comparaison de deux méthodes analytiques pour le dosage des PMPs. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel Medcalc® version 16.8.4. Les

concentrations mesurées sur les échantillons par les deux cytomètres ont été comparées par des tests de Student pour données répétées. Une régression linéaire de type Deming tenant compte de la variabilité potentielle de mesure des deux automates a été réalisée avec estimation de la pente et de l'ordonnée à l'origine pour les concentrations mesurées avec le nouveau cytomètre par rapport à l'ancien. Le coefficient de corrélation de Pearson et le coefficient de concordance de Lin ont été estimés (160). Des représentations de Bland-et-Altman ont permis d'analyser la distribution des différences et des pourcentages de différences entre les deux mesures en fonction de leur moyenne, à la recherche de biais de mesure systématiques ou proportionnels (161).

Pour l'ensemble des analyses réalisées, le niveau de significativité était fixé à $p = 0,05$.

RESULTATS

I. Populations

a) Inclusion et diagramme de flux

Au total, 60 patients atteints de néoplasie myéloproliférative et 40 témoins ont été inclus. Parmi ces patients, 22 (37 %) étaient atteints de Polyglobulie de Vaquez et 38 (63 %) étaient atteints de Thrombocytémie Essentielle. La totalité des 22 patients atteints de PV ont pu bénéficier d'un traitement cytoréducteur, alors que seuls 28 patients du groupe TE (74 %) ont pu en bénéficier (Figure 29). La totalité des patients ayant bénéficié d'un traitement cytoréducteur a reçu en première ligne de l'hydroxyurée.

Parmi les patients traités, 11 PV (50 %) et 15 TE (54 %) étaient mis en réponse partielle tandis que 9 PV (41 %) et 13 TE (46 %) étaient en échec thérapeutique. Pour 2 patients atteints de PV, l'absence d'un suivi régulier nous a empêchés d'évaluer la réponse au traitement.

Nous avons distingué 3 sous-groupes parmi nos patients en échec thérapeutique. 4 patients étaient en situation de persistance de signes cliniques (tels que céphalées, vertiges, acouphènes, érythromélgies, organomégalies, prurit...), 7 patients présentaient des signes de progression (hémorragies, thromboses, transformation leucémique ou transformation en myélofibrose) et 11 patients présentaient une « non réponse biologique » avec un hémogramme ne répondant pas aux exigences que nous nous sommes imposées en faisant le choix de respecter les critères de réponse au traitement proposés par Barosi.

Ces données sont présentées dans la Figure 29.

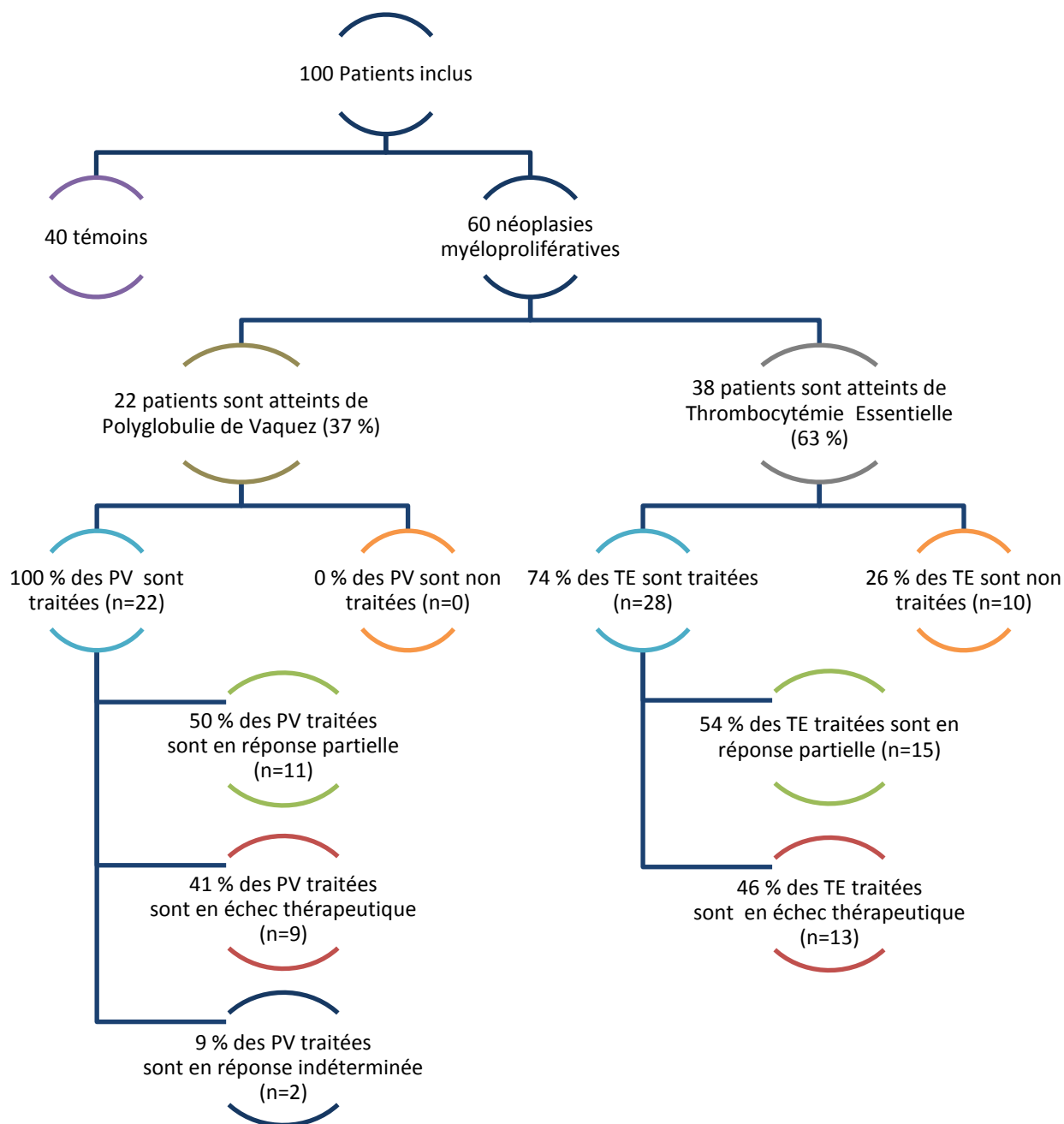


Figure 29 : Diagramme descriptif de la population totale analysée.
PV = Polyglobulie de Vaquez, TE = Thrombocytemie Essentielle

b) Caractéristiques clinico-biologiques des populations au diagnostic.

L'âge moyen des 3 groupes PV, TE et témoins était significativement différent, avec un âge supérieur chez les 2 groupes de patients par rapport aux

témoins ; 61,5 +/- 17,1 années pour les TE, 66,0 +/- 13,3 années pour les PV et 46,0 +/- 12,0 années pour les témoins ($p < 0,001$). Il n'existait pas de différence en matière de sexe ratio (en pourcentages de sexe féminin respectivement 71 %, 50 %, 70 %, $p = 0,199$).

Les 3 groupes différaient en matière de valeurs moyennes de leucocytes, augmentées chez les deux groupes de patients par rapport aux témoins (8,3 G/L pour les PV, 9,8 G/L pour les TE, 6,9 G/L pour les témoins, $p < 0,001$ pour PV ou TE versus témoins). Les groupes différaient également en valeur moyenne de plaquettes, plus élevées dans les TE que les PV, et plus élevées chez les patients que chez les témoins (731 G/L pour les TE, 491 G/L pour les PV, 246 G/L pour les témoins, $p < 0,001$ pour PV ou TE versus témoins et $p < 0,001$ pour TE versus PV). La valeur moyenne d'hématocrite différait également selon nos groupes, plus élevée cette fois chez les PV par rapport aux TE ou aux témoins (42,9 % pour les TE, 51,7 % pour les PV, 42,8 % pour les témoins, $p < 0,001$ pour PV versus TE ou témoins).

Dans notre population de TE, 25 patients étaient mutés JAK2^{V617F}, 5 patients étaient mutés CALR, 1 patient était muté MPL et 7 patients étaient « triple négatif » (ne présentaient pas de mutation caractéristique). Dans notre population de PV, 21 patients étaient mutés JAK2^{V617F}. Un seul patient n'avait pas de mutation identifiée (JAK2^{V617F} négatif, mutation de l'exon 12 de JAK2 non recherchée). La fréquence des mutations JAK2^{V617F} était significativement différente entre nos groupes TE et PV, avec une fréquence plus élevée chez les patients atteints de PV (respectivement $n = 25$ (65,8 %) et $n = 21$ (95,5 %), $p = 0,014$).

Ces résultats sont présentés dans le Tableau 12.

Tableau 12 : Analyses descriptives et comparaison des groupes TE, PV et témoins au diagnostic.

	Thrombocytémie Essentielle (n=38)	Polyglobulie de Vaquez (n=22)	Témoins (n=40)	p-values*
Âge années	61,5 +/- 17,1	66,0 +/- 13,3	46,0 +/- 12,0	<0,001
Sexe féminin (n, %)	27 (71,1 %)	11 (50 %)	28 (70 %)	0,199
Mutation JAK2^{V617F} (n, %)	25 (65,8 %)	21 (95,5 %)	n.e.	n.e.
Mutation JAK2(exon 12) (n, %)	0 (0 %)	0 (0 %)	n.e.	n.e.
Mutation MPL (n, %)	1 (2,7 %)	0 (0 %)	n.e.	n.e.
Mutation CALR (n, %)	5 (13,5 %)	0 (0 %)	n.e.	n.e.
Aspirine (n, %)	32 (84,2 %)	18 (81,8 %)	0 (0 %)	n.e.
Traitement hypolipémiant (n, %)	10 (26,3 %)	4 (18,2 %)	0 (0 %)	n.e.
Antécédent de néoplasie (n, %)	4 (10,5 %)	3 (13,6 %)	0 (0 %)	n.e.
Diabète (n, %)	3 (7,9 %)	1 (4,6 %)	0 (0 %)	n.e.
HTA (n, %)	19 (51,4 %)	12 (54,6 %)	1 (5,6 %)	n.e.
Dyslipidémie (n, %)	16 (42,1 %)	7 (33,3 %)	0 (0 %)	n.e.
Tabac (n, %)	8 (21,1 %)	5 (22,7 %)	1 (8,3 %)	n.e.
Antécédent de thrombose (n, %)	10 (26,3 %)	5 (22,7 %)	0 (0 %)	n.e.
Leucocytes G/L	8,3 [7,4-9,8]	9,8 [7,4-14,3]	6,9 [5,7-8,1]	<0,001
Plaquettes G/L	730,5 [587-890]	490,5 [399-655]	245,5 [216-303]	<0,001
Hémoglobine g/dL	14,2 +/- 1,4	16,9 +/- 1,6	14,3 +/- 1,1	<0,001
Hématocrite %	42,9 +/- 3,5	51,7 +/- 4,4	42,6 +/- 2,8	<0,001
Traitement cytoréducteur (n, %)	28 (73,7 %)	22 (100 %)	n.e.	n.e.
Réponse partielle à 6-12 mois (n, %)	15 (39,5 %)	11 (50 %)	n.e.	n.e.
n.e. = non évalué * : les p-values représentées sont celles de l'ANOVA, les p-values ajustées des comparaisons multiples sont disponibles dans le texte. Les résultats des concentrations en leucocytes et plaquettes sont exprimés en médianes et intervalles interquartiles, les résultats de la concentration en hémoglobine et de l'hématocrite sont exprimés en moyenne +/- écart-type.				

II. Concentrations en MPs au diagnostic

a) Selon les groupes PV, TE et témoins

Pour rappel, toutes les comparaisons de concentrations de MPs sont exprimées en médiane et intervalles interquartiles.

Au diagnostic, il existait des différences de concentrations de MPs totales. Celles-ci étaient plus élevées chez les patients que chez les témoins (respectivement pour les groupes TE, PV, témoins ; 4074/ μ L [1689-6595], 3417/ μ L [2150-4526], 624/ μ L [380-928], $p < 0,0001$ pour PV ou TE versus témoins).

Il existait également au diagnostic des différences des valeurs de PMPs entre patients atteints de TE ou PV par rapport à notre population de témoins, avec des PMPs plus élevées chez les patients que chez les témoins. Les médianes de concentrations de PMPs étaient de 3319/ μ L [1392-6054] pour les TE ; 2459/ μ L [1567-3794] pour les PV ; 335/ μ L [247-657] pour les témoins, $p < 0,0001$ pour TE ou PV versus témoins et $p > 0,999$ pour PV versus TE.

Au diagnostic, nous observons des différences de concentrations en PMPs exprimant la P-selectine (les médianes étaient respectivement de 414/ μ L [212-686], 431/ μ L [191-1460], 83/ μ L [33-116], $p < 0,0001$ pour PV ou TE versus témoins), soit plus élevées chez les patients que chez les témoins.

Des différences existaient également à propos des concentrations de MPs issues des hématies (HeMP) ; les médianes étaient respectivement pour les groupes TE, PV et témoins de 195/ μ L [84-245], 175/ μ L [102-294], 78/ μ L [46-133], $p = 0,013$ pour TE versus témoins, $p = 0,006$ pour PV versus témoins, $p > 0,999$ pour PV versus TE. Les HeMPs étaient donc plus élevées chez les patients que chez les témoins.

Ces résultats sont présentés dans le Tableau 13 et la Figure 30.

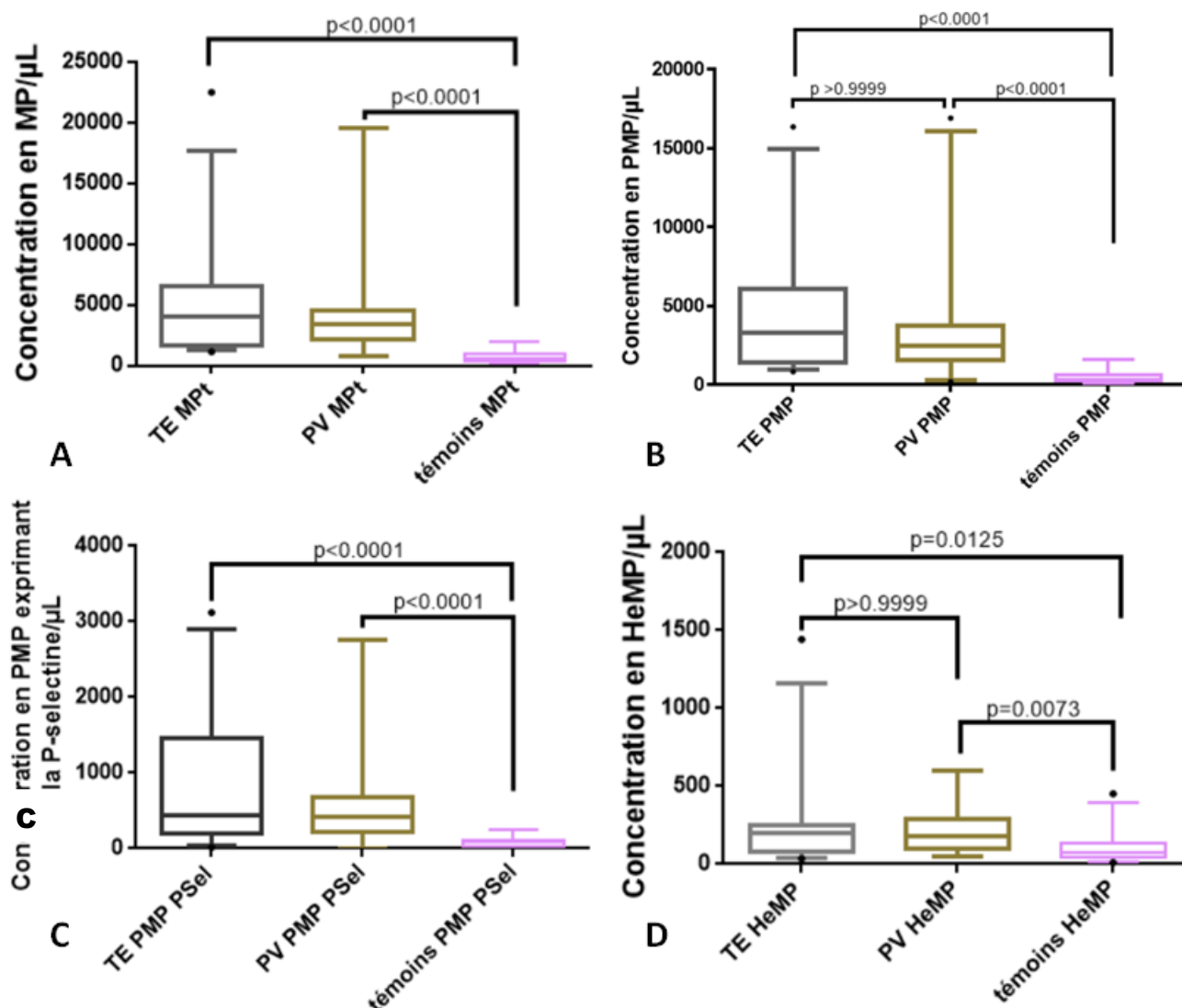


Figure 30 : Représentations graphiques en boîtes à moustaches des concentrations plasmatiques au diagnostic (A) en MPs totales (MPT), (B) en PMPs, (C) en PMPs exprimant la P-selectine, (D) en HeMP des groupes TE, PV et témoins. Les boîtes sont construites par la médiane et l'intervalle interquartile, les moustaches représentent 95 % des valeurs de la population.

Tableau 13 : Comparaisons des concentrations des différents types de MPs plasmatiques selon les groupes TE, PV et témoins, au diagnostic, avant traitement cytoréducteur.

	TE n=38	PV n=22	Témoins n=40	p-value* TE versus témoins	p-value* PV versus témoins	p-value* TE versus PV
MPt /μL	4074 [1689-6595]	3417 [2150-4526]	624 [380-928]	<0,0001	<0,0001	>0,999
PMP /μL	3319 [1392-6054]	2459 [1567-3794]	335 [247-657]	<0,0001	<0,0001	>0,999
HeMP /μL	195 [84-245]	175 [102-294]	78 [46-133]	0,013	0,007	>0,999
PMP Psel /μL	431 [191-1460]	414 [212-686]	83 [33-116]	<0,0001	<0,0001	>0,999
PMP : microparticules plaquettaires, MPt : microparticules totales, HeMP : microparticules issues d'hématies, PMP Psel : microparticules plaquettaires exprimant la P-selectine * Les p-values ont été obtenues par tests post-hoc, après ajustement du risque alpha selon le nombre de comparaisons.						

Dans la suite de notre travail et en raison de l'absence de différence en concentrations de PMPs entre nos groupes PV et TE, nous avons fait le choix de regrouper nos patients atteints de PV et TE dans un seul groupe de malades atteints de NMP.

b) Modélisation des concentrations en PMP au diagnostic selon les groupes NMP et témoins

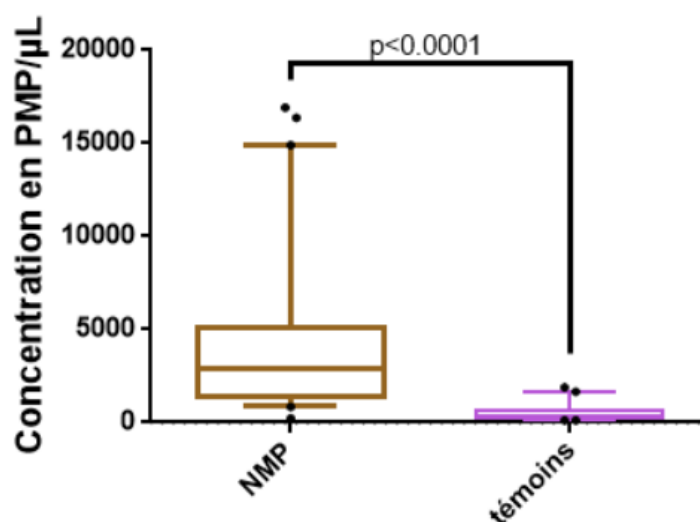


Figure 31 : Représentation graphique en boîtes à moustaches des concentrations plasmatiques en PMPs au diagnostic en fonction des groupes NMP et témoins.

Les boîtes sont construites par la médiane et l'intervalle interquartile, les moustaches représentent 95 % des valeurs de la population.

Suite au regroupement, il persistait une différence significative de concentrations en PMPs au diagnostic entre le groupe NMP (regroupant PV et TE) et le groupe témoins, respectivement 2922/ μ L [1439–5054] et 335/ μ L [247–657], $p < 0,0001$. Ces résultats sont représentés Figure 31.

Afin de déterminer si la différence observée n'était pas liée à un déséquilibre entre les 2 groupes, des analyses univariées puis multivariées ont été réalisées pour modéliser la variable « taux de PMP/ μ L au diagnostic ». Cette dernière était log-transformée afin de satisfaire aux hypothèses inhérentes au modèle, avec pour conséquence l'expression des effets estimés en pourcentage d'augmentation de la variable réponse par unité de la covariable. Les différentes covariables pouvant interférer (âge, concentration en plaquettes, concentration en leucocytes, présence d'une NMP, concentration en hémoglobine) étaient testées en analyses univariées, dichotomisées en cas de non-respect de l'hypothèse de linéarité, et incluses dans un modèle multivarié si leur p-value était $< 0,20$.

En analyse univariée, il existait un effet significatif de l'âge et de la concentration en plaquettes ($p < 0,0001$ pour les deux). La concentration en leucocytes était proche de la significativité ($p = 0,069$) (Tableau 14).

Il persistait en modèle multivarié un effet significatif de la présence d'une NMP ($p < 0,0001$) sur les concentrations en PMPs malgré l'ajustement sur les 3 covariables précédemment citées. Il n'existait donc pas d'interférence de l'âge, des valeurs de leucocytes et des valeurs de plaquettes dans nos résultats (Tableau 14).

Tableau 14 : Modèle de régression linéaire : comparaison des concentrations en PMPs au diagnostic selon une analyse
 (A) univariée selon l'âge, la présence d'une NMP, les leucocytes, les plaquettes ;
 (B) multivariée selon les mêmes variables, seule la présence d'une NMP reste significative.

A	UNIVARIÉE	Pourcentage d'augmentation des PMPs par unité de variable	Intervalle de confiance à 95%	p-value
	Présence d'une NMP	+ 188,9 %	[155,2 ; 222,6]	<0,0001
	Âge (par an)	+ 2,9 %	[1,5 ; 4,3]	<0,0001
	Leucocytes >8,5 G/L	+ 48,0 %	[-3,7 ; 99,8]	0,069
	Plaquettes >500 G/L	+ 150,4 %	[108,8 ; 192,0]	<0,0001

B	MULTIVARIÉE	Pourcentage d'augmentation des PMPs par unité de variable	Intervalle de confiance à 95%	p-value
	Présence d'une NMP	+ 181,7 %	[120,4 ; 242,9]	<0,0001
	Âge (par an)	+ 0,02 %	[-1,2 ; 1,2]	0,979
	Leucocytes >8,5 G/L	- 18,1 %	[-56,0 ; 19,9]	0,347
	Plaquettes >500 G/L	+ 25,4 %	[-28,8 ; 79,5]	0,355

III. Évolution des concentrations en PMPs au cours du traitement cytoréducteur.

Notre objectif était d'étudier l'effet de la mise sous traitement cytoréducteur sur la concentration des PMPs.

a) Populations

60 patients étaient atteints de NMP et étaient répartis en 2 groupes : patients traités par traitement cytoréducteur (Hydrea® en première ligne, Vercyte®, Xagrid®, ou interféron en deuxième ligne), et patients ne bénéficiant pas d'un traitement cytoréducteur (Aspirine seule, saignées au diagnostic, autres cas). Tous les patients ayant bénéficié d'un traitement cytoréducteur ont reçu de l'hydroxyurée en première ligne, notre population traitée constituait donc un groupe homogène en matière de traitement cytoréducteur.

Nous n'avons pas distingué les patients atteints de PV des patients atteints de TE dans chaque groupe afin de garder des effectifs suffisants : 50 patients (83 %) ont reçu un traitement cytoréducteur, contre seulement 10 patients (17 %) non traités dans notre étude. Ces derniers étaient tous atteints de TE (Figure 32).

Pour cela nous avons comparé dans le groupe traité les concentrations de PMPs à T0 (avant tout traitement cytoréducteur) et après 6 mois de traitement cytoréducteur. Nous avons également comparé les concentrations de PMPs à T0 (au diagnostic) et après 6 mois de suivi dans le groupe des patients non traités, qui constituait un groupe de patients « témoins » de l'évolution des PMPs au cours de cette même durée de temps.

Il faut noter également que nos groupes traités et non traités par thérapeutique cytoréductrice étaient comparables en ce qui concernait la présence

d'un traitement antiagrégant plaquettaire ($p>0,999$). À 6 mois tous nos patients non traités par traitement cytoréducteur bénéficiaient d'un traitement antiagrégant plaquettaire, comme la quasi-totalité des patients du groupe « traités » (45 traités par aspirine, 4 par un autre antiagrégant plaquettaire, seul 1 patient n'avait pas d'antiagrégant plaquettaire, car sous AVK et à risque hémorragique élevé).

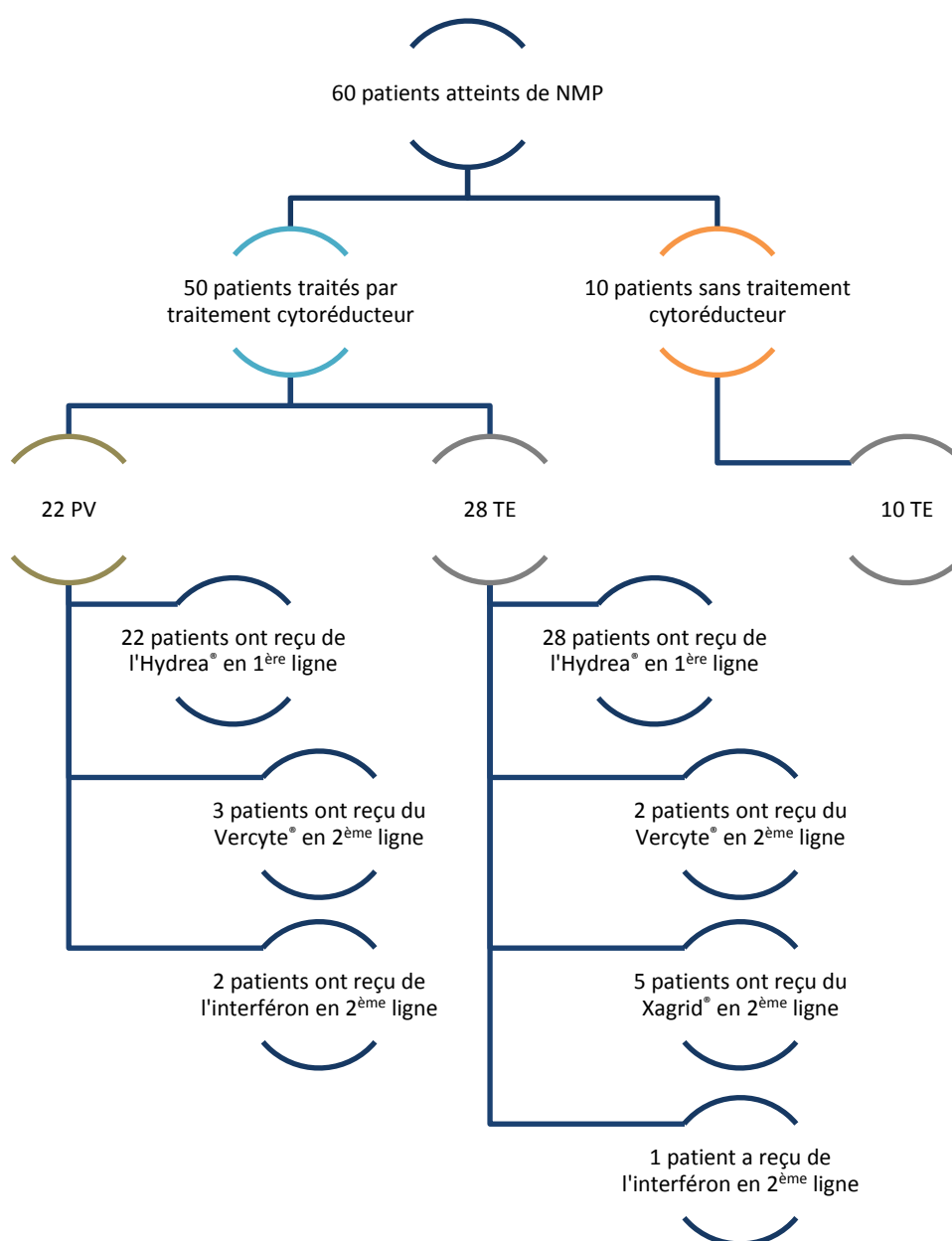


Figure 32 : Diagramme descriptif des patients atteints de NMP selon le traitement cytoréducteur.

b) Évolution des concentrations en PMPs de T0 à T6

À T0, les groupes traités et non traités étaient comparables en matière de concentrations plasmatiques en PMPs (respectivement 2714/ μ L [1422-4419] et 3355/ μ L [2261-4408], $p>0,999$).

Après 6 mois de traitement cytoréducteur, une diminution statistiquement significative des concentrations plasmatiques de PMPs était mise en évidence dans le groupe « traités » (1103/ μ L [595-1764] $p<0,001$), tandis qu'il n'existait pas de diminution des PMPs dans le groupe « non traités » après 6 mois de suivi (3195/ μ L [1311-5099], $p>0,999$) (Figure 33).

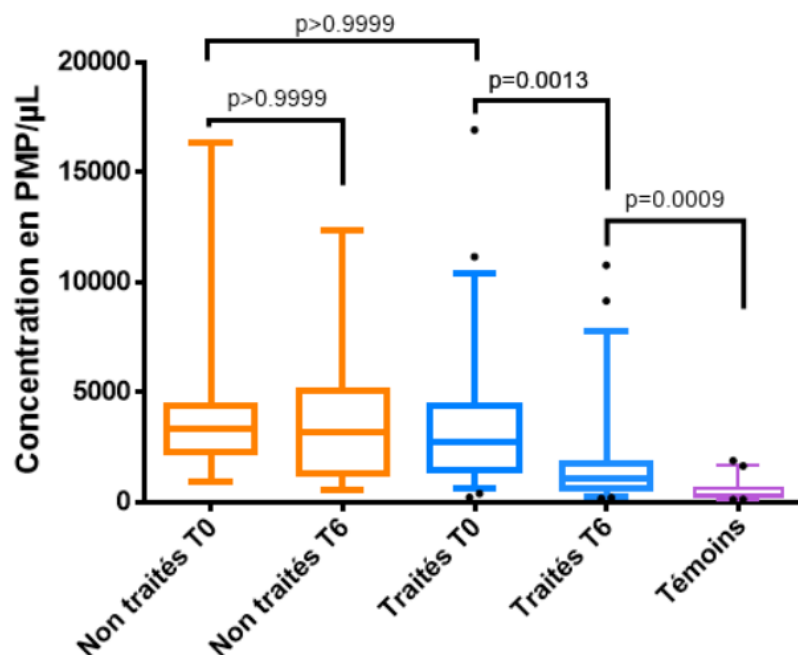


Figure 33 : Représentation graphique en boîtes à moustaches des concentrations en PMPs à T0 et à T6 dans les groupes non traités, traités et témoins.

T0 = avant tout traitement cytoréducteur pour le groupe traité, au diagnostic pour le groupe non traité,

T6 = après 6 mois de suivi ou traitement.

Les boîtes sont construites par la médiane et l'intervalle interquartile, les moustaches représentent 95 % des valeurs de la population.

Il existait également une différence significative entre les concentrations en PMPs dans le groupe « traités » après 6 de mois de traitement et les valeurs de référence de PMPs chez les témoins. En effet, malgré la diminution des PMPs observée après mise sous traitement cytoréducteur chez les patients, les

concentrations en PMPs restaient supérieures aux valeurs de base mesurées chez les témoins sains (respectivement 1103/ μ L [595-1764] et 335/ μ L [246-657], $p < 0,001$) (Figure 33).

c) Évolution des concentrations en PMPs de T0 à T12

Devant ces résultats, nous nous sommes demandés quel était l'effet du traitement cytoréducteur à plus long terme, chez ces mêmes patients, sur les concentrations plasmatiques en PMPs. Selon le même modèle, nous avons décidé d'étudier, en plus des points T0 et T6, la concentration des PMPs au point T12 (12 mois de traitement cytoréducteur) chez nos patients du groupe traité. De la même manière, nous avons étudié le point T12 chez le groupe non traité (correspondant à 12 mois de suivi).

Chez les patients traités à T12, la médiane de la concentration en PMPs plasmatiques était de 917/ μ L [583-2012] tandis qu'elle était de 2482/ μ L [1197-3309] chez les patients non traités. Au total il n'existait pas de différence significative en matière de concentrations en PMPs plasmatiques entre les points T0, T6, et T12 chez les patients ne bénéficiant pas de traitement cytoréducteur. Dans le groupe « traités », il existait une diminution significative entre les points T0 et T6 et entre les points T0 et T12 (respectivement $p = 0,002$ et $p = 0,005$). En revanche, il n'existait pas de différence significative entre les points T6 et T12 du groupe bénéficiant d'un traitement cytoréducteur ($p > 0,9999$). Les concentrations en PMPs plasmatiques à T12 restaient significativement plus élevées que celles du groupe des témoins sains (les concentrations médianes étaient respectivement de 917/ μ L [583-2012] et 335/ μ L [247-657], $p < 0,001$).

Ces résultats sont repris et illustrés dans la Figure 34.

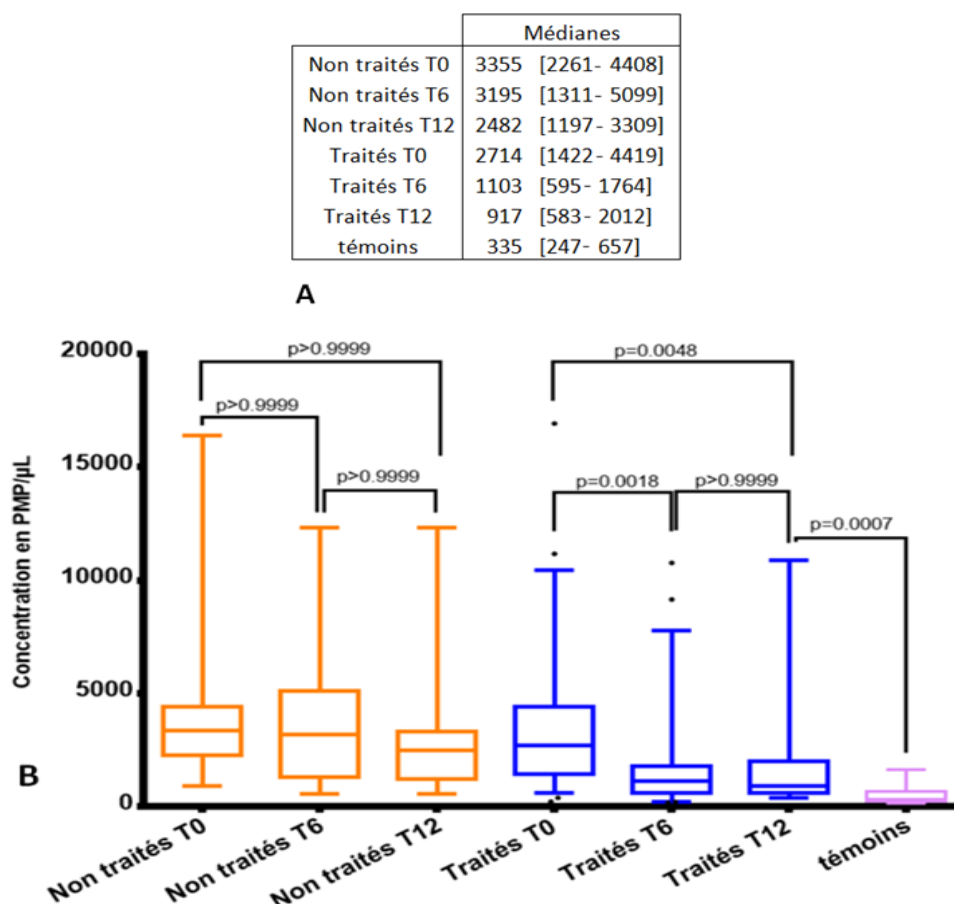


Figure 34 : Comparaison des différences de concentrations plasmatiques en PMPs à T0, T6 et T12 en fonction de la présence ou non d'un traitement cytoréducteur et comparaison avec le taux de base chez les témoins sains.

(A) Tableau récapitulatif des médianes et intervalles interquartiles des concentrations en PMPs plasmatiques dans les différents groupes.

(B) Représentation graphique en boîtes à moustaches de ces comparaisons, avec p-values.

Les boîtes sont construites par la médiane et l'intervalle interquartile, les moustaches représentent 95 % des valeurs de la population.

d) Évolution des PMPs P-selectine négatives de T0 à T6

Afin d'aller plus loin dans la caractérisation des PMPs et de leur diminution sous traitement cytoréducteur bien conduit, nous avons décidé d'étudier les fractions de PMPs P-selectine négatives (PMP Psel-) entre T0 et T6 chez les patients traités.

En effet, d'après les travaux de Flaumenhaft (60), les PMPs ont deux origines : les plaquettes activées et les mégacaryocytes. D'après ces travaux, les PMPs dérivant de plaquettes exprimeraient la P-selectine (PMP Psel+) et représenteraient un compartiment minoritaire, tandis que les PMPs d'origine

mégacaryocytaire seraient majoritaires et n'exprimeraient pas la P-selectine (PMP Psel-). Dans ce contexte, nous avons décidé d'étudier l'évolution des différentes fractions de PMPs (Psel+ et Psel-) entre T0 et T6 chez les patients traités par traitement cytoréducteur.

Cette étude n'a pu être réalisée que sur une sous-population de patients (patients traités n=11), car ce marquage n'avait pas été réalisé chez les premiers patients inclus dans le protocole.

Nous avons pu observer que les proportions de PMPs Psel- (exprimées en pourcentages des PMPs totales) étaient diminuées après 6 mois de traitement. Les médianes étaient respectivement à T0 de 82 % [68,0-88,3], et à T6 de 75,3 % [68,0-88,0], $p>0.999$. Cette différence n'était toutefois pas statistiquement significative.

IV. Évolution des concentrations en PMPs selon la réponse au traitement

Notre démarche a consisté à comparer les cinétiques de diminution des PMPs chez les patients sous traitement cytoréducteur selon leur réponse au traitement.

a) Évolution des concentrations en PMPs de T0 à T6 selon la réponse partielle ou l'échec thérapeutique

Nous avons comparé ces concentrations à T0 (avant tout traitement cytoréducteur) et à T6 (après 6 mois de traitement), dans chacun des deux groupes « réponse partielle » constitué de 26 patients (54 %) et « échec thérapeutique » constitué de 22 patients (46 %).

À T0, nos deux groupes avaient des concentrations similaires en PMPs (2708/ μ L [1097-4737] pour le groupe « réponse partielle » et 2922/ μ L [1685-5054] pour le groupe « échec thérapeutique », $p>0,999$).

Il n'existait pas de différence significative entre les concentrations des PMPs à T0 et à T6 dans notre groupe « échec thérapeutique » (respectivement 2922/ μ L [1685-5054] et 1312/ μ L [714-3421], $p=0,063$).

Il existait en revanche une différence statistiquement significative des concentrations plasmatiques en PMPs à T0 et à T6 dans notre groupe « réponse partielle » (respectivement 2708/ μ L [1097-4737] et 899/ μ L [575-1420], $p<0,001$).

Ces résultats sont présentés dans la Figure 35.

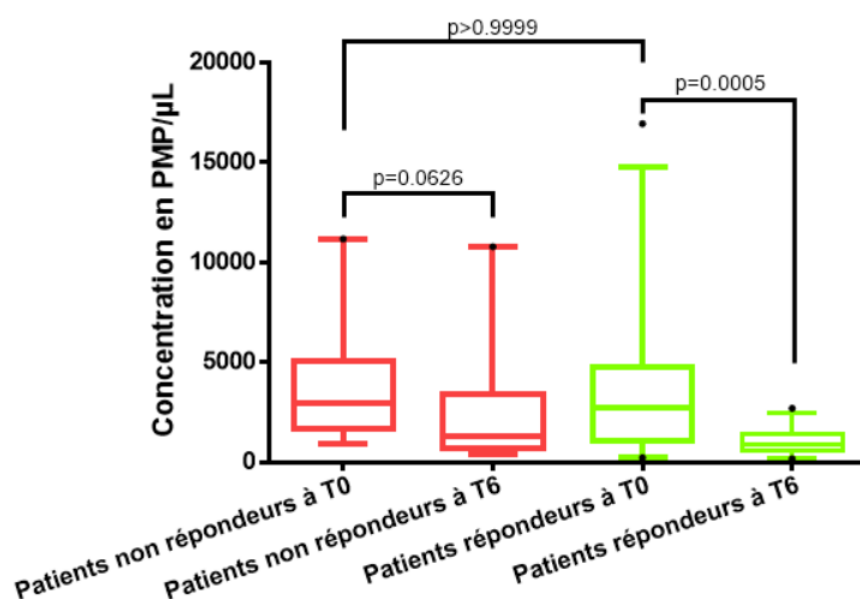


Figure 35 : Représentation graphique en boîtes à moustaches des concentrations en PMPs à T0 et à T6 dans les groupes « échec thérapeutique » et « réponse partielle au traitement cytoréducteur ».

T0 = avant tout traitement cytoréducteur, T6 = après 6 mois de traitement.

Les boîtes sont construites par la médiane et l'intervalle interquartile, les moustaches représentent 95 % des valeurs de la population.

b) Évolution des concentrations en PMPs de T0 à T6 selon la réponse partielle, la non réponse biologique, la persistance de signes cliniques et la progression

Nous avons ensuite vérifié si les sous-groupes constituant le groupe « échec thérapeutique » avaient le même profil en matière de variations de PMPs.

Nous avons distingué 3 sous-groupes parmi nos patients en échec thérapeutique (Figure 36).

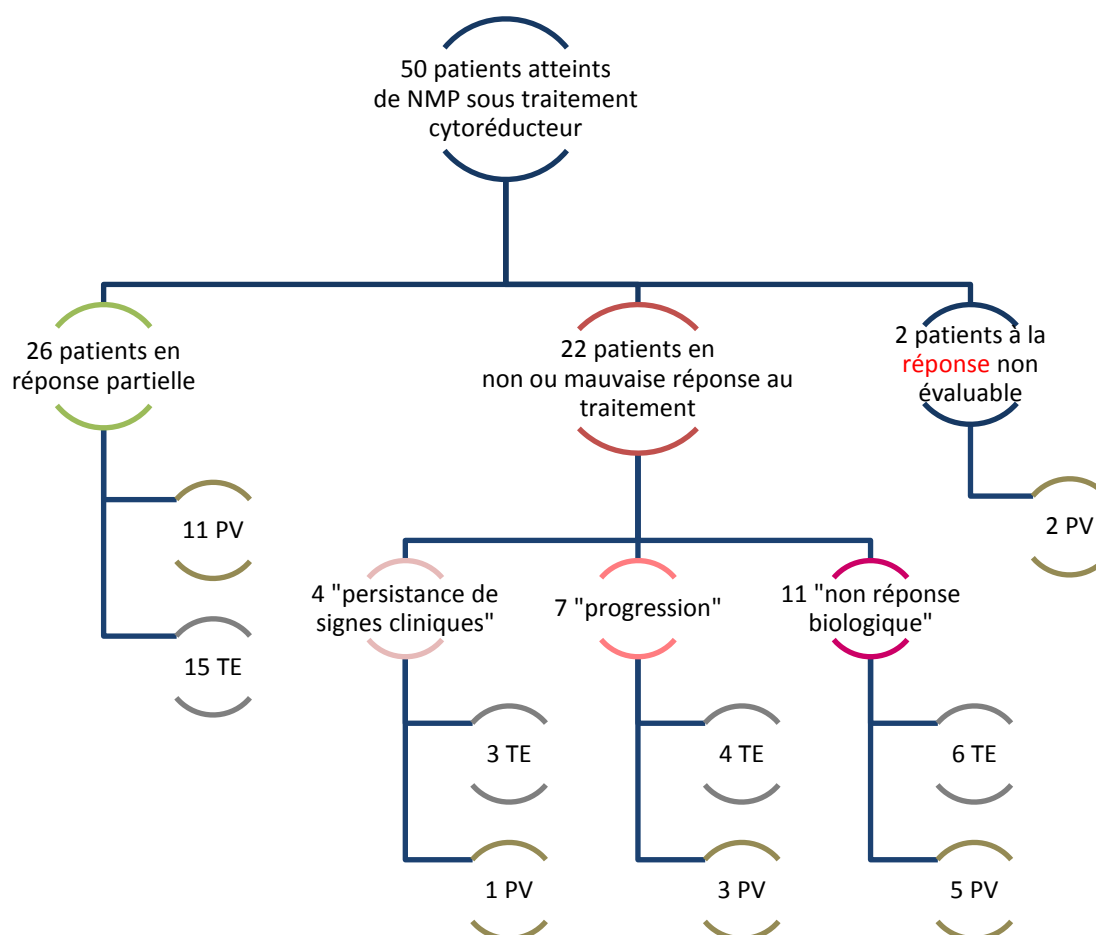


Figure 36 : Diagramme descriptif de la population atteinte de NMP analysée selon la réponse au traitement cytoréducteur.

4 patients étaient en situation de persistance de signes cliniques (tels que céphalées, vertiges, acouphènes, érythromélgies, organomégalies, prurit...), 7 patients présentaient des signes de progression (hémorragies, thromboses, transformation leucémique ou transformation en myélofibrose) et 11 patients présentaient une non réponse biologique. Ce groupe était constitué de patients ne présentant pas de signes cliniques de NMP ou de signes de progression, mais dont le bilan biologique ne respectait pas les critères proposés par Barosi.

L'étude des PMPs dans ces différents sous-groupes (persistance de signes cliniques, progression et non rémission biologique) a permis de mettre en évidence des résultats similaires à ceux évoqués précédemment, soit une absence de différence significative des concentrations plasmatiques entre 0 et 6 mois de traitement (groupe persistance clinique respectivement 3744/ μ L [2433-5054] et 2334/ μ L [1633-3035], $p>0,999$, groupe progression 2067/ μ L [1385-9106] et 1141/ μ L [777-5258], $p>0,999$, groupe non réponse biologique 3099/ μ L [2085-4331] et 1243/ μ L [607-3550], $p=0,637$).

Pour rappel, il existait une diminution statistiquement significative des concentrations en PMPs dans le groupe « réponse partielle » entre T0 et T6 (2708/ μ L [1097-4737] et 899/ μ L [575-1420], $p<0,001$).

Ces résultats sont présentés dans la Figure 37.

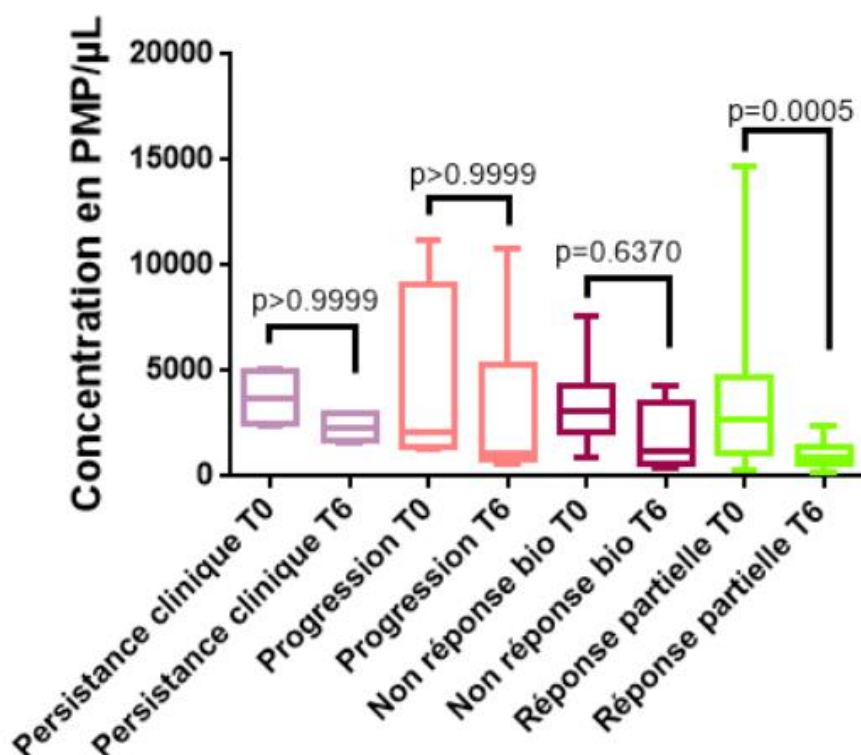


Figure 37 : Représentation graphique en boîtes à moustaches des concentrations en PMPs à T0 et à T6 dans les sous-groupes en échec thérapeutique (persistance de signes cliniques, progression, non réponse biologique) et dans le groupe réponse partielle au traitement cytoréducteur.

Les boîtes sont construites par la médiane et l'intervalle interquartile, les moustaches représentent 95 % des valeurs de la population.

V. Facteurs prédictifs au diagnostic de réponse au traitement

a) Cas des PMPs

Pour cela, nous avons comparé les concentrations plasmatiques en PMPs à T0 (avant mise sous traitement) entre le groupe de patients mis ensuite en « réponse partielle » (26 patients, 54 %) et le groupe de patients ensuite en « échec thérapeutique » (22 patients, 46 %).

Il n'existait pas de différence statistiquement significative en concentrations de PMPs entre nos deux groupes à T0 : les médianes étaient de 2708/ μL [1097-4737] pour le groupe réponse partielle et 2922/ μL [1685-5054] pour le groupe échec thérapeutique, $p > 0,999$.

Nous avons réalisé une courbe ROC (*Receiver Operating Characteristics*) afin d'étudier la capacité de la mesure de PMPs à T0 à discriminer les patients des groupes réponse partielle et échec thérapeutique. L'aire sous la courbe était de 0,588, avec un intervalle de confiance à 95 % de [0,430 ; 0,734].

La valeur de 1637 PMP/ μ L permettait de maximiser sensibilité et spécificité selon le critère ((pourcentage de sensibilité + pourcentage de spécificité) - 100) afin de discriminer le plus efficacement possible patients en réponse partielle et patients en échec thérapeutique (Figure 38).

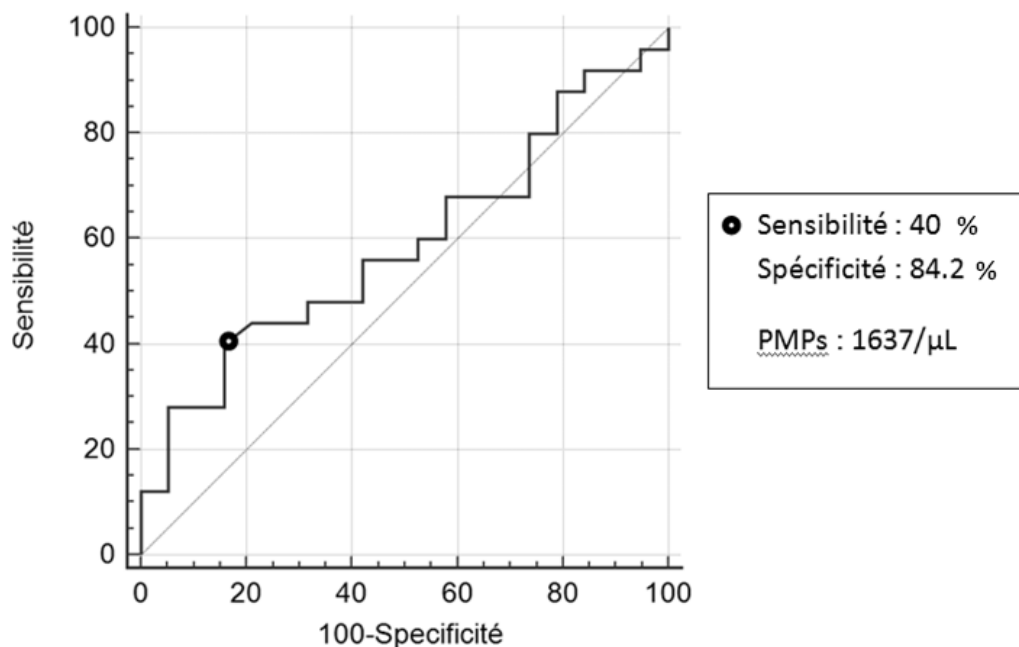


Figure 38 : Représentation graphique de la courbe ROC (*Receiver Operating Characteristics*) et description du seuil optimum estimé (PMP = 1637/ μ L).

b) Modélisation de la réponse au traitement

La « réponse partielle au traitement » a été modélisée selon des modèles univariés puis multivariés. Les covariables ne respectant pas l'hypothèse de linéarité (âge, leucocytes, plaquettes, hémoglobine) ont été dichotomisées pour l'analyse. Aucun des paramètres testés n'était significatif dans le modèle univarié. La covariable PMP >1637/ μ L et les covariables dont la p-value étaient <0,20 (plaquettes >650 G/L)

ont été incluses dans un modèle multivarié. Il persistait, en multivarié, une absence de significativité des paramètres testés. Le paramètre « concentration en PMPs supérieure à 1637/ μ L à T0 » n'influçait pas significativement la réponse au traitement : OddRatio(OR) = 0,62, IC95 % [0,18 ; 2,10], p=0,442.

Quel que soit le paramètre testé au diagnostic (dont la concentration en PMP/ μ L), il n'était pas démontré d'intérêt prédictif de réponse au traitement cytoréducteur dans notre population.

Ces résultats sont détaillés dans le Tableau 15.

Tableau 15 : Modèle de régression linéaire en fonction de la variable réponse au traitement selon une analyse
 (A) univariée selon les covariables pouvant interférer, aucun paramètre testé n'est significatif ;
 (B) multivariée selon les covariables plaquettes >650 G/L et PMP >1637/ μ L, aucun paramètre testé n'est significatif.

A	Analyses univariées	OR	IC 95 %	p-values
	Âge > 68 ans	0,72	[0,23 ; 2,26]	0,579
	Diagnostic (TE vs PV)	0,95	[0,30 ; 3,00]	0,928
	JAK2 ^{V617F}	1,54	[0,40 ; 5,96]	0,531
	MPL	2,43	[0,03 ; 234,96]	0,704
	CALR	0,76	[0,10 ; 5,88]	0,788
	Aspirine	1,21	[0,22 ; 6,67]	0,831
	AVK	2,66	[0,03 ; 256,28]	0,675
	Antécédent de néoplasie	0,84	[0,11 ; 6,48]	0,864
	Diabète	0,84	[0,11 ; 6,48]	0,864
	HTA	1,35	[0,43 ; 4,22]	0,608
	Dyslipidémie	1,71	[0,54 ; 5,43]	0,366
	Traitement hypolipémiant	0,66	[0,18 ; 2,35]	0,517
	Tabac	0,65	[0,17 ; 2,51]	0,531
	Leucocytes >8,9 G/L	0,72	[0,23 ; 2,26]	0,579
	Plaquettes >650 G/L	0,44	[0,14 ; 1,39]	0,161
	Hémoglobine >15 g/dL	1,38	[0,44 ; 4,31]	0,579
	PMP >1637/ μ L	0,62	[0,18 ; 2,10]	0,442

B	Modèle multivarié	OR	IC 95 %	p-values
	Plaquettes >650 G/L	0,44	[0,14 ; 1,41]	0,166
	PMP >1637/ μ L	0,65	[0,19 ; 2,29]	0,507

VI. Évaluation du nouveau cytomètre (Navios) pour le dénombrement des PMPs

a) Comparaison des données mesurées

La comparaison des deux cytomètres a été conduite à partir de 40 échantillons sélectionnés aléatoirement parmi notre population d'étude constituée de patients et témoins et analysés en parallèle sur les 2 cytomètres.

Les résultats de concentrations en PMPs obtenus sur les 2 cytomètres (Navios et Cytoomics FC 500) étaient significativement différents : les médianes étaient respectivement de 6994/ μ L [3686-11583] et 1570 μ L [782-3260], $p < 0,0001$.

Ces résultats sont représentés en Figure 39.

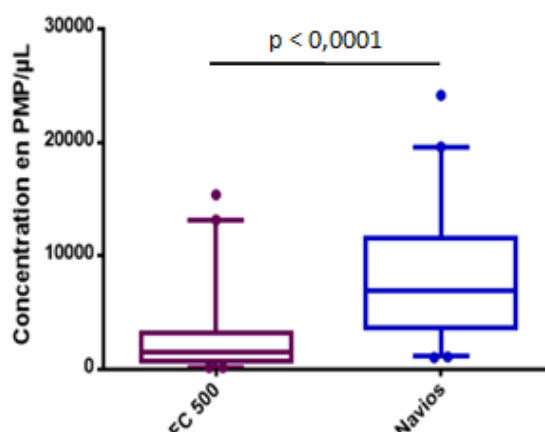


Figure 39 : Représentation graphique en boîtes à moustaches des concentrations en PMPs mesurées sur nos 2 cytomètres (Cytomics FC500 et Navios). Les boîtes sont construites par la médiane et l'intervalle interquartile, les moustaches représentent 95 % des valeurs de la population.

b) Étude de la corrélation entre les résultats obtenus

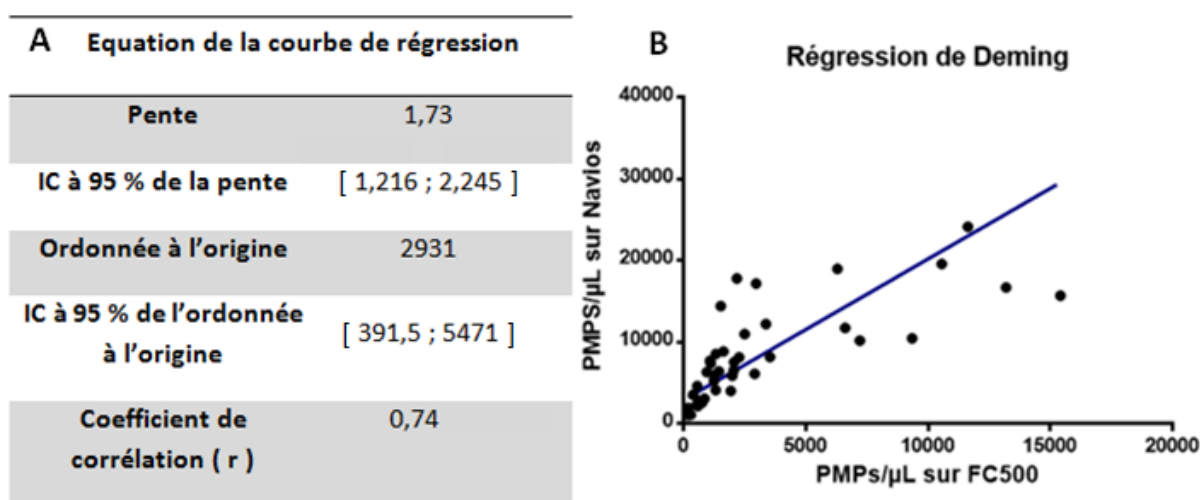


Figure 40 : Étude de la corrélation entre les techniques sur FC500 et sur Navios :
(A) tableau synthétique des résultats de l'étude de corrélation
et (B) représentation de la droite de corrélation entre ces deux techniques.

La droite de corrélation obtenue par régression linéaire de Deming était définie par une pente $a = 1,73$, IC 95 % [1,22 ; 2,25] et une ordonnée à l'origine $b = 2931$, IC 95 % [392 ; 5471]. Le coefficient de corrélation de Pearson était estimé à 0,74, IC 95 % [0,559 ; 0,855] ($p > 0,0001$), en faveur d'une corrélation entre les mesures réalisées sur les deux automates (Figure 40).

Néanmoins, le calcul du coefficient de concordance de Lin, basé sur l'écart des points par rapport à la droite de régression, était estimé à 0,431, IC 95 % [0,268 ; 0,571], indiquant une concordance pauvre entre les mesures des deux automates.

c) Étude de la concordance entre les résultats obtenus

La méthode de concordance de Bland-et-Altman exprime les différences obtenues pour un même échantillon entre les deux cytomètres (D), en fonction de la moyenne des résultats obtenus pour ce même échantillon sur les deux cytomètres (M). La différence (D) peut également être exprimée en pourcentage de gain ou de perte de la technique d'origine.

La moyenne des différences observées entre les deux techniques était estimée à 5240 +/- 3929, avec des limites de concordance (+/- 1,96 écart-type) estimées à [-2462 ; 12942]. La moyenne des différences était testée significativement différente de zéro ($p < 0,0001$).

Deux plages de mesures se distinguaient lors de l'étude de la corrélation (Figure 41) : une première plage de mesures linéaire correspondant à des concentrations moins élevées de PMPs (<8000 PMP/ μ L en moyenne des deux techniques), tandis qu'une deuxième plage correspondait aux concentrations très hautes de PMPs (>8000 PMP/ μ L en moyenne des deux techniques).

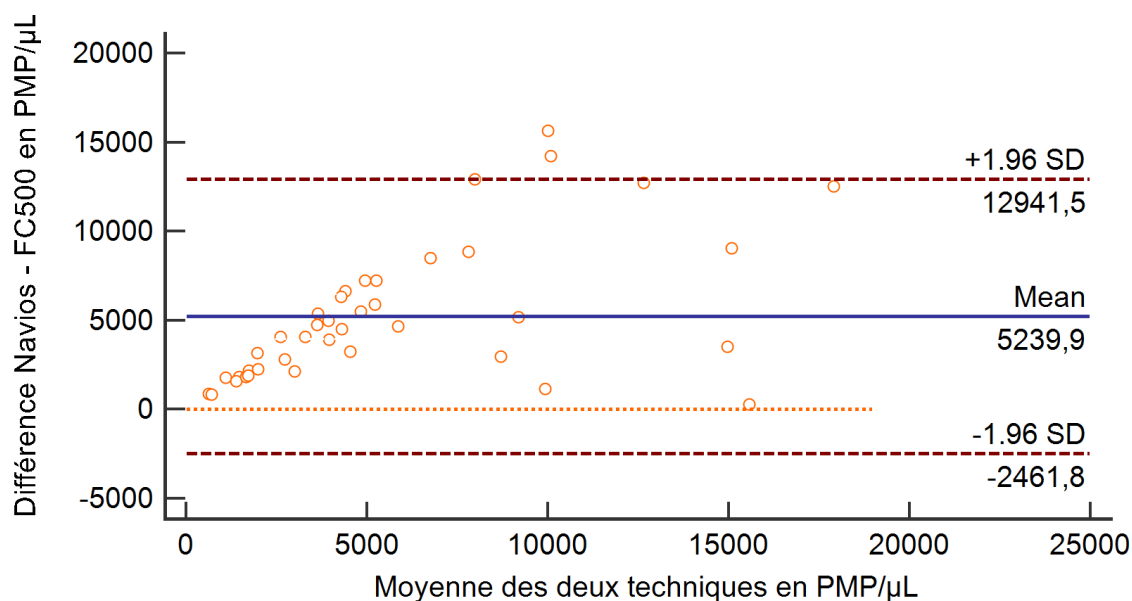


Figure 41 : Représentation graphique de l'étude de la concordance entre nos deux techniques (Cytomics FC500 et Navios) par la méthode de Bland-et-Altman.

Pour cette raison, nous avons réitéré l'étude de concordance par la méthode de Bland-et-Altman en distinguant ces 2 plages de mesures, avec pour seuil 8000 PMP/μL, seuil appliqué aux moyennes des deux techniques. Ce seuil correspondait en réalité à un seuil maximal de PMPs sur FC500 de 3527 PMP/μL et sur Navios de 14441 PMP/μL.

Les Figure 42 et Figure 43 permettent d'observer un biais pour la plage de mesures allant jusqu'à la valeur seuil de 8000 PMP/μL en moyenne de mesure. La différence absolue des concentrations de PMPs augmentait en même temps que les valeurs moyennes mesurées tandis que la différence relative (rapportée à la moyenne des 2 techniques) était constante et environ égale à 124 %. Le biais pour cette plage de mesure était par conséquent proportionnel (161).

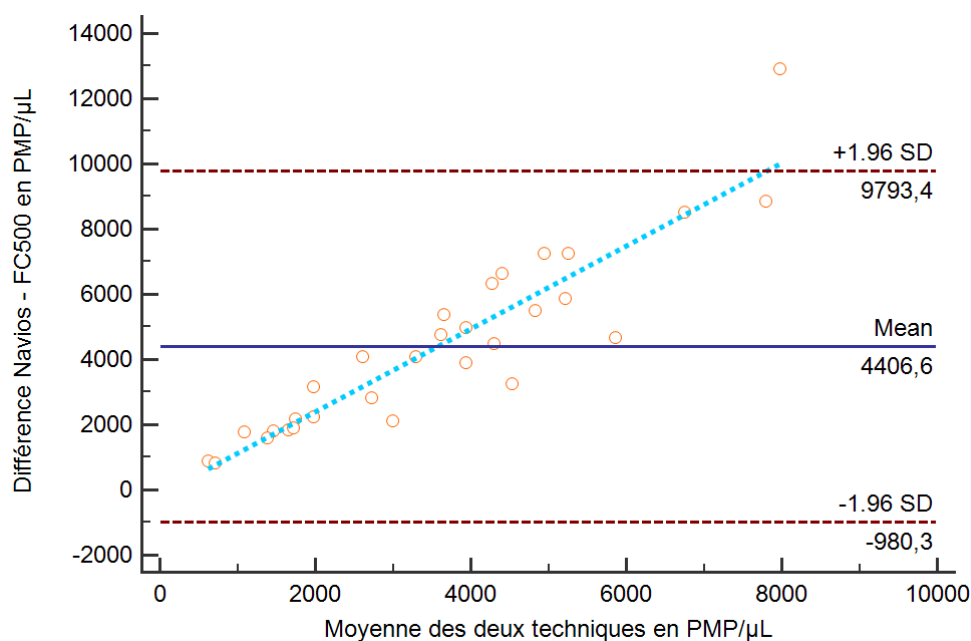


Figure 42 : Représentation graphique de l'étude de la concordance et de la droite de régression correspondante (pointillé bleu clair) sur la plage PMPs moyennes <8000 entre nos deux techniques (Cytomics FC500 et Navios) par la méthode de Bland-et-Altman. La différence entre dénombrement sur Navios et FC500 est exprimée en valeur absolue, en PMP/μL.

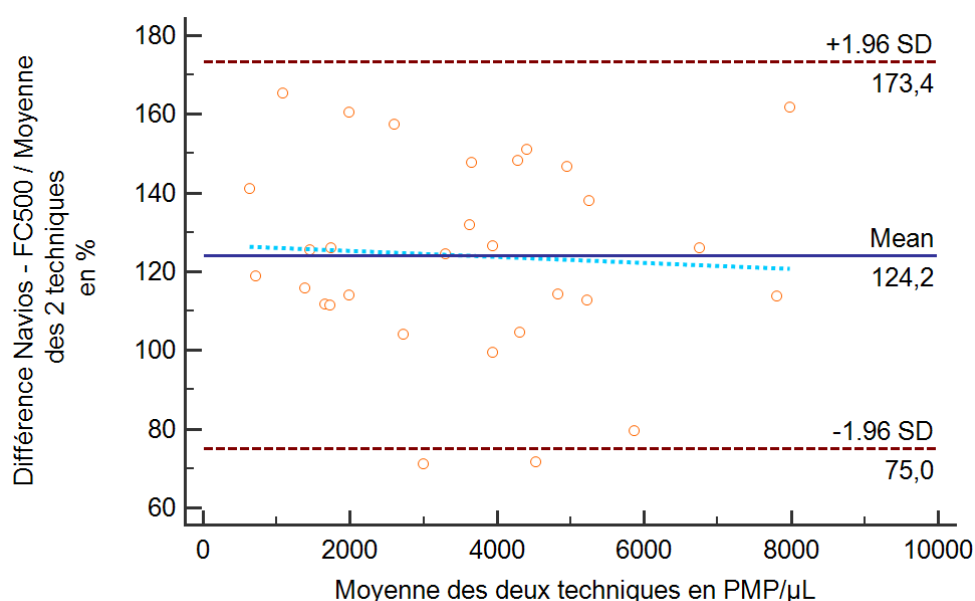


Figure 43 : Représentation graphique de l'étude de la concordance et de la droite de régression correspondante (pointillé bleu clair) sur la plage PMPs moyennes <8000 entre nos deux techniques (Cytomics FC500 et Navios) par la méthode de Bland-et-Altman. La différence entre dénombrement sur Navios et FC500 est rapportée à la moyenne des 2 techniques et exprimée en %.

L'étude par régression de Deming entre les résultats obtenus sur FC500 et Navios dans cette plage de mesures montrait qu'il existait une corrélation entre ces résultats, et la pente de la droite de régression était estimée à 4,08 (intervalle de confiance à 95 % [2,54 ; 5,61]). Dans cette plage de valeurs, les concentrations en

PMPs mesurées sur Navios étaient donc environ 4 fois plus élevées que celles mesurées sur FC500. La différence médiane entre les deux techniques dans ce groupe était de 4098/ μ L [2081-6000] (Tableau 16).

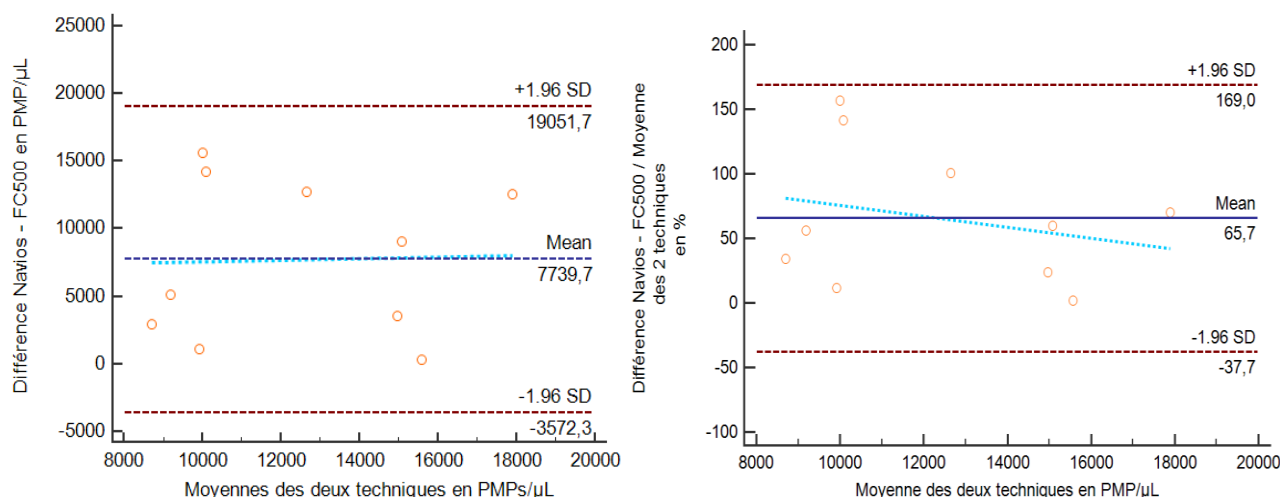


Figure 44 : Représentations graphiques de l'étude de la concordance sur la plage PMPs moyennes >8000 entre nos deux techniques (Cytomics FC500 et Navios) par la méthode de Bland-et-Altman.

(A) La différence entre dénombrement sur Navios et FC500 est exprimée en valeur absolue, en PMP/ μ L.

(B) La différence entre Navios et FC500 est rapportée à la moyenne des 2 techniques et exprimée en %.

La Figure 44 étudie la concordance entre nos deux méthodes sur la plage de mesures dépassant le seuil de 8000 PMP/ μ L. Un biais existait sur cette plage de mesures. La différence absolue des mesures en fonction de leur moyenne (Figure 44 A) était constante, la pente de la droite de régression estimée était dans ce cas proche de 0 ($a = 0,12$, IC 95 % [-0,71 ; 0,96]) et ne permettait pas d'établir de coefficient multiplicateur entre les deux méthodes. Il existait par contre une surestimation constante estimée à 15228 PMP/ μ L (intervalle de confiance à 95 % [7350 ; 23105]) lors de la mesure par Navios plutôt que par FC500. Cette surestimation constante était confirmée par la Figure 44 B, qui montrait que la différence relative des mesures variait en fonction de la moyenne des mesures. Le

biais pour cette plage de mesures était par conséquent systématique (161). La différence médiane pour ce groupe était de 7115/ μ L [2537-13105] (Tableau 16).

Tableau 16 : Moyennes et différences entre les mesures réalisées sur les deux cytomètres selon le seuil d'étude de 8000 PMP/ μ L.

	Groupe de prélèvements dont la moyenne des mesures <8000 PMP/ μ L	Groupe de prélèvements dont la moyenne des mesures >8000 PMP/ μ L
Moyennes des mesures sur les 2 cytomètres	3631 [1733-4852]	11367 [9739-15205]
Différences des mesures sur les 2 cytomètres	4098 [2081-6000]	7115 [2537-13105]

d) Illustration par un cas

Nous avons choisi d'illustrer cette comparaison de méthodes par un cas. Cette patiente était âgée de 59 ans et atteinte d'une TE. Ce prélèvement a été réalisé lors de sa 7^{ème} visite de suivi (soit 36 mois de suivi). Elle était traitée par aspirine seule et ne bénéficiait pas d'un traitement cytoréducteur.

La Figure 45 A et la Figure 45 B sont les cytogrammes Annexine V x CD41 obtenus lors du dénombrement des PMPs sur FC500 et sur Navios. Les PMPs sont définies comme une population Annexine V+ et CD41+ comprise dans la zone de détection préalablement réglée grâce aux billes Megamix[®] (zone allant de 0,5 à 1 μ m) ou Megamix plus[®] (zone allant de 0,3 à 1 μ m).

Sur le FC500, le dénombrement des PMPs était estimé à 11623 PMP/ μ L et ne permettait de distinguer qu'une population homogène. Tandis que le dénombrement sur Navios était estimé à 24161 PMP/ μ L et permettait de distinguer

deux populations distinctes de PMPs, les *large* ou *bright* PMPs (de taille entre 0,5 et 1 μm , d'intensité plus forte en Annexine V et en CD41), et les *small* ou *dim* PMPs (de taille entre 0,3 et 0,5 μm , d'intensité plus faible en Annexine V et en CD41).

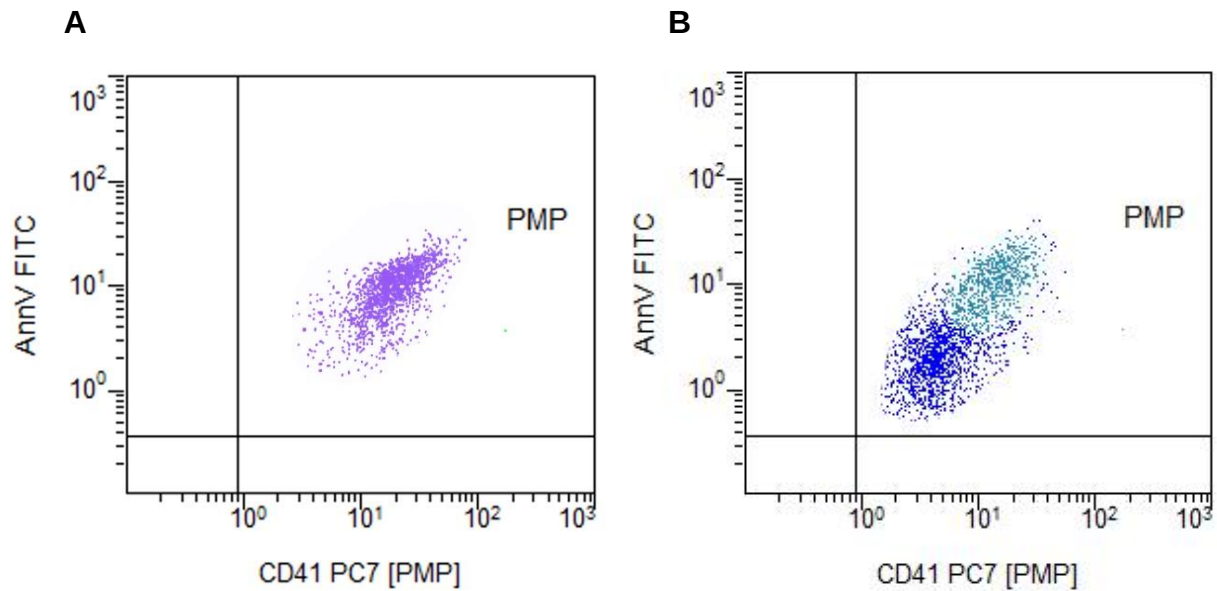


Figure 45 : Cytogrammes Annexine V/CD41 obtenus par cytométrie en flux sur (A) FC500 et (B) Navios permettant de dénombrer les PMPs (Annexine V+, CD41+). Le cytogramme obtenu sur Navios permet également la distinction de 2 populations distinctes de PMPs : *bright* (en bleu gris) et *dim* (en bleu plus soutenu).

DISCUSSION

Puisque les MPs sont impliquées dans le risque thrombotique des NMP et que le traitement cytoréducteur diminue le risque thrombotique sans toutefois l'éliminer, notre problématique a constitué à étudier si la concentration plasmatique des PMPs diminuait sous traitement cytoréducteur adapté. Nous nous sommes principalement concentrés dans ce travail sur l'étude des PMPs, car elles représentent une grande majorité des MPs circulantes (58,60), et ont déjà été largement décrites comme impliquées dans les phénomènes de thrombose (131,132,144).

À notre connaissance, l'étude de l'évolution de la concentration plasmatique des MPs en fonction de la thérapeutique cytoréductrice et de la réponse au traitement dans les NMP n'a encore jamais été étudiée.

Nous disposions d'une population d'étude homogène dont l'inclusion s'était faite de manière consécutive et prospective lors du diagnostic avant tout traitement cytoréducteur. De plus, les patients ont bénéficié d'un traitement cytoréducteur homogène puisqu'ils ont tous reçu en première ligne de l'hydroxyurée, ce qui évite d'introduire un biais lié à la nature du traitement cytoréducteur de première ligne dans nos résultats. Nous disposions également d'une population de patients n'ayant jamais reçu de traitement cytoréducteur qui a pu nous servir de groupe de référence dans l'étude de la cinétique des PMPs chez les patients traités.

I. Caractéristiques clinico-biologiques des populations au diagnostic.

Des différences statistiquement significatives sur le bilan biologique (leucocytes, plaquettes, hématicrite) existaient entre nos différents groupes de patients (PV, TE, témoins), mais celles-ci sont sans surprise puisqu'elles sont la définition même des pathologies que nous étudions. Malgré cela, nous avons fait le choix de vérifier que ces paramètres n'interféraient pas avec nos résultats par le biais d'analyses uni et multivariées.

Il existait dans nos populations une différence significative au niveau de l'âge moyen entre les patients et les témoins. Celui-ci était diminué dans notre groupe témoin. L'âge avancé étant potentiellement identifié comme un facteur augmentant les MPs, il faut évidemment en tenir compte dans l'interprétation de nos résultats. Pour ces raisons, nous avons montré que la variable âge n'interférait pas dans nos résultats par le biais d'une modélisation multivariée (ci-après).

II. Concentrations en MPs au diagnostic

a) Selon les groupes PV, TE et témoins

Quelle que soit la catégorie de MPs étudiée, leurs concentrations étaient plus élevées chez nos patients atteints de NMP que chez nos témoins. Ces résultats étaient statistiquement significatifs et conformes avec les précédents résultats du laboratoire ainsi que les données de la littérature (151).

Nous n'avons pas mis en évidence de différence significative de la concentration plasmatique de MPs entre les groupes TE et PV, ce qui nous a permis

de regrouper dans la suite de notre étude les patients PV et TE dans un seul groupe « malades » (ou NMP).

b) Modélisation de la concentration en PMPs au diagnostic selon les groupes néoplasie myéloproliférative et témoins

Il existait toujours une différence statistiquement significative lors de la comparaison des concentrations plasmatiques en PMPs au diagnostic entre le groupe malades (TE + PV) et le groupe témoins.

Nous avons réalisé des analyses uni et multivariées afin de vérifier qu'aucune co-variable n'interférait avec nos résultats. Seuls les paramètres pour lesquels $p < 0,2$ en univarié ont été testés selon un modèle multivarié. L'analyse multivariée que nous avons réalisée sur l'âge, les concentrations en leucocytes, les concentrations en plaquettes et sur le statut malade (PV et TE confondues) ont permis de montrer l'absence d'interférence de l'âge, des concentrations en leucocytes et en plaquettes dans nos résultats. Après analyse multivariée, seule la maladie (NMP versus témoins) était responsable d'une différence statistiquement significative de concentrations en PMPs plasmatiques.

Ces différences de concentrations en PMPs au diagnostic des NMP versus témoins sont conformes aux données déjà démontrées. Les PMPs ont d'ailleurs un rôle à jouer au diagnostic des NMP, principalement chez les patients pour lesquels aucune mutation n'a été identifiée (143).

III. Évolution des concentrations de PMPs au cours du traitement cytoréducteur

a) Population

Nous avons étudié dans cette partie l'effet du traitement cytoréducteur à 6 mois puis à 12 mois sur la concentration plasmatique en PMPs.

Notre choix d'étudier la cinétique des PMPs après la mise sous traitement de première ligne, et le fait que le traitement cytoréducteur de première intention soit l'hydroxyurée pour tous les patients ne nous ont pas permis d'étudier l'effet des autres traitements cytoréducteurs sur les PMPs ; en revanche cela rendait notre population homogène vis-à-vis du traitement cytoréducteur de première intention.

Aucun de nos patients n'a bénéficié d'un traitement de type antiJAK2 (ruxolitinib Jakavi®). Aucun de nos patients n'a été traité au long cours par saignées seules.

Nos groupes non traités et traités étaient comparables ($p > 0,999$) en ce qui concerne la présence d'un traitement antiagrégant plaquettaire : à 6 mois de suivi tous nos patients non traités par traitement cytoréducteur bénéficiaient d'un traitement antiagrégant plaquettaire comme la quasi-totalité des patients du groupe traité (45 traités par aspirine (90%), 4 par un autre antiagrégant plaquettaire, seul 1 patient n'avait pas d'antiagrégant plaquettaire, car sous AVK et à risque hémorragique élevé). Le paramètre aspirine n'a donc pas influencé nos comparaisons entre patients atteints de NMP traités et non traités.

b) Évolution des concentrations en PMPs de T0 à T6

Nous avons observé une diminution franche et significative des concentrations plasmatiques de PMPs dans le groupe traité entre la visite précédant

la mise sous traitement cytoréducteur (T0) et après 6 mois de traitement (T6). Dans notre groupe de référence constitué de patients ne bénéficiant pas de traitement cytoréducteur, il n'existait pas de différence de concentrations plasmatiques des PMPs entre le moment du diagnostic (T0) et après 6 mois de suivi (T6). Cette observation laisse penser que le traitement cytoréducteur (dans notre population, l'hydroxyurée) pourrait avoir un lien avec cette diminution brutale de PMPs à la mise sous traitement.

c) Évolution des concentrations en PMPs de T0 à T12

L'étude des concentrations en PMPs à T12 montrait chez le groupe « traités » un plateau entre T6 et T12 (absence de différence statistiquement significative), néanmoins les comparaisons des concentrations en PMPs entre T0 et T12 dans ce même groupe restaient significatives.

Nous avons de plus observé que les concentrations en PMPs après 6 mois de traitement diminuaient, mais restaient toutefois significativement supérieures à celles de la population de témoins sains. Ces résultats étaient similaires après 12 mois de traitement cytoréducteur.

Ces résultats laissent penser que la mise sous traitement cytoréducteur entraînerait une diminution franche et rapide des PMPs dans les 6 premiers mois de traitement. Entre 6 et 12 mois de traitement, les concentrations en PMPs semblent se stabiliser, tout en restant supérieures aux valeurs de base mesurées chez les témoins sains.

De façon opposée, dans notre groupe de référence ne bénéficiant pas de traitement cytoréducteur, il n'existait pas de différence significative en concentrations de PMPs entre les temps T0, T6 et T12. Ces résultats confortent notre hypothèse

selon laquelle la mise sous traitement cytoréducteur (et aucune autre variable étudiée dans notre population) entraînerait une diminution des concentrations plasmatiques en PMPs.

d) Évolution des concentrations en PMPs Psel- de T0 à T6

Nous nous sommes interrogés sur les raisons de la diminution des concentrations plasmatiques en PMPs après la mise en route du traitement cytoréducteur par hydroxyurée.

L'hydroxyurée inhibe la synthèse de l'ADN principalement au niveau médullaire en touchant d'abord la granulopoïèse, puis la thrombopoïèse et, en dernier lieu, l'érythropoïèse.

Les PMPs exprimant la P-selectine ont été décrites comme dérivant de plaquettes activées tandis que les PMPs n'exprimant pas la P-selectine (PMP Psel-) dériveraient des mégacaryocytes (60). Nous nous sommes donc demandé si le traitement cytoréducteur avait un retentissement sur le nombre de PMPs dérivant du compartiment mégacaryocytaire (soit les PMPs Psel-). Pour cela nous avons comparé les fractions de PMPs n'exprimant pas la P-selectine (pourcentages de PMPs Psel- sur PMPs totales) entre T0 et T6 dans le groupe traités. Après 6 mois de traitement, le pourcentage médian de PMPs Psel- était plus faible qu'avant la mise sous traitement, cette différence n'était cependant pas statistiquement significative. Ce manque de significativité est peut-être dû à la faiblesse de notre effectif pour cette étude (11 patients traités). Il serait néanmoins intéressant d'approfondir ces travaux lors de futures études disposant d'une plus grande cohorte de patients, ainsi que d'utiliser des marqueurs et techniques supplémentaires pour identifier et quantifier de

manière plus précise les PMPs dérivant de mégacaryocytes, décrites par Flaumenhaft comme CD41+, PS+, CD62P- et LAMP-1-.

Les traitements cytoréducteurs disponibles sur le marché ont des modes d'action différents, l'hydroxyurée par exemple inhibe d'abord la granulopoïèse, puis la thrombopoïèse et, en dernier lieu, l'érythropoïèse ; le pipobroman a une action proche de celle de l'hydroxyurée ; tandis que l'anagrélide agit spécifiquement sur les plaquettes par une action ciblée sur les mégacaryocytes. Il est donc logique de se demander si leurs effets sur les PMPs sont les mêmes, et ainsi si certains traitements seraient plus efficaces dans la prévention des thromboses par leur action sur les PMPs. Il pourrait également être intéressant d'étudier les concentrations de PMPs chez des patients traités différemment, et de prendre en compte la durée de traitement et la posologie de ces traitements.

Étant donné le rôle procoagulant des PMPs, la persistance de PMPs à des concentrations supérieures à celles des témoins sains pourrait expliquer la persistance d'évènements thrombotiques malgré la présence d'une thérapeutique cytoréductrice bien conduite. Nous n'avons pu étudier cette question, car seuls 3 patients de notre population d'étude ont présenté des complications à type de thromboses lors de la première année de suivi après mise sous traitement cytoréducteur. Une cohorte constituée de plus de patients suivis pendant une durée plus longue permettrait peut-être d'y répondre.

Devant ces résultats, nous nous sommes demandé si la diminution des concentrations en PMPs sous traitement cytoréducteur pouvait être en réalité le reflet de la bonne réponse au traitement cytoréducteur, et si la concentration en PMPs pouvait être un biomarqueur dans le suivi de la réponse thérapeutique.

IV. Évolution des concentrations en PMPs selon la réponse au traitement

Dans le groupe en échec thérapeutique et dans chacun de ses sous-groupes (non réponse biologique, persistance de signes cliniques, progression), nous n'observons pas de différence significative entre les concentrations de PMPs à T0 et à T6. Il existait de légères diminutions des valeurs médianes des concentrations en PMPs entre T0 et T6 pour chacun de ces groupes, mais celles-ci n'étaient pas significatives. Ceci pourrait être expliqué par la présence d'une thérapeutique cytoréductrice.

En revanche, il existait une diminution franche et significative des concentrations de PMPs entre T0 et T6 (diminution moyenne de 2616 PMP/ μ L entre T0 et T6, soit une diminution moyenne d'environ 2/3 de la concentration à T0) chez nos patients présentant une bonne réponse au traitement : « réponse partielle » (réponse au traitement évaluée après 6 et 12 mois de traitement).

La différence entre ces deux groupes nous permet d'observer que parmi les patients traités, les patients qui étaient en réponse partielle au traitement avaient une franche diminution de leurs concentrations plasmatiques en PMPs après la mise sous traitement cytoréducteur, tandis que les patients en échec thérapeutique n'avaient pas de diminution significative de leurs concentrations plasmatiques en PMPs. Ceci nous laisse penser qu'une diminution franche des PMPs à 6 mois pourrait être en réalité le reflet d'une bonne efficacité du traitement cytoréducteur et qu'inversement, l'absence de diminution des PMPs sous traitement cytoréducteur pourrait être associée à une mauvaise réponse au traitement, et pourrait être expliquée comme étant le reflet de la prolifération cellulaire. En effet, il est possible

d'imaginer que les patients en échec thérapeutique aient une prolifération myéloïde (ou mégacaryocytaire) supérieure aux patients en réponse partielle, ou que les patients en échec thérapeutique aient une sorte d'insensibilité à l'hydroxyurée. Ces deux hypothèses pourraient expliquer l'absence de diminution des concentrations en PMPs chez les patients en échec thérapeutique.

Par ailleurs, le suivi de la réponse au traitement par la mesure des PMPs semblerait être un reflet plus global de la réponse que le suivi biologique classique. En effet nous n'avons pas montré de différences de concentrations plasmatiques en PMPs entre nos sous-groupes d'échec thérapeutique : les PMPs ne diminuaient pas à 6 mois de traitement à la fois chez les patients en non réponse biologique et à la fois chez ceux en non réponse clinique.

Il serait intéressant de confirmer ces résultats sur des séries plus importantes. Notre groupe en échec thérapeutique était constitué de 22 patients, et l'étude de chacun de ses sous-groupes s'est faite avec des effectifs réduits (4, 7 et 11 patients).

Nous avons de plus fait le choix de respecter les critères de Barosi (156) pour affirmer la réponse au traitement, mais n'avons pu distinguer les patients en réponse totale de ceux en réponse partielle puisque la distinction nécessite la réalisation d'une biopsie ostéo-médullaire, acte qui n'est pas réalisé dans le suivi régulier et normal d'un patient atteint de PV ou de TE en France, car considéré comme invasif et risqué.

Devant ces résultats, nous formulons l'hypothèse que les PMPs pourraient être considérées comme un biomarqueur dans le suivi de la réponse thérapeutique des patients atteints de NMP : les patients qui auraient une franche diminution de

leurs concentrations en PMPs après 6 mois de traitement cytoréducteur auraient alors plus de chances de présenter une bonne réponse au traitement.

Par extension, nous nous sommes demandé si la mesure des concentrations en PMPs au diagnostic pouvait également avoir un intérêt prédictif de la réponse au traitement.

V. Facteurs prédictifs de réponse au traitement cytoréducteur au diagnostic

a) Cas des PMPs

Notre hypothèse était que la mesure des concentrations en PMPs au diagnostic pouvait également avoir un intérêt prédictif de la réponse au traitement.

Pour cela, nous avons commencé par comparer les concentrations plasmatiques en PMPs au diagnostic entre les groupes réponse partielle et échec thérapeutique. Nous n'avons pas pu mettre en évidence de différence statistique des concentrations en PMPs entre les deux groupes réponse et non réponse au diagnostic (T0).

Étant donnée la rareté de ces pathologies, notre population d'étude pour cette question était constituée de 48 patients (PV traitées et TE traitées confondues). Il est possible qu'un plus grand effectif et une séparation des deux pathologies permettent d'obtenir des résultats différents des nôtres.

Le meilleur seuil dont nous disposions d'après notre courbe ROC était de 1637 PMP/ μ L. Ce seuil de 1637 PMP/ μ L permettait de prédire la réponse au traitement avec une spécificité de 84,2 %, mais n'avait une sensibilité que de 40 %. L'étude d'un tel seuil pourrait être utile, en association avec d'autres marqueurs,

dans l'idée d'une démarche thérapeutique plus ciblée ou plus agressive dès la mise sous traitement, et ce dans l'espoir de diminuer les complications thrombotiques, et également d'améliorer le confort des patients présentant des signes cliniques persistants.

b) Modélisation de la réponse au traitement

Aucun autre seuil et aucun autre paramètre testé par la suite en univarié comme en multivarié n'étaient plus pertinents, nous n'avons donc pas pu mettre en évidence d'intérêt prédictif des concentrations en PMPs au diagnostic dans la réponse au traitement cytoréducteur.

Nous n'avons pas mis en évidence de différence de réponse au traitement chez les patients portant la mutation CALR, connue pour être de bon pronostic. Ce résultat est certainement dû au fait que seuls 2 patients du groupe réponse au traitement et 3 du groupe échec thérapeutique portaient cette mutation.

VI. Évaluation du nouveau cytomètre (Navios) pour le dénombrement des PMPs.

a) Comparaison des données mesurées

La variabilité entre différents cytomètres a déjà été prouvée et c'est pour permettre une meilleure reproductibilité de mesure que se développent des protocoles standardisés pour le dénombrement des MPs.

Effectivement, le Navios (cytomètre plus récent et de meilleure sensibilité que le FC500) en association avec le Megamix Plus FSC[®] (permet l'étude des MPs entre 0,3 μ m et 1 μ m, contre 0,5 μ m à 1 μ m pour le Megamix[®]) permet de mesurer

plus de MPs que le Cytomics FC500, conformément aux données de la littérature (158,162).

b) Étude de la corrélation entre les résultats obtenus

Les résultats obtenus sur FC500 et sur Navios étaient corrélés de manière significative. Le coefficient de corrélation de Pearson était en faveur d'une corrélation entre les mesures réalisées sur les deux automates, néanmoins, le calcul du coefficient de concordance de Lin, basé sur l'écart des points par rapport à la droite de régression indiquait une concordance pauvre entre les mesures des deux automates.

c) Étude de la concordance entre les résultats obtenus

Notre étude montre un rapport proportionnel entre les mesures des deux cytomètres jusqu'au seuil de 8000 PMP/ μ L, seuil appliqué à la moyenne des mesures obtenues avec les 2 cytomètres. Il existait un facteur multiplicatif d'environ 2,53 entre les valeurs mesurées sur FC500 et Navios.

Pour la deuxième phase de mesures, supérieures au seuil de 8000 PMP/ μ L en moyenne des deux cytomètres, nous observons l'existence d'un biais systématique.

Cette deuxième phase de mesures est à interpréter avec précaution. En effet les concentrations très hautes de PMPs sont peut-être dues à des contaminations par des débris ou des poussières ou à des non-respects des procédures préanalytiques qui peuvent entraîner des difficultés de dénombrement en cytométrie et une surestimation des PMPs.

De plus notre effectif pour le groupe de moyenne >8000 PMP/ μL n'était que de 10 échantillons, contre 30 échantillons pour le groupe <8000 PMP/ μL . Cet échantillon faible peut également être à l'origine d'erreurs dans nos analyses, ou d'absence de mise en évidence de certaines relations.

À noter également, le Navios, par sa fenêtre d'analyse plus large et sa meilleure sensibilité, permet de distinguer deux populations de MPs. Le nuage de plus forte intensité en Annexine V, et dans le cas des PMPs en CD41, et de taille entre $0,5\text{-}1\ \mu\text{m}$ peut être appelé *large* ou *bright* PMPs, tandis que le nuage de plus faible intensité en Annexine V et en CD41, et de taille entre $0,3\text{-}0,5\ \mu\text{m}$ correspond aux *small* ou *dim* PMPs (163).

De plus la plus grande sensibilité du couple Navios + Megamix Plus[®] permet une meilleure détection de certains types de MPs de plus petite taille, comme les MPs dérivées de leucocytes (164).

La meilleure identification de certaines MPs et leur distinction en deux groupes distincts sont des avancées qui permettent envisager de nouvelles voies de recherche.

La numération des MPs avait été commencée sur le FC500 pour des travaux antérieurs. Étant donnés ces résultats et dans le cadre de ce travail, nous avons fait le choix de poursuivre les dénombrements de MPs sur le Cytomics FC500 pour une meilleure comparabilité des concentrations en MPs.

CONCLUSION

Les néoplasies myéloprolifératives sont des pathologies dont l'un des enjeux principaux est la gestion du risque thrombotique. La stratégie thérapeutique des NMP est justement fondée sur la maîtrise du risque thrombotique, mais l'expérience montre que malgré une stratégie thérapeutique bien menée et des signes biologiques évocateurs de rémission, certains patients présenteront quand même des complications à type de thromboses. Par ailleurs, les PMPs sont impliquées dans le processus thrombotique et sont augmentées dans les NMP.

Notre étude portait sur 60 patients atteints de NMP (22 PV et 38 TE) ainsi que sur 40 témoins sains. Nos travaux ont permis d'observer une diminution précoce des concentrations plasmatiques en PMPs chez les patients bénéficiant d'un traitement cytoréducteur. Par l'étude de la réponse au traitement chez les patients bénéficiant d'une thérapeutique cytoréductrice, nous avons montré que cette diminution des PMPs était en réalité le reflet de la bonne réponse au traitement. Nous avons également observé le fait que malgré la diminution des PMPs sous traitement, leurs concentrations restaient significativement supérieures à celles des témoins sains. Ceci pourrait être une des raisons de l'existence de complications thrombotiques chez des patients en apparente rémission biologique sous traitement cytoréducteur bien conduit.

BIBLIOGRAPHIE

1. Dameshek W. Editorial: Some Speculations on the Myeloproliferative Syndromes. *Blood*. 1 avr 1951;6(4):372-5.
2. Bennett JH. Case of Hypertrophy of the Spleen and Liver: In which Death Took Place from Suppuration of the Blood... Stark and Comp.; 1845.
3. Heuck G. Zwei Fälle von Leukämie mit eigenthümlichem Blut-resp. Knochenmarksbefund. *Virchows Archiv*. 1879;78(3):475-496.
4. Vaquez H, others. Sur une forme spéciale de cyanose s'accompagnant d'hyperglobulie excessive et persistante. *CR Soc Biol (Paris)*. 1892;44:384-388.
5. Epstein E, Goedel A. Hämorrhagische thrombocythämie bei vasculärer schrumpfmilz. *Virchows Archiv*. 1934;292(2):233-248.
6. Nowell PC, Hungerford DA. Chromosome studies on normal and leukemic human leukocytes. *Journal of the National Cancer Institute*. 1960;25(1):85-109.
7. Rowley JD. A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. 1973 [cité 26 juill 2016]; Disponible sur: <http://www.nature.com/nature/journal/v243/n5405/abs/243290a0.html>
8. Pikman Y, Lee BH, Mercher T, McDowell E, Ebert BL, Gozo M, et al. MPLW515L is a novel somatic activating mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *PLoS Med*. 2006;3(7):e270.
9. Klampfl T, Gisslinger H, Harutyunyan AS, Nivarthi H, Rumi E, Milosevic JD, et al. Somatic Mutations of Calreticulin in Myeloproliferative Neoplasms. *New England Journal of Medicine*. 19 déc 2013;369(25):2379-90.
10. Nangalia J, Massie CE, Baxter EJ, Nice FL, Gundem G, Wedge DC, et al. Somatic CALR mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated JAK2. *New England Journal of Medicine*. 2013;369(25):2391-2405.
11. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*. 2009;114(5):937-951.
12. Campbell PJ, Scott LM, Buck G, Wheatley K, East CL, Marsden JT, et al. Definition of subtypes of essential thrombocythaemia and relation to polycythaemia vera based on JAK2 V617F mutation status: a prospective study. *The Lancet*. 2005;366(9501):1945-1953.
13. Rumi E, Pietra D, Ferretti V, Klampfl T, Harutyunyan AS, Milosevic JD, et al. JAK2 or CALR mutation status defines subtypes of essential thrombocythemia with substantially different clinical course and outcomes. *Blood*. 6 mars 2014;123(10):1544-51.
14. Osca-Gelis G, Puig-Vives M, Saez M, Gallardo D, Lloveras N, Marcos-Gragera R. Population-based incidence of myeloid malignancies: fifteen years of epidemiological data in the province of Girona, Spain. *Haematologica*. août 2013;98(8):e95-7.
15. Tefferi A, Guglielmelli P, Larson DR, Finke C, Wassie EA, Pieri L, et al. Long-term survival and blast transformation in molecularly annotated essential thrombocythemia, polycythemia vera, and myelofibrosis. *Blood*. 16 oct 2014;124(16):2507-13.
16. Moulard O, Mehta J, Fryzek J, Olivares R, Iqbal U, Mesa RA. Epidemiology of myelofibrosis, essential thrombocythemia, and polycythemia vera in the European Union. *European Journal of Haematology*. avr 2014;92(4):289-97.
17. Mehta J, Wang H, Iqbal SU, Mesa R. Epidemiology of myeloproliferative neoplasms in the United States. *Leukemia & Lymphoma*. 1 mars 2014;55(3):595-600.
18. Luque Paz D, Ugo V. Biologie des syndromes myéloprolifératifs : classifications diagnostiques et nouveaux marqueurs moléculaires. *Revue Francophone des Laboratoires*. nov 2015;2015(476):35-45.
19. Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, East C, Fourouclas N, Swanton S, et al. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *The Lancet*. 2005;365(9464):1054-1061.

20. Pasquier F. Identification et fonction de nouvelles mutations des récepteurs à la thrombopoïétine et à l'érythropoïétine dans les néoplasmes myéloprolifératifs et les érythrocytoses. [Internet] [phdthesis]. Université Paris-Saclay; 2015 [cité 16 nov 2016]. Disponible sur: <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01325233/document>
21. Silvennoinen O, Ungureanu D, Niranjan Y, Hammaren H, Bandaranayake R, Hubbard SR. New insights into the structure and function of the pseudokinase domain in JAK2. *Biochemical Society Transactions*. 1 août 2013;41(4):1002–7.
22. Besancenot R, Roos-Weil D, Tonetti C, Abdelouahab H, Lacout C, Pasquier F, et al. JAK2 and MPL protein levels determine TPO-induced megakaryocyte proliferation vs differentiation. *Blood*. 25 sept 2014;124(13):2104–15.
23. Chauveau A, Ianotto J-C, Ugo V, Lippert E. Mutations de la calréticuline dans les syndromes myéloprolifératifs: le chaînon manquant? *Hématologie*. 2014;20(1):15–19.
24. Tefferi A, Lasho TL, Finke CM, Knudson RA, Ketterling R, Hanson CH, et al. CALR vs JAK2 vs MPL-mutated or triple-negative myelofibrosis: clinical, cytogenetic and molecular comparisons. *Leukemia*. 1 juill 2014;28(7):1472–7.
25. Rotunno G, Mannarelli C, Guglielmelli P, Pacilli A, Pancrazzi A, Pieri L, et al. Impact of calreticulin mutations on clinical and hematological phenotype and outcome in essential thrombocythemia. *Blood*. 6 mars 2014;123(10):1552–5.
26. Rashid M, Ahmed RZ, Ahmed S, Nadeem M, Ahmed N, Shamsi TS. Coexisting JAK2V617F and CALR Exon 9 Mutation in Essential Thrombocythemia. *Indian J Hematol Blood Transfus*. 9 févr 2016;32(1):112–6.
27. Zamora L, Xicoy B, Cabezón M, Fernandez C, Marcé S, Velez P, et al. Co-existence of JAK2 V617F and CALR mutations in primary myelofibrosis. *Leukemia & Lymphoma*. 3 oct 2015;56(10):2973–4.
28. Ortmann CA, Kent DG, Nangalia J, Silber Y, Wedge DC, Grinfeld J, et al. Effect of Mutation Order on Myeloproliferative Neoplasms. *New England Journal of Medicine*. 12 févr 2015;372(7):601–12.
29. Pardanani A, Elala Y, He R, Hanson CA, Tefferi A. Peripheral Blood JAK2V617F Quantitative Assessment in Clinical Practice: Correlations Between Allele Burden and Clinical Phenotype. *Blood*. 3 déc 2015;126(23):2819–2819.
30. Lundberg P, Takizawa H, Kubovcakova L, Guo G, Hao-Shen H, Dirnhofer S, et al. Myeloproliferative neoplasms can be initiated from a single hematopoietic stem cell expressing JAK2-V617F. *J Exp Med*. 20 oct 2014;211(11):2213–30.
31. Landolfi R, Di Gennaro L, Falanga A. Thrombosis in myeloproliferative disorders: pathogenetic facts and speculation. *Leukemia*. 18 sept 2008;22(11):2020–8.
32. Le Gall-Ianotto C, Le Calloch R, Mollard L-M, Misery L, Ianotto J-C. Thrombocythémie essentielle avec prurit aquagénique : une entité plus agressive au diagnostic et une forte morbidité au cours du suivi. *Annales de Dermatologie et de Vénéréologie*. déc 2016;143(12, Supplément):S162.
33. Tefferi A, Barbui T. Essential Thrombocythemia and Polycythemia Vera: Focus on Clinical Practice. *Mayo Clinic Proceedings*. sept 2015;90(9):1283–93.
34. Barbui T, Barosi G, Birgegard G, Cervantes F, Finazzi G, Griesshammer M, et al. Philadelphia-Negative Classical Myeloproliferative Neoplasms: Critical Concepts and Management Recommendations From European LeukemiaNet. *JCO*. 20 févr 2011;29(6):761–70.
35. Barbui T, Finazzi G, Carobbio A, Thiele J, Passamonti F, Rumi E, et al. Development and validation of an International Prognostic Score of thrombosis in World Health Organization-essential thrombocythemia (IPSET-thrombosis). *Blood*. 20 déc 2012;120(26):5128–33.
36. Elliott MA, Tefferi A. Thrombosis and haemorrhage in polycythaemia vera and essential thrombocythaemia. *British Journal of Haematology*. 1 févr 2005;128(3):275–90.
37. Finazzi G. Acute leukemia in polycythemia vera: an analysis of 1638 patients enrolled in a prospective observational study. *Blood*. 1 avr 2005;105(7):2664–70.
38. Carobbio A, Thiele J, Passamonti F, Rumi E, Ruggeri M, Rodeghiero F, et al. Risk factors for arterial and venous thrombosis in WHO-defined essential thrombocythemia: an international study of 891 patients. *Blood*. 2 juin 2011;117(22):5857–9.
39. Alvarez-Larrán A, Pereira A, Cervantes F, Arellano-Rodrigo E, Hernández-Boluda J-C, Ferrer-Marín F, et al. Assessment and prognostic value of the European LeukemiaNet criteria for clinicohematologic

- response, resistance, and intolerance to hydroxyurea in polycythemia vera. *Blood*. 9 févr 2012;119(6):1363- 9.
40. Kiladjian J-J, Giraudier S, Cassinat B. Interferon-alpha for the therapy of myeloproliferative neoplasms: targeting the malignant clone. *Leukemia*. 1 avr 2016;30(4):776- 81.
 41. Vannucchi AM, Kiladjian JJ, Griesshammer M, Masszi T, Durrant S, Passamonti F, et al. Ruxolitinib versus Standard Therapy for the Treatment of Polycythemia Vera. *New England Journal of Medicine*. 29 janv 2015;372(5):426- 35.
 42. Chargaff E, West R. The biological significance of the thromboplastic protein of blood. *J Biol Chem*. nov 1946;166(1):189- 97.
 43. O'Brien JR. The Platelet-like Activity of Serum. *British journal of haematology*. 1955;1(2):223-228.
 44. Wolf P. The nature and significance of platelet products in human plasma. *British journal of haematology*. 1967;13(3):269-288.
 45. Cooper RA, Jandl JH. The selective and conjoint loss of red cell lipids. *J Clin Invest*. mai 1969;48(5):906- 14.
 46. Crawford N. The Presence of Contractile Proteins in Platelet Microparticles Isolated from Human and Animal Platelet-free Plasma. *British journal of haematology*. 1971;21(1):53-69.
 47. Boulanger CM, Amabile N, Tedgui A. Circulating Microparticles: A Potential Prognostic Marker for Atherosclerotic Vascular Disease. *Hypertension*. 1 août 2006;48(2):180- 6.
 48. MacDonald RI, MacDonald RC. ASSEMBLY OF PHOSPHOLIPID VESICLES BEARING SIALOGLYCOPROTEIN FROM ERYTHROCYTE-MEMBRANE. *JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*. 1975;250(23):9206-9214.
 49. Hamilton KK, Hattori R, Esmon CT, Sims PJ. Complement proteins C5b-9 induce vesiculation of the endothelial plasma membrane and expose catalytic surface for assembly of the prothrombinase enzyme complex. *J Biol Chem*. 3 mai 1990;265(7):3809- 14.
 50. Combes V, Simon A-C, Grau G-E, Arnoux D, Camoin L, Sabatier F, et al. In vitro generation of endothelial microparticles and possible prothrombotic activity in patients with lupus anticoagulant. *Journal of Clinical Investigation*. 1 juill 1999;104(1):93- 102.
 51. Buzas EI, György B, Nagy G, Falus A, Gay S. Emerging role of extracellular vesicles in inflammatory diseases. 2014 [cité 21 juill 2016]; Disponible sur: https://www.researchgate.net/profile/Edit_Buzas2/publication/260242085_Emerging_role_of_extracellular_vesicles_in_inflammatory_diseases/links/0c960530a3afab2c26000000.pdf
 52. Burnouf T, Goubran HA, Chou M-L, Devos D, Radosevic M. Platelet microparticles: Detection and assessment of their paradoxical functional roles in disease and regenerative medicine. *Blood Reviews*. 1 juill 2014;28(4):155- 66.
 53. Flaumenhaft R. Formation and fate of platelet microparticles. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*. mars 2006;36(2):182- 7.
 54. Piccin A, Murphy WG, Smith OP. Circulating microparticles: pathophysiology and clinical implications. *Blood Reviews*. 1 mai 2007;21(3):157- 71.
 55. Société Internationale de Thrombose et d'Hémostase (ISTH). 51st Annual Scientific and Standardization Committee Meeting. In Sydney, Australia; 2005.
 56. Pol E van der, Böing AN, Harrison P, Sturk A, Nieuwland R. Classification, Functions, and Clinical Relevance of Extracellular Vesicles. *Pharmacol Rev*. 7 janv 2012;64(3):676- 705.
 57. Arraud N, Linares R, Tan S, Gounou C, Pasquet J-M, Mornet S, et al. Extracellular vesicles from blood plasma: determination of their morphology, size, phenotype and concentration. *J Thromb Haemost*. 1 mai 2014;12(5):614- 27.
 58. Horstman LL, Ahn YS. Platelet microparticles: a wide-angle perspective. *Critical reviews in oncology/hematology*. 1999;30(2):111-142.
 59. Boillard E, Duchez A-C, Brisson A. The diversity of platelet microparticles: Current Opinion in Hematology. sept 2015;22(5):437- 44.
 60. Flaumenhaft R, Dilks JR, Richardson J, Alden E, Patel-Hett SR, Battinelli E, et al. Megakaryocyte-derived microparticles: direct visualization and distinction from platelet-derived microparticles. *Blood*. 29 janv 2009;113(5):1112- 21.

61. J. Simpson R, Mathivanan S. Extracellular Microvesicles: The Need for Internationally Recognised Nomenclature and Stringent Purification Criteria. *Journal of Proteomics & Bioinformatics* [Internet]. 2012 [cité 3 juin 2016];05(02). Disponible sur: <http://www.omicsonline.org/0974-276X/JPB-05-Editorial10.digital/JPB-05-Editorial10.html>
62. Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol.* 18 févr 2013;200(4):373– 83.
63. van der Pol E, Böing AN, Gool EL, Nieuwland R. Recent developments in the nomenclature, presence, isolation, detection and clinical impact of extracellular vesicles. *J Thromb Haemost.* 1 janv 2016;14(1):48– 56.
64. Balducci E, Cointe S, Lacroix R, Sabatier F, Dignat-George F. Microparticules circulantes, acteurs et marqueurs émergents en pathologie humaine. *Revue Francophone des Laboratoires.* 2012;2012(443):29–38.
65. Simpson RJ, Lim JW, Moritz RL, Mathivanan S. Exosomes: proteomic insights and diagnostic potential. Expert review of proteomics. 2009;6(3):267–283.
66. Hristov M, Erl W, Linder S, Weber PC. Apoptotic bodies from endothelial cells enhance the number and initiate the differentiation of human endothelial progenitor cells in vitro. *Blood.* 2004;104(9):2761– 2766.
67. Zwaal RFA, Schroit AJ. Pathophysiologic Implications of Membrane Phospholipid Asymmetry in Blood Cells. *Blood.* 15 févr 1997;89(4):1121– 32.
68. Martínez MC, Kunzelmann C, Freyssinet J-M. Remodelage de la membrane plasmique et stimulation cellulaire. *M/S : médecine sciences.* 2004;20(2):189– 95.
69. Kierszenbaum AL. Histologie et biologie cellulaire: Une introduction à l'anatomie pathologique. De Boeck Supérieur; 2006. 646 p.
70. Zachowski A. Phospholipids in animal eukaryotic membranes: transverse asymmetry and movement. *Biochemical Journal.* 1993;294(Pt 1):1.
71. Diaz C, Schroit AJ. Role of Translocases in the Generation of Phosphatidylserine Asymmetry. *J Membrane Biol.* mai 1996;151(1):1– 9.
72. Connor J, Pak CH, Zwaal RF, Schroit AJ. Bidirectional transbilayer movement of phospholipid analogs in human red blood cells. Evidence for an ATP-dependent and protein-mediated process. *Journal of Biological Chemistry.* 1992;267(27):19412–19417.
73. Sims PJ, Wiedmer T. Unraveling the Mysteries of Phospholipid Scrambling. *Thromb Haemost.* 2001;86(1):266– 75.
74. Burnier L, Fontana P, Kwak BR, Angelillo-Scherrer A, others. Cell-derived microparticles in haemostasis and vascular medicine. *Thrombosis and haemostasis.* 2009;101(3):439–451.
75. Fox JE, Austin CD, Reynolds CC, Steffen PK. Evidence that agonist-induced activation of calpain causes the shedding of procoagulant-containing microvesicles from the membrane of aggregating platelets. *Journal of Biological Chemistry.* 1991;266(20):13289–13295.
76. Fox JE, Austin CD, Boyles JK, Steffen PK. Role of the membrane skeleton in preventing the shedding of procoagulant-rich microvesicles from the platelet plasma membrane. *The Journal of cell biology.* 1990;111(2):483–493.
77. Cunningham CC. Actin polymerization and intracellular solvent flow in cell surface blebbing. *The Journal of Cell Biology.* 1995;129(6):1589–1599.
78. Coleman ML, Sahai EA, Yeo M, Bosch M, Dewar A, Olson MF. Membrane blebbing during apoptosis results from caspase-mediated activation of ROCK I. *Nature cell biology.* 2001;3(4):339–345.
79. Sebbagh M, Renvoizé C, Hamelin J, Riché N, Bertoglio J, Bréard J. Caspase-3-mediated cleavage of ROCK I induces MLC phosphorylation and apoptotic membrane blebbing. *Nature cell biology.* 2001;3(4):346– 352.
80. Rank A, Nieuwland R, Crispin A, Grützner S, Iberer M, Toth B, et al. Clearance of platelet microparticles in vivo. *Platelets.* 1 mars 2011;22(2):111– 6.
81. Rand ML, Wang H, Bang KWA, Packham MA, Freedman J. Rapid clearance of procoagulant platelet-derived microparticles from the circulation of rabbits. *Journal of Thrombosis and Haemostasis.* 2006;4(7):1621–1623.

82. Owens AP, Mackman N. Microparticles in Hemostasis and Thrombosis. *Circ Res*. 13 mai 2011;108(10):1284–97.
83. Wu Y, Tibrewal N, Birge RB. Phosphatidylserine recognition by phagocytes: a view to a kill. *Trends in cell biology*. 2006;16(4):189–197.
84. Bernimoulin M, Waters EK, Foy M, Steele BM, Sullivan M, Falet H, et al. Differential stimulation of monocytic cells results in distinct populations of microparticles. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 1 juin 2009;7(6):1019–28.
85. Tschöepe D, Spangenberg P, Esser J, Schwippert B, Kehrel B, Roesen P, et al. Flow-cytometric detection of surface membrane alterations and concomitant changes in the cytoskeletal actin status of activated platelets. *Cytometry*. 1990;11(5):652–656.
86. Jimenez Joaquin J, Wenche J, Mauro Lucia M, Carl S, Horstman Lawrence L, others. Endothelial cells release phenotypically and quantitatively distinct microparticles in activation and apoptosis. 2003 [cité 8 juin 2016]; Disponible sur: <http://210.75.249.4/handle/363003/1410>
87. Smalley DM, Root KE, Cho H, Ross MM, Ley K, others. Proteomic discovery of 21 proteins expressed in human plasma-derived but not platelet-derived microparticles. *THROMBOSIS AND HAEMOSTASIS-STUTTGART*. 2007;97(1):67.
88. Choi D-S, Lee J-M, Park GW, Lim H-W, Bang JY, Kim Y-K, et al. Proteomic analysis of microvesicles derived from human colorectal cancer cells. *Journal of proteome research*. 2007;6(12):4646–4655.
89. Hargett LA, Bauer NN. On the origin of microparticles: From « platelet dust » to mediators of intercellular communication. *Pulmonary Circulation*. avr 2013;3(2):329–40.
90. Morel O, Morel N, Hugel B, Jesel L, Vinzio S, Goichot B, et al. Les microparticules circulantes: rôles physiologiques et implications dans les maladies inflammatoires et thrombotiques. *La Revue de médecine interne*. 2005;26(10):791–801.
91. Rosing J, Tans G, Govers-Riemslog JW, Zwaal RF, Hemker HC. The role of phospholipids and factor Va in the prothrombinase complex. *J Biol Chem*. 1 oct 1980;255(1):274–83.
92. Bevers EM, Comfurius P, Van Rijn JLML, Hemker HC. Generation of Prothrombin-Converting Activity and the Exposure of Phosphatidylserine at the Outer Surface of Platelets. *European Journal of Biochemistry*. 1 févr 1982;122(2):429–36.
93. Pereira J, Alfaro G, Goycoolea M, Quiroga T, Ocqueteau M, Massardo L, et al. Circulating platelet-derived microparticles in systemic lupus erythematosus. *Thromb Haemost*. 2006;95:94–99.
94. Mackman N, Luther T. Platelet tissue factor: To be or not to be. *Thrombosis Research*. 1 juill 2013;132(1):3–5.
95. Pierre-Emmanuel Rautou, Nigel Mackman. Extracellular Vesicles and Tissue Factor. In: *Extracellular Vesicles in Health and Disease* [Internet]. Pan Stanford Publishing; 2014 [cité 13 juill 2016]. p. 337–56. Disponible sur: <http://www.crcnetbase.com/doi/abs/10.1201/b15647-15>
96. Gardiner C, Harrison P, Belting M, Böing A, Campello E, Carter BS, et al. Extracellular vesicles, tissue factor, cancer and thrombosis – discussion themes of the ISEV 2014 Educational Day. *J Extracell Vesicles* [Internet]. 13 mars 2015 [cité 20 juill 2016];4. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4359985/>
97. Müller I, Klocke A, Alex M, Kotzsch M, Luther T, Morgenstern E, et al. Intravascular tissue factor initiates coagulation via circulating microvesicles and platelets. *FASEB J*. 3 janv 2003;17(3):476–8.
98. Schwertz H, Tolley ND, Foulks JM, Denis MM, Risenmay BW, Buerke M, et al. Signal-dependent splicing of tissue factor pre-mRNA modulates the thrombogenicity of human platelets. *Journal of Experimental Medicine*. 30 oct 2006;203(11):2433–40.
99. Jy W, Jimenez JJ, Mauro LM, Horstman LL, Cheng P, Ahn ER, et al. Endothelial microparticles induce formation of platelet aggregates via a von Willebrand factor/ristocetin dependent pathway, rendering them resistant to dissociation. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 1 juin 2005;3(6):1301–8.
100. Andrews RK, Berndt MC. Platelet physiology and thrombosis. *Thrombosis research*. 2004;114(5):447–453.
101. Pérez-Casal M, Downey C, Cutillas-Moreno B, Zuzel M, Fukudome K, Toh CH. Microparticle-associated endothelial protein C receptor and the induction of cytoprotective and anti-inflammatory effects. *haematologica*. 2009;94(3):387–394.

102. Lacroix R, Dignat-George F. Microparticles as a circulating source of procoagulant and fibrinolytic activities in the circulation. *Thrombosis Research*. mai 2012;129:S27- 9.
103. Nomura S, Tandon NN, Nakamura T, Cone J, Fukuhara S, Kambayashi J. High-shear-stress-induced activation of platelets and microparticles enhances expression of cell adhesion molecules in THP-1 and endothelial cells. *Atherosclerosis*. 2001;158(2):277-287.
104. Furchgott RF, Zawadzki JV, others. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*. 1980;288(5789):373-376.
105. Brodsky SV, Zhang F, Nasjletti A, Goligorsky MS. Endothelium-derived microparticles impair endothelial function in vitro. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2004;286(5):H1910-H1915.
106. Boulanger CM, Scoazec A, Ebrahimian T, Henry P, Mathieu E, Tedgui A, et al. Circulating microparticles from patients with myocardial infarction cause endothelial dysfunction. *Circulation*. 2001;104(22):2649-2652.
107. Pfister SL. Role of Platelet Microparticles in the Production of Thromboxane by Rabbit Pulmonary Artery. *Hypertension*. 2 janv 2004;43(2):428- 33.
108. Watanabe J, Marathe GK, Neilsen PO, Weyrich AS, Harrison KA, Murphy RC, et al. Endotoxins Stimulate Neutrophil Adhesion Followed by Synthesis and Release of Platelet-activating Factor in Microparticles. *J Biol Chem*. 29 août 2003;278(35):33161- 8.
109. Barry OP, Praticò D, Savani RC, FitzGerald GA. Modulation of monocyte-endothelial cell interactions by platelet microparticles. *J Clin Invest*. 1 juill 1998;102(1):136- 44.
110. Taraboletti G, D'Ascenzo S, Borsotti P, Giavazzi R, Pavan A, Dolo V. Shedding of the matrix metalloproteinases MMP-2, MMP-9, and MT1-MMP as membrane vesicle-associated components by endothelial cells. *The American journal of pathology*. 2002;160(2):673-680.
111. Bi J, Koivisto L, Owen G, Huang P, Wang Z, Shen Y, et al. Epithelial Microvesicles Promote an Inflammatory Phenotype in Fibroblasts. *J DENT RES*. 24 févr 2016;0022034516633172.
112. Brill A, Dashevsky O, Rivo J, Gozal Y, Varon D. Platelet-derived microparticles induce angiogenesis and stimulate post-ischemic revascularization. *Cardiovascular research*. 2005;67(1):30-38.
113. Benameur T, Soleti R, Porro C, Andriantsitohaina R, Martínez MC. Microparticles Carrying Sonic Hedgehog Favor Neovascularization through the Activation of Nitric Oxide Pathway in Mice. *PLOS ONE*. 13 sept 2010;5(9):e12688.
114. Kim CW, Lee HM, Lee TH, Kang C, Kleinman HK, Gho YS. Extracellular Membrane Vesicles from Tumor Cells Promote Angiogenesis via Sphingomyelin. *Cancer Res*. 1 nov 2002;62(21):6312- 7.
115. Abrahams VM, Straszewski-Chavez SL, Guller S, Mor G. First trimester trophoblast cells secrete Fas ligand which induces immune cell apoptosis. *Molecular human reproduction*. 2004;10(1):55-63.
116. Abrahams VM, Straszewski SL, Kamsteeg M, Hanczaruk B, Schwartz PE, Rutherford TJ, et al. Epithelial Ovarian Cancer Cells Secrete Functional Fas Ligand. *Cancer Res*. 1 sept 2003;63(17):5573- 81.
117. Al-Nedawi K, Meehan B, Micallef J, Lhotak V, May L, Guha A, et al. Intercellular transfer of the oncogenic receptor EGFRvIII by microvesicles derived from tumour cells. *Nat Cell Biol*. mai 2008;10(5):619- 24.
118. Ratajczak J, Wysoczynski M, Hayek F, Janowska-Wieczorek A, Ratajczak MZ. Membrane-derived microvesicles: important and underappreciated mediators of cell-to-cell communication. *Leukemia*. sept 2006;20(9):1487- 95.
119. Liu S, Hossinger A, Hofmann JP, Denner P, Vorberg IM. Horizontal Transmission of Cytosolic Sup35 Prions by Extracellular Vesicles. *mBio*. 9 juill 2016;7(4):e00915-16.
120. Kalra H, Drummen GPC, Mathivanan S. Focus on Extracellular Vesicles: Introducing the Next Small Big Thing. *Int J Mol Sci [Internet]*. 6 févr 2016 [cité 20 juill 2016];17(2). Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4783904/>
121. Mack M, Kleinschmidt A, Brühl H, Klier C, Nelson PJ, Cihak J, et al. Transfer of the chemokine receptor CCR5 between cells by membrane-derived microparticles: A mechanism for cellular human immunodeficiency virus 1 infection. *Nat Med*. juill 2000;6(7):769- 75.
122. Inform FP. Co-Receptors: CCR5 -- Understanding HIV [Internet]. *TheBodyPRO.com*. [cité 21 juin 2016]. Disponible sur: <http://www.thebodypro.com/content/art4978.html>

123. Camussi G, Deregibus MC, Bruno S, Cantaluppi V, Biancone L. Exosomes/microvesicles as a mechanism of cell-to-cell communication. *Kidney international*. 2010;78(9):838–848.
124. Yuan A, Farber EL, Rapoport AL, Tejada D, Deniskin R, Akhmedov NB, et al. Transfer of MicroRNAs by Embryonic Stem Cell Microvesicles. *PLOS ONE*. 6 mars 2009;4(3):e4722.
125. Sarkar A, Mitra S, Mehta S, Raices R, Wewers MD. Monocyte derived microvesicles deliver a cell death message via encapsulated caspase-1. *PloS one*. 2009;4(9):e7140.
126. Ridder K, Keller S, Dams M, Rupp A-K, Schlaudraff J, Turco DD, et al. Extracellular Vesicle-Mediated Transfer of Genetic Information between the Hematopoietic System and the Brain in Response to Inflammation. *PLOS Biol*. 3 juin 2014;12(6):e1001874.
127. Ridder K, Sevko A, Heide J, Dams M, Rupp A-K, Macas J, et al. Extracellular vesicle-mediated transfer of functional RNA in the tumor microenvironment. *Oncolmmunology*. 3 juin 2015;4(6):e1008371.
128. Jy W, Tinoco G, Dinali ME, Bidot C, Horstman LL, Dudkiewicz P, et al. Elevated Red Cell Microparticles (RMP) in Hematologic and Thrombotic Disorders. *Blood*. 3 déc 2015;126(23):3553–3553.
129. Tzoran I, Rebibo-Sabbah A, Brenner B, Aharon A. Disease dynamics in patients with acute myeloid leukemia: New biomarkers. *Experimental Hematology*. nov 2015;43(11):936–43.
130. Charpentier A. Enumeration of Circulating Platelet-Derived Microparticles Clearly Separates PV and ET From Secondary Polycythemia or Thrombocytosis. In San Diego; 2011. Disponible sur: <https://ash.confex.com/ash/2011/webprogram/Paper41781.html>
131. Campello E, Spiezia L, Radu CM, Simioni P. Microparticles as biomarkers of venous thromboembolic events. *Biomarkers Med*. 24 juin 2016;10(7):743–55.
132. Kissová J, Ovesná P, Babáčková G, Zavřelová J, Bulíková A, Penka M. Procoagulant activity of circulating microparticles and thrombotic complications of BCR/ABL negative myeloproliferative disorders. 2015 [cité 25 juill 2016]; Disponible sur: <http://www.muni.cz/research/publications/1316812>
133. Chillemi A, Quarona V, Zito A, Morandi F, Marimpietri D, Cuccioloni M, et al. Generation and Characterization of Microvesicles after Daratumumab Interaction with Myeloma Cells. *Blood*. 3 déc 2015;126(23):1849–1849.
134. Petrik J, Seghatchian J. Big things from small packages: the multifaceted roles of extracellular vesicles in the components quality, therapy and infection. *Transfusion and Apheresis Science* [Internet]. juill 2016 [cité 21 juill 2016]; Disponible sur: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1473050216300763>
135. György B, Szabó TG, Pásztói M, Pál Z, Misják P, Aradi B, et al. Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. *Cell Mol Life Sci*. 11 mai 2011;68(16):2667–88.
136. Wen S, Cheng Y, Dooner M, Pereira M, Tatto MD, Papa E, et al. Biological Effects of Different Extracellular Vesicles Population on Reversal of Marrow Cells Radiation Damage. *Blood*. 3 déc 2015;126(23):3598–3598.
137. Simak J, Holada K, Risitano AM, Zivny JH, Young NS, Vostal JG. Elevated circulating endothelial membrane microparticles in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *British journal of haematology*. 2004;125(6):804–813.
138. Shet AS, Aras O, Gupta K, Hass MJ, Rausch DJ, Saba N, et al. Sick blood contains tissue factor–positive microparticles derived from endothelial cells and monocytes. *Blood*. 2003;102(7):2678–2683.
139. Hamali H, Elhussein O, Jamil A, Hussain S, Alshraim M, Alshehri A. Elevated levels of pro-coagulant microvesicles in children in-steady state sickle cell disease. *Journal of Applied Hematology*. 2015;6(3):115.
140. Tantawy AA, Matter RM, Hamed AA, Shams El Din El Telbany MA. Platelet microparticles in immune thrombocytopenic purpura in pediatrics. *Pediatric hematology and oncology*. 2010;27(4):283–296.
141. Jimenez JJ, Jy W, Mauro LM, Horstman LL, Soderland C, Ahn YS. Endothelial microparticles released in thrombotic thrombocytopenic purpura express von Willebrand factor and markers of endothelial activation. *British journal of haematology*. 2003;123(5):896–902.
142. Tintillier-Colin V, Cambier N, Charpentier A, Bourgeois-Petit E, Rose C, Forzy G, et al. Elevated Circulating Platelet-Derived Microparticles in Ph1 Negative Chronic Myeloproliferative Disorders. *Blood*. 20 nov 2009;114(22):1906–1906.
143. Charpentier A, Lebreton A, Rauch A, Bauters A, Trillot N, Nibourel O, et al. Microparticles phenotypes are associated with driver mutations and distinct thrombotic risks in Essential Thrombocythaemia.

- Haematologica [Internet]. 31 mai 2016 [cité 25 juill 2016]; Disponible sur: <http://www.haematologica.org/cgi/doi/10.3324/haematol.2016.144279>
144. Trappenburg MC, van Schilfgaarde M, Marchetti M, Spronk HM, Cate H t., Leyte A, et al. Elevated procoagulant microparticles expressing endothelial and platelet markers in essential thrombocythemia. *Haematologica*. 1 juill 2009;94(7):911- 8.
 145. Gerotziafas GT, Zagouri F, Fotiou D, Sergeantanis TN, Stamatelopoulos K, Psaltopoulou T, et al. Newly Diagnosed Multiple Myeloma Is Associated with Enhanced TF Pathway Activation, Thrombin Generation and Increased Concentration of Procoagulant Microparticles. *Blood*. 3 déc 2015;126(23):1074 - 1074.
 146. Smallwood DT, Apollonio B, Willimott S, Lezina L, Alharthi A, Ambrose AR, et al. Extracellular vesicles released by CD40/IL-4 stimulated chronic lymphocytic leukemia cells confer altered functional properties to CD4+ T cells. *Blood*. 1 janv 2016;blood-2015-11-682377.
 147. Villmow T, Kemkes-Matthes B, Matzdorff AC. Markers of platelet activation and platelet-leukocyte interaction in patients with myeloproliferative syndromes. *Thrombosis Research*. 1 nov 2002;108(2):139- 45.
 148. Tan X, Shi J, Fu Y, Gao C, Yang X, Li J, et al. Role of erythrocytes and platelets in the hypercoagulable status in polycythemia vera through phosphatidylserine exposure and microparticle generation. *Thromb Haemost*. 2013;109(6):1025- 32.
 149. Kroll MH, Michaelis LC, Verstovsek S. Mechanisms of thrombogenesis in polycythemia vera. *Blood Reviews*. juill 2015;29(4):215- 21.
 150. Marchetti M, Tartari CJ, Russo L, Panova-Noeva M, Leuzzi A, Rambaldi A, et al. Phospholipid-dependent procoagulant activity is highly expressed by circulating microparticles in patients with essential thrombocythemia. *Am J Hematol*. 1 janv 2014;89(1):68- 73.
 151. Han Y, Zhao S, Zhang W, Cen J, Zhang W, Qiu H, et al. Clinical Significance Of Circulating Microparticles In Ph- Myeloproliferative Neoplasms (MPN). *Blood*. 15 nov 2013;122(21):2368- 2368.
 152. Kissova, Ovesna, Bulikova, Zavřelova, Penka. Increasing procoagulant activity of circulating microparticles in patients with Philadelphia-negative myeloproliferative neoplasms: a single-centre experience. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2015 2015;26(4):448- 53.
 153. Italiano JE, Mairuhu ATA, Flaumenhaft R. Clinical Relevance of Microparticles from Platelets and Megakaryocytes. *Curr Opin Hematol*. nov 2010;17(6):578- 84.
 154. Carobbio A, Finazzi G, Guerini V, Spinelli O, Delaini F, Marchioli R, et al. Leukocytosis is a risk factor for thrombosis in essential thrombocythemia: interaction with treatment, standard risk factors, and Jak2 mutation status. *Blood*. 2007;109(6):2310-2313.
 155. Cortelazzo S, Finazzi G, Ruggeri M, Vestri O, Galli M, Rodeghiero F, et al. Hydroxyurea for Patients with Essential Thrombocythemia and a High Risk of Thrombosis. *New England Journal of Medicine*. 27 avr 1995;332(17):1132- 7.
 156. Barosi G, Mesa R, Finazzi G, Harrison C, Kiladjian J-J, Lengfelder E, et al. Revised response criteria for polycythemia vera and essential thrombocythemia: an ELN and IWG-MRT consensus project. *Blood*. 6 juin 2013;121(23):4778- 81.
 157. Robert S, Poncelet P, Lacroix R, Arnaud L, Giraudo L, Hauchard A, et al. Standardization of platelet-derived microparticle counting using calibrated beads and a Cytomics FC500 routine flow cytometer: a first step towards multicenter studies? *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 1 janv 2009;7(1):190- 7.
 158. Cointe S, Judicone C, Robert S, Mooberry MJ, Poncelet P, Wauben M, et al. Standardization of microparticle enumeration across different flow cytometry platforms: results of a multicenter collaborative workshop. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* [Internet]. nov 2016 [cité 2 janv 2017]; Disponible sur: <http://doi.wiley.com/10.1111/jth.13514>
 159. Poncelet P, Robert S, Bouriche T, Bez J, Lacroix R, Dignat-George F. Standardized counting of circulating platelet microparticles using currently available flow cytometers and scatter-based triggering: Forward or side scatter?: Standardization of Microparticle Counts. *Cytometry Part A*. févr 2016;89(2):148- 58.
 160. Watson PF, Petrie A. Method agreement analysis: A review of correct methodology. *Theriogenology*. juin 2010;73(9):1167- 79.
 161. Giavarina D. Understanding Bland Altman analysis. *Biochimica Medica*. 2015;25(2):141- 51.

162. Robert S, Lacroix R, Poncelet P, Harhour K, Bouriche T, Judicone C, et al. High-Sensitivity Flow Cytometry Provides Access to Standardized Measurement of Small-Size Microparticles—Brief Report. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 1 avr 2012;32(4):1054–8.
163. Poncelet P, Robert S, Bailly N, Garnache-Ottou F, Bouriche T, Devalet B, et al. Tips and tricks for flow cytometry-based analysis and counting of microparticles. *Transfusion and Apheresis Science*. oct 2015;53(2):110–26.
164. Sarlon-Bartoli G, Bennis Y, Lacroix R, Piercecchi-Marti MD, Bartoli MA, Arnaud L, et al. Plasmatic level of leukocyte-derived microparticles is associated with unstable plaque in asymptomatic patients with high-grade carotid stenosis. *Journal of the American College of Cardiology*. 2013;62(16):1436–1441.

AUTEUR : Nom : THIBAUD**Prénom : Zoë****Date de Soutenance : Jeudi 23 mars 2017****Titre de la Thèse : Intérêt du dénombrement des microparticules plaquettaires par cytométrie en flux dans le suivi thérapeutique des patients atteints de néoplasies myéloprolifératives Phi négatives****Thèse - Médecine - Lille 2017****Cadre de classement : Hématologie – Cytométrie en flux****DES + spécialité : Biologie Médicale****Mots-clés : Microparticules, Microparticules plaquettaires, Syndromes myéloprolifératifs Phi négatifs, Polyglobulie de Vaquez, Thrombocytémie Essentielle, Cytométrie en flux, Hydrea**

Contexte : L'un des enjeux de la prise en charge des néoplasies myéloprolifératives Phi négatives (NMP) par traitement cytoréducteur (TC) est la gestion du risque thrombotique. Toutefois certains patients présentent des complications thrombotiques sous TC. Les microparticules plaquettaires (PMPs) sont libérées par bourgeonnement membranaire après activation ou apoptose cellulaire. Leur implication dans les mécanismes de thrombose a déjà été largement décrite.

Méthodes : 60 patients atteints de NMP et 40 témoins sains ont été inclus dans notre étude. Parmi les patients, 50 ont bénéficié d'un TC (groupe « traités »), tandis que 10 n'ont pas reçu de TC (groupe « non traités »). Les patients étaient suivis tous les 6 mois, et leurs PMPs étaient dénombrées par cytométrie en flux (Cytomics FC500) lors de chaque visite. Leur réponse au traitement a été évaluée après 6 et 12 mois de TC selon les critères proposés par Barosi.

Résultats : La concentration en PMPs au diagnostic était significativement supérieure dans le groupe NMP par rapport au groupe témoins, les médianes étaient respectivement de 2922/ μ L [1439–5054] et 335/ μ L [247–657], $p < 0,0001$. Nous avons observé dans le groupe « traités » une diminution significative des PMPs entre la visite de mise sous traitement (T0) et après 6 mois de traitement (T6) (médianes respectives : 2714/ μ L [1422-4419] et 1103/ μ L [595-1764], $p < 0,001$) tandis qu'il n'existait pas de diminution des PMPs dans le groupe « non traités » entre le diagnostic (T0) et après 6 mois de suivi (T6) (médianes respectives : 3355/ μ L [2261-4408] et 3195/ μ L [1311-5099], $p > 0,999$). Malgré la diminution des PMPs observée après mise sous TC chez les patients atteints de NMP, les concentrations en PMPs après 6 mois de traitement restaient supérieures aux valeurs de base mesurées chez les témoins sains, (médianes respectives : 1103/ μ L [595-1764] et 335/ μ L [246-657], $p < 0,001$). Il existait également une diminution significative des PMPs dans le groupe en réponse partielle au TC entre T0 et T6 (respectivement 2708/ μ L [1097-4737] et 899/ μ L [575-1420], $p < 0,001$), différence non observée dans le groupe en échec thérapeutique (2922/ μ L [1685-5054] et 1312/ μ L [714-3421], $p = 0,063$).

Conclusion : Dans les NMP, nos résultats suggèrent une diminution des PMPs sous TC et principalement chez les patients en bonne réponse au traitement. Ces résultats sont en faveur de l'hypothèse selon laquelle les PMPs pourraient être le reflet de la prolifération cellulaire et participer aux complications thrombotiques persistantes malgré un TC bien conduit.

Composition du Jury :**Président : Madame le Professeur Sophie SUSEN****Assesseurs : Monsieur le Professeur Claude PREUDHOMME****Madame le Docteur Nathalie CAMBIER****Madame le Professeur Agnès CHARPENTIER**