

**MEMOIRE
POUR LE DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES
DE BIOLOGIE MEDICALE**

**Soutenu publiquement le 11 avril 2013
Par Mlle Stéphanie BARRIERE**

**Conformément aux dispositions du Décret du 10 septembre 1990
tient lieu de**

THESE EN VUE DU DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

**Apport de la numération des microparticules plaquettaires par
cytométrie en flux pour le diagnostic des syndromes
myéloprolifératifs Ph1-.**

Membres du jury :

Président : **Monsieur le Professeur P. DUTHILLEUL**, Professeur des Universités,
Praticien Hospitalier, CH Valenciennes.

Assesseurs : **Monsieur le Professeur J-L DEMORY**, Professeur des Universités,
Praticien Hospitalier, CH-Saint Philibert et CH Saint-Vincent.
Madame le Docteur N. CAMBIER, Praticien Hospitalier, CH Saint-
Vincent.

Directeur de thèse : **Madame le Docteur A. CHARPENTIER**, Maître de conférence des
Universités, Praticien Hospitalier, CH Saint-Philibert.



**Faculté des Sciences Pharmaceutiques
et Biologiques de Lille**



**Université Lille 2
Droit et Santé**

3, rue du Professeur Laguesse - B.P. 83 - 59006 LILLE CEDEX

☎ 03.20.96.40.40 - 📠 : 03.20.96.43.64

<http://pharmacie.univ-lille2.fr>

Université Lille 2 – Droit et Santé

Président : Professeur Xavier VANDENDRIESSCHE
Vice- présidents : Professeur Alain DUROCHER
Professeur Régis BORDET
Professeur Patrick PELAYO
Professeur Frédéric LOBEZ
Professeur Monique CAPRON
Professeur Salem KACET
Madame Stéphanie DAMAREY
Monsieur Pierre RAVAUX
Monsieur Larbi AIT-HENNANI
Monsieur Edouard DANJOU

Directeur Général des Services : Monsieur Pierre-Marie ROBERT

Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Doyen : Professeur Luc DUBREUIL
Vice-Doyen, 1^{er} assesseur : Professeur Damien CUNY
Assesseurs : Mme Nadine ROGER
Professeur Philippe CHAVATTE
Chef des services administratifs : Monsieur André GENY

Liste des Professeurs des Universités :

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	ALIOUAT	El Moukhtar	Parasitologie
Mme	AZAROUAL	Nathalie	Physique
M.	BAILLEUL	François	Pharmacognosie
M.	BERTHELOT	Pascal	Chimie Thérapeutique 1
M.	CAZIN	Jean-Louis	Pharmacologie – Pharmacie clinique
M.	CHAVATTE	Philippe	Chimie Thérapeutique 2
M.	COURTECUISSÉ	Régis	Sciences végétales et fongiques
M.	CUNY	Damien	Sciences végétales et fongiques
Mme	DELBAERE	Stéphanie	Physique
M.	DEPREZ	Benoît	Chimie Générale
Mme	DEPREZ	Rebecca	Chimie Générale
M.	DUPONT	Frédéric	Sciences végétales et fongiques
M.	DURIEZ	Patrick	Physiologie
M.	GARÇON	Guillaume	Toxicologie
Mlle	GAYOT	Anne	Pharmacotechnie Industrielle
M.	GESQUIERE	Jean-Claude	Chimie Organique
M.	GOOSSENS	Jean François	Chimie Analytique
Mme	GRAS	Hélène	Chimie Thérapeutique 3

M.	LEMDANI	Mohamed	Biomathématiques
Mme	LESTAVEL	Sophie	Biologie Cellulaire
M.	LUC	Gerald	Physiologie
Mme	MELNYK	Patricia	Chimie thérapeutique 2
Mme	MUHR – TAILLEUX	Anne	Biochimie
Mme	PAUMELLE-LESTRELIN	Réjane	Biologie Cellulaire
Mme	PERROY – MAILLOLS	Anne Catherine	Droit et déontologie pharmaceutique
Mlle	ROMOND	Marie Bénédicte	Bactériologie
Mme	SAHPAZ	Sevser	Pharmacognosie
M.	SIEPMANN	Juergen	Pharmacotechnie Industrielle
M.	STAELS	Bart	Biologie Cellulaire
M	TARTAR	André	Chimie Organique
M.	VACCHER	Claude	Chimie Analytique

M.	MILLET	Régis	Chimie Thérapeutique (ICPAL)
----	--------	-------	------------------------------

Liste des Professeurs des Universités - Praticiens Hospitaliers

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	BROUSSEAU	Thierry	Biochimie
M.	BRUNET	Claude	Pharmacologie
Mme	CAPRON	Monique	Immunologie
M.	DECAUDIN	Bertrand	Pharmacie Galénique
M.	DINE	Thierry	Pharmacie clinique
M.	DUBREUIL	Luc	Bactériologie
M.	DUTHILLEUL	Patrick	Hématologie
M.	GRESSIER	Bernard	Pharmacologie
M.	LUYCKX	Michel	Pharmacie clinique
M.	ODOU	Pascal	Pharmacie Galénique
M.	DEPREUX	Patrick	Chimie Organique (ICPAL)

Liste des Maitres de Conférences

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	AGOURIDAS	Laurence	Chimie thérapeutique 2
Mme	ALIOUAT	Cécile Marie	Parasitologie
Mme	AUMERCIER	Pierrette	Biochimie
Mme	BANTUBUNGI	Kadiombo	Biologie cellulaire
Mme	BARTHELEMY	Christine	Pharmacie Galénique
M.	BEGHYN	Terence	Chimie Thérapeutique 3
Mme	BEHRA	Josette	Bactériologie
M.	BERTHET	Jérôme	Physique
M.	BERTIN	Benjamin	Immunologie
M.	BLANCHEMAIN	Nicolas	Pharmacotechnie industrielle
M.	BOCHU	Christophe	Physique
M.	BRIAND	Olivier	Biochimie
Mme	CACHERA	Claude	Biochimie
M.	CARATO	Pascal	Chimie Thérapeutique 2
M.	CARNOY	Christophe	Immunologie
Mme	CARON	Sandrine	Biologie cellulaire
Mlle	CHABÉ	Magali	Parasitologie
Mlle	CHARTON	Julie	Chimie Organique
M	CHEVALIER	Dany	Toxicologie
M.	COCHELARD	Dominique	Biomathématiques
Mme	DANEL	Cécile	Chimie Analytique
Mme	DEMANCHE	Christine	Parasitologie

Mlle	DEMARQUILLY	Catherine	Biomathématiques
Melle	DUMONT	Julie	Biologie cellulaire
M.	FARCE	Amaury	Chimie Thérapeutique 2
Mlle	FLIPO	Marion	Chimie Organique
Mme	FOULON	Catherine	Chimie Analytique
Mme	GARAT	Anne	Toxicologie
M.	GELEZ	Philippe	Biomathématiques
M.	GERVOIS	Philippe	Biochimie
Mme	GRAVE	Béatrice	Toxicologie
Mme	GROSS	Barbara	Biochimie
Mme	HANNOTHIAUX	Marie-Hélène	Toxicologie
Mme	HELLEBOID	Audrey	Physiologie
M.	HENNEBELLE	Thierry	Pharmacognosie
M.	HERMANN	Emmanuel	Immunologie
M.	KAMBIA	Kpakpaga Nicolas	Pharmacologie
M.	KARROUT	Youness	Pharmacotechnie Industrielle
Mlle	LALLOYER	Fanny	Biochimie
M.	LEBEGUE	Nicolas	Chimie thérapeutique 1
Mlle	LEONHARD	Julie	Droit et déontologie pharmaceutique
Mme	LIPKA	Emmanuelle	Chimie Analytique
Mme	LORIN-LECOEUR	Marie	Chimie Analytique
Mme	MARTIN	Françoise	Physiologie
M.	MOREAU	Pierre Arthur	Sciences végétales et fongiques
M.	MOUTON	Nicolas	Physique
Mme	MUSCHERT	Susanne	Pharmacotechnie industrielle
Mme	NEUT	Christel	Bactériologie
Mme	PINÇON	Claire	Biomathématiques
M.	PIVA	Frank	Biochimie
Melle	PLATEL	Anne	Toxicologie
M.	RAVAUX	Pierre	Biomathématiques
Mme	RIVIERE	Céline	Pharmacognosie
Mme	ROGER	Nadine	Immunologie
M.	ROUMY	Vincent	Pharmacognosie
M.	SERGHERAERT	Eric	Droit et déontologie pharmaceutique
Mme	SIEPMANN	Florence	Pharmacotechnie Industrielle
Mlle	SINGER	Elisabeth	Bactériologie
Mme	STANDAERT	Annie	Parasitologie
M.	TAGZIRT	Madjid	Hématologie
Mme	THUILLIER	Pascale	Hématologie
Mme	VANHOUTTE	Geneviève	Biochimie
M.	WELTI	Stéphane	Sciences végétales et fongiques
M.	WILLAND	Nicolas	Chimie organique
M.	YOUS	Saïd	Chimie Thérapeutique 1
M.	FURMAN	Christophe	Pharmacobiochimie (ICPAL)
Mme	GOOSSENS	Laurence	Chimie Organique (ICPAL)

Liste des Maitres de Conférences - Praticiens Hospitaliers

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	ALLORGE	Delphine	Toxicologie
Mme	BALDUYCK	Malika	Biochimie
Mme	GOFFARD	Anne	Bactériologie
M.	LANNOY	Damien	Pharmacie Galénique
Mme	ODOU	Marie Françoise	Bactériologie

Professeurs Agrégés

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	MAYES	Martine	Anglais
M.	MORGENROTH	Thomas	Droit et déontologie pharmaceutique

Professeurs Certifiés

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	HUGES	Dominique	Anglais
Mlle	FAUQUANT	Soline	Anglais
M.	OSTYN	Gaël	Anglais

Professeurs Associé - mi-temps

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	ABADIE	Eric	Droit et déontologie pharmaceutique

Maîtres de Conférences ASSOCIES - mi-temps

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	BERTOUX	Elisabeth	Pharmacie Clinique - Biomathématiques
M.	BRICOTEAU	Didier	Biomathématiques
M.	FIEVET	Pierre	Information Médicale
M.	FRIMAT	Bruno	Pharmacie Clinique
M.	MASCAUT	Daniel	Pharmacie Clinique
M.	WATRELOS	Michel	Droit et déontologie pharmaceutique
M.	ZANETTI	Sébastien	Biomathématiques

AHU

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	SIMON	Nicolas	Pharmacie Galénique



Université Lille 2
Droit et Santé

Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Lille

3, rue du Professeur Laguesse - B.P. 83 - 59006 LILLE CEDEX
Tel. : 03.20.96.40.40 - Télécopie : 03.20.96.43.64
<http://pharmacie.univ-lille2.fr>

L'Université n'entend donner aucune approbation aux opinions émises dans les thèses ; celles-ci sont propres à leurs auteurs.

A mon président de jury,

Monsieur le Professeur Patrick DUTHILLEUL

Professeur des Universités, Praticien Hospitalier
Chef de service du laboratoire d'Hématologie, Centre Hospitalier de Valenciennes

*Vous me faites l'honneur de présider ce jury de thèse.
Merci de m'avoir transmis vos connaissances en cytologie.
Soyez assuré de mon profond respect et de ma reconnaissance.*

A mes juges,

Madame le Professeur Nathalie CAMBIER

Praticien Hospitalier,
Service d'Onco-hématologie, Centre Hospitalier Saint-Vincent de Paul
Service des Maladies du Sang, CHRU de Lille

*Je vous remercie d'avoir collaboré à la réalisation de ce travail
et d'avoir accepté de participer à ce jury de thèse. Veuillez
trouver ici le témoignage de toute ma gratitude.*

Monsieur le Professeur Jean Loup DEMORY

Professeur des Universités, Praticien Hospitalier
Laboratoire d'Hématologie, Centre Hospitalier Saint-Philibert
Service d'Onco-hématologie, Centre Hospitalier Saint-Vincent de Paul

*Je vous remercie d'avoir collaboré à la réalisation de travail et de me faire l'honneur de participer au jury de cette thèse.
Merci de m'avoir fait partager votre expérience de clinicien et de biologiste en consultation et au laboratoire. Vos précieux conseils ont beaucoup apporté à ce travail. Veuillez trouver ici l'assurance de mon profond respect.*

A mon directeur de thèse,

Madame le Docteur Agnès Charpentier

Maître de Conférence des Universités, Praticien Hospitalier
Chef de service du laboratoire d'urgence, Centre Hospitalier Saint-Philibert

Je vous remercie d'avoir accepté de diriger cette thèse. Merci de m'avoir guidé et conseillé tout au long de ce travail. Merci enfin de m'avoir transmis vos connaissances et cytologie et en cytométrie en flux. Veuillez trouver ici le témoignage de toute ma gratitude.

A toutes les personnes qui ont collaboré à ce travail

Monsieur le Professeur Gérard Forzy

Merci pour votre disponibilité, votre aide et vos précieux conseils sur la partie statistique.

L'ensemble des techniciens en hématologie du laboratoire de Saint-Philibert

Merci d'avoir participé aux étapes de centrifugation.

A Gaëlle et Philippe

Merci de m'avoir formé à la numération des microparticules par cytométrie en flux.

A ma famille et mes amis,

A ma grand-mère Magguy

Qui était pharmacien comme moi et qui aimait venir s'asseoir près de moi quand je révisais.

A mes parents

*Merci de m'avoir donné les moyens de réussir et de m'avoir toujours encouragée et soutenue.
Merci papa pour les lectures et relectures.*

A mon frère Louis

Merci pour ta précieuse aide informatique et ta patience.

A Tim

Merci pour ton aide et ton soutien tout au long de cette thèse.

A tout le reste de ma famille

A mes copains de la fac : Adé ma binome, Shaina, Tutu et Fat mes copines de TP, Marjo, Laure, David, Richard, Emilie, Sabine.
A toutes ces belles années fac.

Aux autres copains : Caro ma copine d'enfance, Alex, Anne Laure, Mat.

A mes cointernes rouennaises : Angèle et Bérengère.

A ceux qui ont été mes cointernes à Lille, et particulièrement à Laura, Olivier, Rachid et Sophie.

A mes copines du tennis : Anne Claire, Céline C et Céline R et Marion.

Sommaire

LISTE DES ABREVIATIONS	5
I. GENERALITES	7
A. Les Syndromes Myéloprolifératifs chromosome Philadelphie négatifs	7
1) Epidémiologie	7
2) Physiopathologie	8
a) Les anomalies génétiques	8
b) Relation entre la mutation JAK2VF et les phénotypes cliniques	10
i. <i>Polyglobulie vraie</i>	10
ii. <i>Trombocytémie essentielle</i>	11
iii. <i>MFP</i>	11
3) Diagnostic	12
a) Diagnostic de polyglobulie primitive	13
b) Diagnostic de thrombocytémie essentielle	14
c) Diagnostic de myélofibrose primitive	15
4) Evolution, complications et facteurs pronostiques	16
a) Thrombocytémie Essentielle et Polyglobulie Vraie	16
i. <i>Complications thrombotiques</i>	16
ii. <i>Complications hémorragiques</i>	16
iii. <i>Transformation en leucémie aiguë</i>	17
iv. <i>Progression vers la myélofibrose</i>	17
v. <i>Score pronostique</i>	17
b) Myélofibrose Primitive	18
i. <i>Syndrome tumoral</i>	18
ii. <i>Evolution en leucémie aiguë</i>	18
iii. <i>Complications thrombotiques</i>	18
iv. <i>Autres complications</i>	19
v. <i>Scores pronostiques</i>	19
5) Traitement	20
a) PV	20
b) TE	20
c) MFP	21
6) Autres étiologies de polyglobulies et de thrombocytoses	21
a) Polyglobulies	21
i. <i>Polyglobulies acquises</i>	22
ii. <i>Polyglobulie des autres SMP</i>	22
iii. <i>Erythrocytose pure</i>	22
iv. <i>Polyglobulies congénitales</i>	22
v. <i>Fausse polyglobulies</i>	23
b) Thrombocytoses	23
i. <i>Thrombocytoses d'entraînement</i>	23
ii. <i>Pathologies inflammatoires et infectieuses</i>	23

iii. Carence martiale	24
iv. Thrombocytose post-splénectomie	24
v. Cancers	24
vi. Thrombocytose et hémopathies	24
B. Les microparticules	25
1) Définition	25
2) Formation des MP	25
a) La membrane plasmique au repos	25
b) Bourgeonnement de la membrane plasmique et libération des MP	27
3) Composition et caractéristiques phénotypiques des MP circulantes	29
4) Rôle des MP	30
a) Rôle procoagulant	30
b) Autres rôles	31
5) Implication en pathologie	32
6) Numération des MP	35
a) Etapes préanalytiques	35
i. Recueil de l'échantillon	35
ii. Centrifugation	35
iii. Congélation	36
b) Principales techniques de numération des MP	36
i. Dénombrement des microparticules par immunocapture sur plaque	36
ii. Dénombrement des microparticules par cytométrie en flux	37
II. PRESENTATION ET OBJECTIF DE L'ETUDE	38
A. Problématique et objectifs de l'étude	38
B. Schéma général de l'étude	39
1) Recrutement des patients	39
2) Recrutement des témoins	40
3) Organisation générale des prélèvements et analyses	40
4) Suivi des patients	41
5) Recueil des données	41
III. MATERIEL ET METHODE	42
A. Recueil des échantillons	42
B. Méthode analytique	42
1) Double centrifugation	42
2) Mode de conservation	42
C. Dénombrement des microparticules par cytométrie en flux	43
1) Principe	43
2) Vérification de la propreté de l'appareil	43
3) Réglage de la zone d'analyse des MP sur le cytomètre	44
4) Marquage des MP dans les échantillons patients et témoins	46
5) Décompte des MP sur le cytomètre	48
6) Analyse statistique	48

IV. RESULTATS	49
A. Description de la population étudiée	49
B. Relation entre l'âge et les PMP	51
C. Relation entre le chiffre de plaquettes et la numération des PMP	52
D. Intérêt de la numération des PMP dans le diagnostic des SMP Ph1-	52
1) Comparaison de toutes les populations de patients et de témoins entre elles	52
2) SMP et témoins sains	54
3) PV et polyglobulie secondaire	54
4) TE et thrombocytose secondaire	56
E. Effet des traitements myélofreinateurs sur la concentration des PMP chez les patients atteints de PV et de TE	57
1) PV	58
2) TE	60
F. Réponse hématologique et PMP	62
G. Facteurs de risque cardiovasculaire et PMP	62
H. Risque thrombotique et PMP	63
I. Relation entre l'existence d'un antécédent de thrombose et la concentration en PMP	64
J. Relation entre la présence de la mutation JAK2V617F et la concentration en PMP	66
1) PV	66
2) TE	66
3) MFP	67
K. Utilité de la numération des autres microparticules	68
1) Microparticules endothéliales	69
2) Microparticules érythrocytaires	70
3) Autres MP	70
4) Moyenne de l'intensité de fluorescence de l'annexine V	70
5) Coexpression des microparticules plaquettaires et des marqueurs de lignées différentes	72
V. DISCUSSION	74
A. Respect des conditions préanalytiques et analytiques	74
B. Analyse de la population de patients	75
1) Données épidémiologiques	75
2) Antécédents thrombotiques et traitement myélofreinateur	75
3) Anomalies génétiques	76
C. Rôle de la numération des microparticules plaquettaires dans le diagnostic de SMP	76
1) Norme des PMP	76
2) Relation entre la présence de la mutation JAK2V617F et le taux de PMP	77
3) Intérêt de la numération des PMP pour différencier la PV et la TE des causes secondaires de polyglobulie et de thrombocytose.	77
4) Définition des « thrombocytoses pures »	79

D. Microparticules plaquettaires et risque thrombotique	79
1) Relation entre les antécédents de thrombose et la numération des PMP	79
2) Microparticules plaquettaires et risque cardiovasculaire et thrombotique	79
3) MP exprimant la P-sélectine	80
4) Microparticules plaquettaires exprimant le facteur tissulaire (FT)	80
5) Microparticules plaquettaires exprimant des marqueurs endothéliaux	81
E. Microparticules plaquettaires et suivi du traitement	82
1) Corrélation entre le taux de PMP et la présence d'un traitement myélofreinateur	82
2) Microparticules plaquettaires et réponse hématologique	82
F. Hypothèses physiopathologiques	83
1) SMP et microparticules endothéliales	83
2) SMP et microparticules érythrocytaires	83
3) SMP et moyenne de l'intensité de fluorescence de l'annexine V	83
4) Répartition des principales sous-classes de microparticules	84
VI. CONCLUSION	85
BIBLIOGRAPHIE	86

LISTE DES ABREVIATIONS

BOM : Biopsie Ostéo-Médullaire
CMF : Cytométrie en Flux
DIPSS : Dynamic International Prognostic Scoring System
EMP : Microparticule Endothéliale
EPO : Erythropoïétine
EPO-R : Récepteur de l'Erythropoïétine
FS : Forward Scatter
FT : Facteur Tissulaire
G-CSF : Granulocyte- Colony Stimulating Factor
GHICL : Groupe Hospitalier de l'Institut Catholique de Lille
GMP : Microparticule granulocytaire
HeMP : Microparticule érythrocytaire
ICAM : Intercellular Cell Adhesion Molecule
IPSS : International Prognostic Scoring System
IWG-MRT : International Working Group on Myelofibrosis Research and Treatment
JAK2 : Janus Kinase 2
LA : Leucémie Aiguë
LAM : Leucémie Aiguë Myéloïde
LMC : Leucémie Myéloïde Chronique
LOH : Loss Of Heterozygoty
MFP : Myélofibrose Primitive
MoMP : Microparticule Monocytaire
MP : Microparticule
MP FT : Microparticule exprimant le Facteur Tissulaire
MPL : Myeloproliférative Leukemia
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
Ph1 : Chromosome Philadelphie
PAF : Platelet Activation Factor
PC : Phosphatidylcholine
PE : Phosphatidyléthanolamine
PECAM : Platelet Cell Adhesion Molecule
PFP : Platelet Free Plasma
PPP : Plasma Pauvre en Plaquettes
PS : Polyglobulie Secondaire
PSer : Phosphatidylsérine
PSGL-1 : P-Selectin Glycoprotein Ligand-1
PTT : Purpura Thrombotique Thrombocytopénique
PV: Polyglobulie Vraie
PVSG : Polycythemia Vera Study Group
RE : Reticulum Endoplasmique
ROC : Receiver Operating Characteristic
SaO₂ : Saturation en Oxygène
SM : Sphingomyéline

SMC : Splénomégalie Myéloïde Chronique

SMP : Syndrome Myéloprolifératif

SS : Side Scatter

TE : Thrombocytémie Essentielle

TGF β : Transforming Growth Factor β

TS : Thrombocytose Secondaire

I. GENERALITES

A. Les Syndromes Myéloprolifératifs chromosome Philadelphie négatifs

Les syndromes myéloprolifératifs (SMP) sont des hémopathies malignes caractérisées par la prolifération clonale de cellules myéloïdes. La leucémie myéloïde chronique (LMC), la polyglobulie de Vaquez (PV), la thrombocytémie essentielle (TE) et la myélofibrose primitive ou splénomégalie myéloïde chronique (SMC) ont été décrites au cours du 19^e siècle et dans le début du 20^e siècle mais ce n'est qu'en 1951 que William Dameshek les a regroupées au sein d'un groupe de pathologies appelé « syndromes myéloprolifératifs » du fait de leurs caractéristiques phénotypiques communes (1). Il avait remarqué que la PV et la TE pouvaient évoluer vers la myélofibrose et que sur le plan clinique, une splénomégalie était fréquemment retrouvée. Ces trois entités avaient également les mêmes complications : thrombose, hémorragie, évolution vers la leucémie aiguë.

En 1960, la découverte du chromosome Philadelphie (Ph1) par Peter Nowell et David Hungerford dans la LMC a permis de distinguer les syndromes myéloprolifératifs Ph1 positifs ou négatifs (Ph1-) faisant ainsi de la LMC une entité à part.

En 2005, quatre équipes indépendantes ont identifié une mutation de la protéine JAK2 (JAK2V617F) chez des patients atteints de PV. Ce n'est qu'ultérieurement que les autres SMP ont été évalués et que cette mutation a été retrouvée chez la majorité des patients atteints de TE et de MFP. Ces découvertes ont permis une révision par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) des critères de diagnostic des SMP Ph1-.

La classification de l'OMS révisée en 2008, regroupe sous le terme de syndromes myéloprolifératifs chromosome Ph1- : la PV, la TE et la MFP.

1) Epidémiologie

Les SMP Ph1- sont des maladies rares. Selon les études, l'incidence annuelle standardisée à la population européenne de la PV varie entre 0,9 et 1,97 nouveaux cas pour 100 000 habitants avec un sex ratio à 1,1. C'est une maladie très rare avant l'âge de 30 ans. L'âge médian au diagnostic est compris entre 60 et 65 ans (2, 3).

La TE est plus fréquente que la PV. Son incidence annuelle standardisée à la population européenne se situe entre 1,55 et 2 pour 100 000 habitants avec une discrète prédominance féminine (sex ratio à 0,8). Avec un âge médian au diagnostic proche de 70 ans, c'est une pathologie du sujet âgé. Il existe cependant un petit pic de fréquence entre 30 et 35 ans notamment chez les femmes (2, 3).

La MFP est plus rare. Son incidence annuelle standardisée à la population européenne est comprise entre 0,4/100 000 et 0,8/100 000 habitants mais est probablement sous estimée. Le sex ratio supérieur à 2 démontre une prépondérance masculine. L'âge médian au diagnostic est proche de 70 ans (2, 3).

2) Physiopathologie

Les SMP Ph1- sont caractérisés par une atteinte clonale de la cellule souche hématopoïétique entraînant une prolifération médullaire qui prédomine principalement sur la lignée érythroïde et/ou mégacaryocytaire et aboutit à la production excessive de cellules sanguines matures. Ainsi, la PV est caractérisée par une hyperplasie de la lignée érythrocytaire tandis que la prolifération touche la lignée mégacaryocytaire dans la TE. La MFP est la conséquence d'une production de mégacaryocytes dystrophiques sécrétant des facteurs angiogéniques et profibrotiques menant à la fibrose médullaire (4).

a) Les anomalies génétiques

La découverte en 2005 de la mutation du gène JAK2 fut un tournant dans la compréhension de la physiopathologie des syndromes myéloprolifératifs Ph1- ainsi que dans leur diagnostic. Janus Kinase 2 (JAK2) est une protéine à activité tyrosine kinase constitutivement associée au récepteur de l'érythropoïétine (EPO) et de la thrombopoïétine (TPO) ainsi qu'à d'autres récepteurs du même groupe et notamment celui du granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) et de l'interleukine 3 (IL3). C'est un intermédiaire dans la voie de signalisation des récepteurs de l'EPO, de la TPO et du G-CSF qui sont des facteurs de croissance hématopoïétiques. Dans les conditions physiologiques, la fixation de l'EPO et de la TPO sur leurs récepteurs respectifs (EPO-R et TPO-R) entraîne la phosphorylation de la protéine JAK2 ce qui provoque la phosphorylation puis la dimérisation du facteur de transcription STAT « signal transducer and activator of transduction » qui peut alors se transloquer vers le noyau pour activer la transcription de gènes régulateurs de la prolifération et de la différenciation des progéniteurs érythroïdes et/ou mégacaryocytaires (figure 1). La phosphorylation de la protéine JAK2 active également les voies MAP kinase et PI3K/AKT qui sont impliquées dans la prolifération, la différenciation cellulaire et la survie.

Le gène JAK2 se situe dans le bras court du chromosome 9 (en 9p). La mutation ponctuelle acquise c.1849G>T (ou JAK2V617F) située dans l'exon 14 du gène JAK2, aboutit à la substitution d'une guanine par une thymidine en position 1849. Au niveau protéique, ceci se traduit par la substitution d'une valine en phénylalanine au niveau du codon 617. Cette mutation touche le domaine pseudo-kinase, régulateur négatif de la tyrosine kinase (JAK2). La mutation V617F du gène JAK2 induit une activation constitutive de la protéine JAK2, ce qui stimule les voies STAT, MAP kinase et PI3K/AKT même en absence de fixation d'EPO et de TPO sur leurs récepteurs. Ceci aboutit à la stimulation permanente de la prolifération érythroblastique et/ou mégacaryocytaire (5).

La mutation JAK2V617F est retrouvée chez 97% des patients atteints de PV et dans presque 50% des cas de TE et MFP (tableau1). Cette mutation a également été retrouvée dans d'autres néoplasies myéloïdes, en particulier dans certains syndromes myélodysplasiques et dans la leucémie myélomonocytaire chronique et l'anémie réfractaire avec sidéroblastes en couronne associée à une thrombocytose qui sont des syndromes frontières myélodysplasiques / myéloprolifératifs. La mutation JAK2V617F n'est en revanche jamais présente dans des proliférations malignes non myéloïdes ni dans les polyglobulies et thrombocytoses de causes secondaires (6).

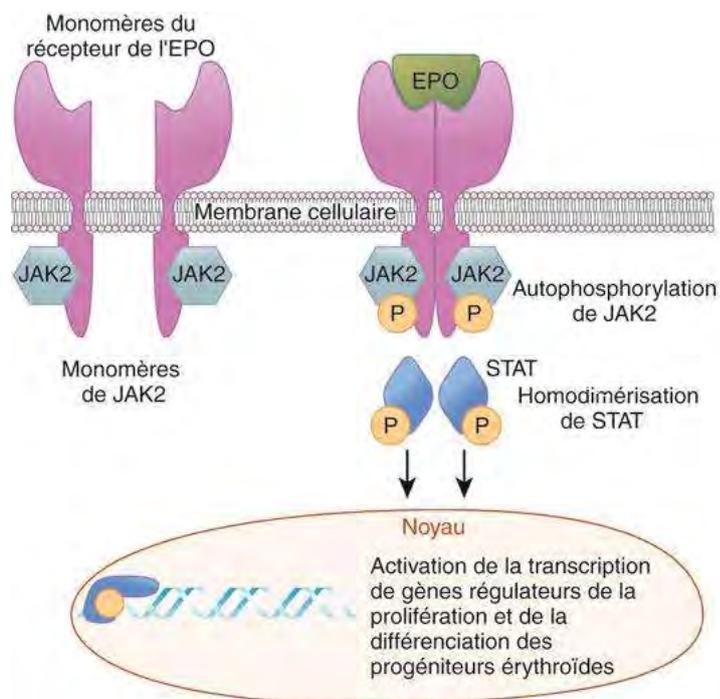


Figure 1 : Voies de signalisation du récepteur de l'EPO. La protéine JAK2 est constitutivement associée au récepteur de l'EPO. La fixation de l'EPO sur son récepteur provoque la dimérisation de celui-ci puis une autophosphorylation de la protéine JAK2 ce qui entraîne la phosphorylation puis de la dimérisation de STAT qui se transloque alors vers le noyau pour activer la transcription de gènes régulateurs de la prolifération et de la différenciation des progéniteurs érythroïdes (7).

La mutation V617F de JAK2 n'est pas la seule mutation du gène JAK2 décrite dans les SMP. Scott et al ont retrouvé une mutation gain de fonction portant sur l'exon 12 du gène JAK2 chez des patients présentant un tableau de PV, non mutés JAK2V617F, sans hyperleucocytose ni thrombocytose mais avec une EPO basse et une pousse endogène des progéniteurs érythroblastiques ainsi que chez des patients présentant une érythrocytose pure (8). D'autres mutations de l'exon 12 de JAK2 sont maintenant connues. Les mutations de l'exon 12 du gène JAK2 provoquent elles aussi une activation constitutive de la protéine JAK2 et une activation des voies de signalisation en aval. Les mutations de l'exon 12 de JAK2 sont rares (5% des PV) et uniquement retrouvées dans les PV négatives pour la mutation V617F de JAK2 (tableau 1) (9).

Des mutations activatrices du récepteur de la thrombopoïétine MPL (MPLW515K/L) ont été identifiées en 2006 par une étude réalisée sur une cohorte de plus de 1000 patients atteints de SMP Ph1-. Ces mutations sont situées dans le domaine juxtamembranaire (exon 10) de MPL. Elles sont responsables d'une hypersensibilité à la thrombopoïétine et d'une activation constitutive de la voie JAK-STAT (10). Les mutations MPLW515K/L sont moins fréquentes que celles de JAK2 et ne sont jamais retrouvées chez les patients atteints de PV. Seuls 5% des patients atteints de TE et 8 à 9% des patients atteints de MFP sont porteurs de la mutation MPL (tableau1). Des mutations de JAK2 et de MPL W515K/L peuvent coexister.

Tableau 1 : fréquence des diverses mutations récemment décrites en fonction du diagnostic clinique de SMP (6).

	Polyglobulie primitive	Thrombocytémie essentielle	Myélofibrose primitive
JAK2 V617F (exon14)	97 %	50 %	50 %
JAK2 (exon12)	5 %	Non renseigné	Non renseigné
MPLW515L/K	Non renseigné	5 %	8 à 9%

b) Relation entre la mutation JAK2VF et les phénotypes cliniques

La présence d'une même mutation dans trois SMP distincts, ainsi que l'hétérogénéité de charge mutationnelle (le niveau d'expression de JAK2 muté est faible dans la TE et élevé dans la PV et la MFP) dans ces maladies pose des questions physiopathologiques. Deux hypothèses ont été formulées dans la pathogénèse des SMP. La première est que la mutation JAK2V617F est responsable de la maladie et que les variations phénotypiques sont liées à des facteurs environnementaux et/ou au ratio JAK2V617F/JAK2 sauvage dans les cellules. L'autre hypothèse suggère que le phénotype est déterminé par un évènement préexistant à la mutation de JAK2 et notamment des mutations affectant les gènes TET2 et ASXL1 (présentes respectivement chez 10 à 20% et 2 à 23% des patients atteints de SMP Ph1-) qui sont impliqués dans la régulation de la transcription de gènes via des mécanismes épigénétiques (9, 11).

i. Polyglobulie vraie

Chez environ 30% des patients atteints de PV, la mutation JAK2V617F est retrouvée à l'état homozygote. L'évolution vers l'homozygotie est composée de deux étapes : la première est l'acquisition de la mutation JAK2V617F et la deuxième est le phénomène de perte d'hétérozygotie en 9p (9pLOH) par recombinaison mitotique (5). Dans la PV, la prévalence des cellules sanguines qui sont homozygotes pour la mutation JAK2V617F augmente avec le temps probablement parce que cette mutation confère un avantage de survie et de prolifération.

A la différence de la mutation JAK2V617F, la mutation de l'exon 12 de JAK2 n'est jamais présente à l'état homozygote (8).

ii. Trombocytémie essentielle

L'étude du statut mutationnel de JAK2V617F a permis de distinguer deux catégories biologiques distinctes de TE. Les TE JAK2V617F positives ressemblent aux PV avec une hémoglobine et des leucocytes plus élevés, une biopsie ostéo-médullaire (BOM) de cellularité augmentée et une fréquence plus importante de complications thrombotiques et de transformation en myélofibrose. Les TE JAK2 négatives ont une thrombocytose plus prononcée avec une érythropoïèse et une granulopoïèse moins active. Ceci suggère que la TE JAK2 mutée est une forme frustrée de PV (12, 13).

Contrairement à la PV, dans la majorité des TE les cellules sont hétérozygotes pour la mutation JAK2. Seuls 2 à 4% des patients présentent une homozygotie pour l'allèle muté (14). Chez les patients atteints de PV et de TE, l'évolution de l'état hétérozygote vers l'état homozygote (c'est-à-dire l'augmentation de la charge allélique) est une étape critique dans la transformation en myélofibrose secondaire (figure 2) (15, 16).

iii. MFP

Dans 30% des MFP, une perte d'hétérozygotie du bras court du chromosome 9 est retrouvée. La mutation JAK2V617F est présente dans 50% des cas à l'état hétérozygote et dans 13% à l'état homozygote (17). Dans la MFP, l'homozygotie pour la mutation JAK2 est associée à une leucocytose plus importante, une splénomégalie plus volumineuse et un besoin en traitement myélofreinateur plus important.

Le phénotype des SMP Ph1- est donc lié à la charge allélique de JAK2V617F c'est-à-dire au rapport JAK2V617F/JAK2 non muté. Un faible rapport induit une maladie de type TE, avec un faible niveau d'activité de la kinase JAK2V617F qui évolue vers la PV puis la MFP lorsque le nombre d'allèles mutés (et donc le niveau d'activité de la kinase) augmente (figure2).

Chez les patients JAK2 et MPL négatifs, le phénotype est probablement dicté par d'autres mutations affectant la signalisation des facteurs de croissance hématopoïétiques. En 2011 des mutations de LNK (lymphocyte adaptor protein) et CBL (casitas B-lineage lymphoma protooncogene) ont été décrites (9). Le gène LNK code pour une protéine adaptatrice qui exerce un rétrocontrôle négatif sur le récepteur MPL. Les mutations décrites altèrent la fonction régulatrice de LNK et aboutissent à une activation aberrante de la voie JAK/STAT (18). Le gène CBL code pour une ubiquitine ligase qui régule négativement certaines tyrosines kinases activées dont JAK2 ainsi que des récepteurs aux cytokines comme MPL. Des mutations de CBL ont été identifiées dans moins de 5% des SMP et ont pour conséquence un défaut de régulation et une activation aberrante de la voie de signalisation des récepteurs de croissance hématopoïétiques (19).

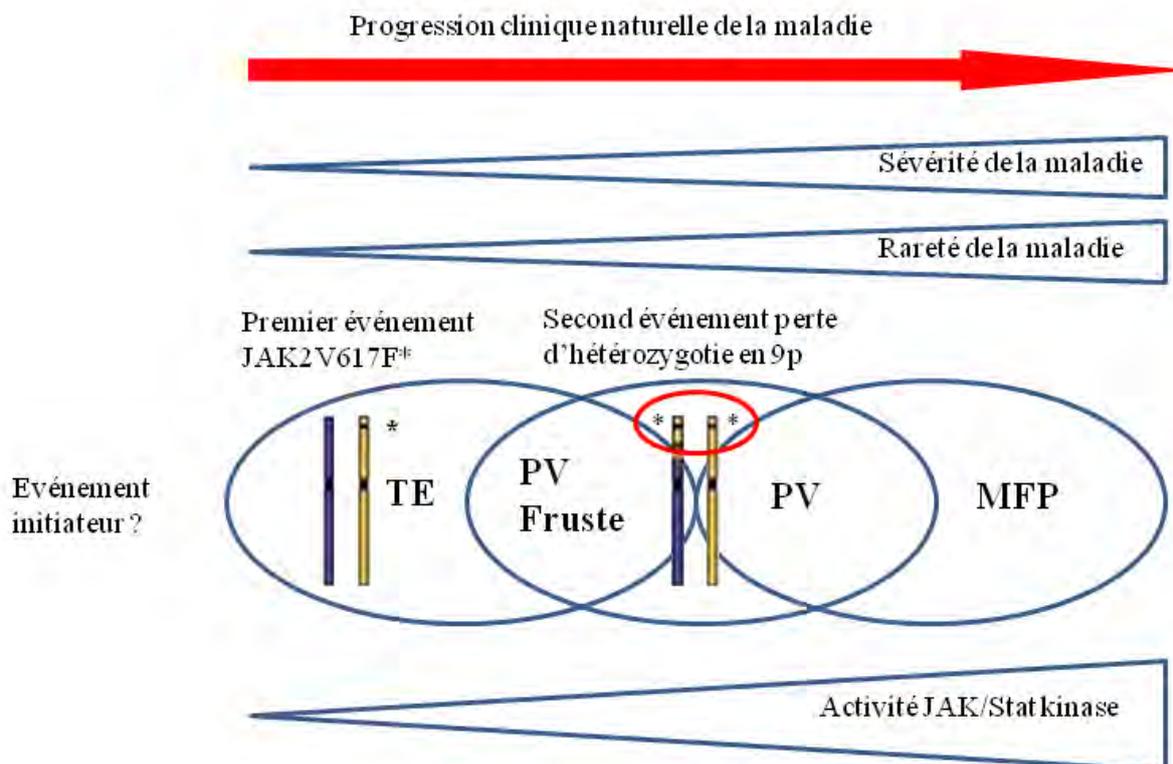


Figure 2 : Evolution clinique des SMP JAK2 positifs. JAK2V617F est soit l'évènement initiateur de la maladie soit un évènement secondaire à un évènement préexistant. La progression clinique naturelle des SMP Ph1- est liée à la charge allélique de JAK2V617F qui est en rapport avec l'activité JAK/STAT kinase.

3) Diagnostic

Le diagnostic de SMP est suspecté devant un hémogramme qui montre, selon les cas, une augmentation de l'hémoglobine, de l'hématocrite, des plaquettes, une leucocytose, une érythromyélocytose. Souvent réalisé à titre systématique, l'hémogramme peut avoir été demandé suite à un évènement vasculaire, une crise de goutte ou la découverte d'une splénomégalie qui est un argument clinique fort, en faveur d'un SMP mais qui est cependant non spécifique de ce groupe de pathologies. Plus spécifiquement, les patients polyglobuliques peuvent présenter une érythrocytose prédominante sur les parties découvertes du corps, le visage et les mains, un prurit à l'eau ou des signes neurosensoriels causés par l'hyperviscosité sanguine (céphalées, acouphènes, troubles visuels). Les thromboses veineuses inaugurant la maladie et touchant des sites inhabituels tels que les gros troncs veineux du système splanchnique ou encore les veines sus hépatiques réalisant un syndrome de Budd-Chiari font suspecter un SMP. Les thromboses artérielles, plus fréquentes, sont néanmoins moins évocatrices d'un SMP. Tous ces signes cliniques peuvent orienter le clinicien vers un SMP cependant aucun d'entre eux n'est spécifique. La biologie est essentielle pour apporter le diagnostic de certitude.

Les premiers critères de diagnostic de la PV et de la TE, établis par le groupe d'étude sur la polyglobulie (PVSG) en 1967, visaient essentiellement à exclure les causes réactionnelles de polyglobulie et de thrombocytose. En 2001, ces critères ont été revisités par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) et se sont basés sur un faisceau d'arguments cliniques, biologiques et anatomopathologiques. La découverte récente des marqueurs moléculaires JAK2 et MPL a permis en 2008 une révision par l'OMS de la classification des syndromes myéloprolifératifs Ph1- et l'a simplifiée en raison de l'importance du poids du critère mutation dans le diagnostic de SMP.

a) Diagnostic de polyglobulie primitive

La figure 3 montre les critères proposés par l'OMS en 2008 pour établir le diagnostic de PV. La présence des mutations de JAK2 est considérée comme un critère majeur. Cependant, comme la mutation V617F de JAK2 n'est pas spécifique de la PV, la présence d'autres critères et notamment l'augmentation de l'hémoglobine est indispensable au diagnostic de la maladie. La dynamique d'évolution des valeurs de l'hémoglobine et de l'hématocrite a également une grande importance afin d'éviter le cas fréquent où la polyglobulie se « démasque » après correction d'une carence martiale. Le diagnostic de PV exige la présence de deux critères majeurs et d'un critère mineur. En absence de mutation JAK2, par exemple si le taux de transcrite est trop bas ou qu'il s'agit d'un cas exceptionnel de PV non mutée, la présence d'au moins deux des trois critères mineurs en plus du phénotype « polyglobulie » est exigée.

Le diagnostic exige la présence de deux critères majeurs et d'un critère mineur ou la présence du premier critère majeur associé à deux critères mineurs.

Critères majeurs

1. Hémoglobine > 18,5 g/dL chez l'homme et 16,5 g/dL chez la femme ou toute autre preuve de l'augmentation de la masse globulaire érythrocytaire*
2. Présence de JAK2V617F ou d'autres mutations fonctionnellement similaires (par exemple mutation de JAK2 exon 12)

Critères mineurs

1. Biopsie médullaire montrant, en fonction de l'âge, une hyperplasie cellulaire portant sur les lignées érythrocytaire, granulocytaire, mégacaryocytaire (panmyélose)
2. Taux d'érythropoïétine sérique au-dessous des valeurs normales de référence
3. Pousse spontanée des progéniteurs érythrocytaires *in vitro*

*Hémoglobine ou hématocrite > 99^e percentile des valeurs spécifiques de référence en fonction de l'âge, du sexe, de l'altitude de résidence
ou hémoglobine > 17 g/dL chez l'homme, 15 g/dL chez la femme associée à la preuve d'une augmentation d'au moins 2 g/dL par rapport aux valeurs antérieures (mais sans atteindre les valeurs seuils citées plus haut) ne pouvant s'expliquer par la correction d'une carence martiale
ou masse globulaire érythrocytaire > 25 % de la valeur normale calculée.

Figure 3 : Critères proposés par l'OMS pour le diagnostic de PV en 2008 (20).

b) Diagnostic de thrombocytémie essentielle

Les critères proposés par l’OMS en 2008 pour le diagnostic de TE sont regroupés dans la figure 4 ci-dessous. La thrombocytose reste un critère majeur de diagnostic de TE mais la valeur a été abaissée de $600.10^9/L$ à $450.10^9/L$. Cette valeur n’est pas spécifique de la TE (elle peut se rencontrer dans les causes réactionnelles de thrombocytose) mais elle permet d’inclure les formes débutantes de TE. La présence de la mutation V617F de JAK2 retrouvée chez environ la moitié des patients ou de la mutation MPL confirme le diagnostic de SMP Ph1-. Dans la classification OMS, la biopsie ostéo-médullaire est nécessaire au diagnostic. Elle permet d’exclure, sur des critères morphologiques, les formes préfibrotiques de MFP et les myélodysplasies dans lesquelles une thrombocytose ainsi que la mutation de JAK2 peuvent être retrouvées. Lorsqu’aucune mutation n’est retrouvée, toutes les causes de thrombocytoses réactionnelles doivent être écartées et notamment les causes inflammatoires, infectieuses, une carence martiale ou un antécédent de splénectomie.

Le diagnostic exige la présence des quatre critères suivants :

1. Augmentation persistante du nombre de plaquettes $\geq 450 \times 10^9/L^a$
2. Prolifération, en biopsie médullaire, prédominant sur la lignée mégacaryocytaire et faite d’une majorité d’éléments mûrs et de grande taille. Pas d’augmentation significative de la granulopoïèse neutrophile ni de l’érythropoïèse et pas d’excès d’éléments immatures dans ces deux lignées
3. Absence des critères retenus par l’OMS en faveur du diagnostic de PV^b, MPF (myélofibrose primitive)^c, LMC (leucémie myéloïde chronique)^d, MDS (syndrome myélodysplasique)^e ou d’une autre maladie maligne de la lignée myéloïde
4. Démonstration de la mutation JAK2V617F ou d’un autre marqueur de clonalité ou en l’absence de marqueur de clonalité : absence d’argument en faveur d’une thrombocytose réactionnelle^f

^a Durant la période d’évaluation.

^b L’exclusion de la PV requiert, en présence d’une ferritinémie basse, l’absence, après traitement martial, d’augmentation de l’hématocrite ou de l’hémoglobine au-dessus des valeurs définissant le phénotype polyglobulie. L’exclusion de la PV est basée sur les taux d’hémoglobine et sur l’hématocrite. La mesure de la masse globulaire n’est pas nécessaire.

^c Requiert l’absence de fibrose réticulaire significative et de toute fibrose collagène ; l’absence d’érythromyélie sanguine ; l’absence d’hypercellularité médullaire manifeste (fonction de l’âge), accompagnée d’un aspect des mégacaryocytes typique de myélofibrose primitive (éléments regroupés en amas denses, de taille variant de petite à grande, dont le rapport nucléo/cytoplasmique est anormal avec un aspect hyperchromatique, bulbeux ou irrégulièrement entouré des noyaux).

^d Requiert l’absence de BCR-ABL.

^e Requiert l’absence de dysérythropoïèses et de dysgranulopoïèses.

^f Les causes de thrombocytose réactionnelles incluent la présence d’une carence martiale, d’un antécédent de splénectomie, d’une intervention chirurgicale récente, d’infection, d’inflammation, de « collagénose », de cancer métastatique, de syndrome lymphoprolifératif. Cependant si les trois premiers critères sont présents, l’existence d’une des causes précédentes de thrombocytose réactionnelle, n’exclue pas l’existence d’une TE associée.

Figure 4 : Critères proposés pour le diagnostic de TE par l’OMS en 2008 (20).

c) Diagnostic de myélofibrose primitive

Les nouveaux critères de 2008 (figure 5) confirment le caractère indispensable de la biopsie ostéo-médullaire (BOM) notamment pour la reconnaissance de la phase préfibrotique de la maladie qui est caractérisée par des anomalies morphologiques spécifiques de la lignée mégacaryocytaire. La présence des mutations de JAK2 ou de MPL, qui affirment le diagnostic de SMP Ph1-, fait partie des critères majeurs. En l'absence de ces mutations ou d'arguments en faveur d'une maladie clonale, une grande importance est accordée à l'analyse morphologique et immunohistochimique de la BOM (reconnaissance par CD34 des cellules blastiques) pour éliminer les fibroses secondaires ainsi que les pathologies apparentées aux leucémies aigües myéloblastiques, aux leucémies à mégacaryocytes et aux myélodysplasies avec myélofibrose.

Le diagnostic exige la présence des trois critères majeurs et de deux critères mineurs suivants :

Critères majeurs

1. Présence d'une prolifération mégacaryocytaire et des atypies morphologiques* habituellement accompagnées par la présence de fibrose réticulinique ou collagène, ou en l'absence de fibrose réticulinique significative, les anomalies morphologiques mégacaryocytaires doivent être accompagnées par une augmentation de la cellularité médullaire caractérisée par une prolifération granuleuse et souvent une érythropoïèse diminuée (i.e. phase cellulaire ou préfibrotique de la maladie)
2. Absence des critères retenus par l'OMS en faveur du diagnostic de :
PV (Maladie de Vaquez)^a, LMC (leucémie myéloïde chronique)^b, MDS (syndrome myélodysplasique)^c ou d'une autre maladie maligne de la lignée myéloïde^d
3. Démonstration de la mutation JAK2V617F ou d'un autre marqueur de clonalité (e.g. MPLW515L/K)
Ou, en l'absence de marqueur de clonalité, démonstration de l'absence d'argument en faveur d'une myélofibrose due à la présence d'une maladie inflammatoire sous jacente ou d'une affection néoplasique

Critères mineurs

1. Leuco-érythroblastose sanguine*
2. Augmentation des taux sériques de lactate dehydrogenase (LDH)*
3. Anémie*
4. Splénomégalie palpable*

* Éléments regroupés en amas denses, de taille variant de petite à grande, dont le rapport nucléocytoplasmique est anormal avec un aspect hyperchromatique, bulbeux ou irrégulièrement contourné des noyaux.

^a En présence d'une ferritine basse l'exclusion d'une PV repose sur l'absence d'augmentation, après traitement marital, de l'hématocrite ou de l'hémoglobine au dessus des valeurs définissant le phénotype polyglobulie. L'exclusion de la PV est basée sur les taux Hb et d'hématocrite la mesure du volume sanguin isotopique n'est pas requise.

^b Requiert l'absence de BCR-ABL

^c Requiert l'absence de dysérythropoïèse et de dysgranulopoïèse.

^d Secondaires à une infection, une maladie auto-immune, un état inflammatoire chronique, une leucémie à tricholeucocytes, une autre pathologie maligne lymphoïde, un cancer métastatique, une myélopathie (chronique) toxique. Il faut noter que les patients, dont l'état peut s'associer à une myélofibrose réactionnelle, ne sont pas obligatoirement exempts de PMF et ce diagnostic doit donc être accepté si les autres critères sont remplis.

* Le degré de ces anomalies varie entre des valeurs juste au dessus de la normale jusqu'à des anomalies importantes.

Figure 5 : Critères proposés par l'OMS pour le diagnostic de myélofibrose primitive en 2008 (20).

4) Evolution, complications et facteurs pronostiques

a) Thrombocytémie Essentielle et Polyglobulie Vraie

Les principales complications survenant au décours de la TE et de la PV sont d'une part les thromboses et d'autre part la transformation en MFP et/ou en leucémie aiguë myéloblastique (LAM).

i. Complications thrombotiques

Les facteurs de risque thrombotique majeurs sont l'âge (> 60 ans) et les antécédents personnels de thrombose (21). L'incidence des thromboses varie de 12 à 39% pour la PV et de 11 à 25% pour la TE (22). Le risque thrombotique est majoré par l'hyperviscosité liée à l'augmentation de l'hématocrite ainsi que par la présence de facteurs de risque cardiovasculaires (diabète, hypertension artérielle, hypercholestérolémie, tabagisme). Les accidents thromboemboliques sont de mauvais pronostic dans l'évolution de la maladie et peuvent survenir même en présence d'un traitement myélofreinateur adapté. Les thromboses sont plus fréquentes au niveau des territoires artériels que veineux, et peuvent engager le pronostic vital. Les thromboses artérielles telles que les accidents ischémiques, les infarctus du myocarde et les thromboses artérielles périphériques représentent 60 à 70% des complications thrombotiques dans les SMP. Les complications veineuses incluent les thromboses profondes des membres inférieurs, les embolies pulmonaires, les thromboses intra-abdominales (mésentérique, hépatique, porte) et représentent le tiers des événements thrombotiques. Les SMP sont la cause la plus fréquente de thromboses veineuses splanchniques représentant environ 5% des cas de syndrome de Budd Chiari et 25% des cas de thromboses de la veine porte (23). Ces thromboses de siège inhabituel, font souvent suspecter la maladie.

ii. Complications hémorragiques

Une étude publiée en mars 2013 a retrouvé une incidence cumulative d'accidents hémorragiques de 39,6% (6,2% par personne et par an) chez les patients atteints de PV et de 29,7% (5,9% par personne et par an) chez les patients atteints de TE. Il s'agissait d'hémorragies majeures chez 9,9% des patients atteints de PV et chez 14% des patients atteints de TE (24). Les complications hémorragiques de la PV et de la TE sont dues aux fréquentes anomalies de l'hémostase primaire : perte des monomères de haut poids moléculaire du facteur von Willebrand liée à une augmentation de la protéolyse par la protéase ADAMTS 13, diminution de l'expression des récepteurs adrénergiques, de la GPIb (récepteur du facteur von Willebrand) et de la GPIIbIIIa (récepteur au fibrinogène) et baisse de la réponse à l'épinéphrine (22).

Les manifestations hémorragiques de la PV et de la TE correspondent le plus souvent à des incidents mineurs tels que des hémorragies cutanéomuqueuses récidivantes. Les hémorragies sévères ressemblent à celles de la maladie de Willebrand : hématémèse, hémarthroses, hémorragies cérébro-méningées (7).

iii. Transformation en leucémie aiguë

L'incidence de la transformation en leucémie aiguë (LA) dans la PV varie selon les études entre 1,4 et 21% (25-27). Elle est liée au traitement administré dans la plupart des cas : une étude rétrospective du PVSG, publiée en 2011, montre une diminution de la survie chez les patients traités par le pipobroman en comparaison à l'hydroxyurée (médiane de survie de 20,3 ans chez le groupe de patients traités par hydroxyurée et médiane de survie de 17 ans chez les patients traités par pipobroman) (28). Chez les patients atteints de PV âgés de moins de 65 ans traités, la transformation aiguë est la première cause de mortalité d'origine hématologique. La transformation aiguë est rare dans la TE. Elle varie entre 0,6 et 6% selon les études (27, 29, 30) et dépend de la présence d'anomalies cytogénétiques, de l'existence d'une myélofibrose ainsi que de l'utilisation de certains agents cytotoxiques (31).

Les LA post PV et post TE sont presque toujours myéloblastiques et de très mauvais pronostic avec une survie médiane comprise entre 3 et 6 mois (32).

iv. Progression vers la myélofibrose

La progression de la PV vers la myélofibrose peut se produire dès les premières années d'évolution de la maladie ; cependant son incidence augmente avec le temps et atteint 20% après 20 ans d'évolution de la maladie. Sur le long terme, le traitement par saignées favorise la complication en myélofibrose (26). Par ailleurs, l'hyperleucocytose au diagnostic ($>15 \times 10^9/L$) ainsi qu'une forte charge allélique JAK2VF seraient liées au risque de transformation en myélofibrose mais pas au risque de transformation en leucémie aiguë ni au risque thrombotique (33).

La progression de la TE vers la myélofibrose est un phénomène tardif dont la fréquence augmente avec le temps. Le PVSG estime cette fréquence à 10% après 10 ans de surveillance médiane et 15% après 15 ans de surveillance médiane (34). Par ailleurs, la présence de la mutation JAK2V617F ne semble pas influencer l'évolution vers la myélofibrose ni la transformation en leucémie aiguë cependant, elle est corrélée à l'augmentation du risque thrombotique (35).

Les patients présentant une myélofibrose secondaire à une PV ou à une TE ont une survie médiane de 5 à 7 ans rejoignant donc celle de la myélofibrose primitive (36).

v. Score pronostique

La PV est une maladie indolente, d'évolution chronique dont la survie est diminuée par rapport à la population générale en raison des complications thrombotiques graves ainsi que du risque de transformation en leucémie aiguë ou en myélofibrose. La survie après 10 ans d'évolution est estimée à 72% en comparaison à celle de la population générale (21). Un score pronostique basé sur l'âge et la leucocytose est actuellement en élaboration dans la PV.

La survie des patients atteints de TE est proche de celle de la population générale dans la première décennie suivant le diagnostic (37). Un score pronostic basé sur l'âge (> 60 ans), l'hyperleucocytose ($>11 \times 10^9/L$) et les antécédents thrombotiques a été établi par le IWG-MRT (International Working Group on Myelofibrosis Research and Treatment) sur 891 patients atteints de TE. Il identifie 3 groupes dont la médiane de survie est proche de 14 ans pour les patients à haut risque, de 24 ans pour les patients à risque intermédiaire et est non atteinte pour les patients à faible risque (38).

b) Myélofibrose Primitive

i. *Syndrome tumoral*

L'augmentation progressive du volume splénique est presque constante pendant l'évolution de la MFP. Due à la métaplasie myéloïde et à l'augmentation du flux sanguin, elle aggravée par l'hypertension portale et entraîne un hypersplénisme progressif en partie responsable des cytopénies (39). Une hépatomégalie favorisée par la splénectomie peut apparaître dans un délai variable : de quelques mois à plusieurs années chez 12 à 53% des patients splénectomisés (40).

ii. *Evolution en leucémie aiguë*

La MFP se transforme dans 10 à 20% des cas en leucémie aiguë presque exclusivement myéloïde (41, 42) soit par évolution naturelle de la maladie soit en raison des effets secondaires de certaines thérapeutiques. Le délai d'acutisation après le diagnostic est variable ; une phase d'accélération caractérisée par des signes cliniques d'évolutivité (hyperthermie, amaigrissement, sueurs), une augmentation de l'hépatosplénomégalie, de l'anémie, de la thrombopénie et de la leucocytose précède souvent la transformation aiguë. Le nombre de cellules CD34+ circulantes est fortement corrélé avec l'évolution de la maladie. Une concentration de cellules CD34+ supérieure à $300 \cdot 10^6/L$ est associée à un risque de 50% de transformation blastique dans les 11 mois qui suivent (43).

Comme pour la PV et la TE, le pronostic des LA secondaires est très défavorable (médiane de survie comprise entre 3 et 6 mois) notamment en raison de la chimiorésistance habituelle (32).

iii. *Complications thrombotiques*

Les accidents thrombotiques sont moins fréquents dans la MFP que dans la TE et la PV malgré l'état inflammatoire : l'incidence des événements thrombotiques chez les patients atteints de MFP est de 7% (44).

Les accidents thromboemboliques chez les patients âgés relèvent de causes multiples : âge, anomalies qualitatives et quantitatives des plaquettes (39).

iv. Autres complications

Les principales autres complications sont l'hypertension artérielle pulmonaire et les complications cardiovasculaires qui sont des causes majeures de décès, la MFP aggravant les phénomènes ischémiques et les cardiopathies préexistantes. Les complications infectieuses sont également très fréquentes et sont dues à la neutropénie spontanée ou chimio-induite (39).

v. Scores pronostiques

La MFP est une maladie hétérogène dans sa présentation clinique et son évolution. La médiane de survie a été évaluée à 62 mois dans la série de Cervantes en 2009 (45). En dehors de l'allogreffe de moelle, seul traitement curatif, la prise en charge des patients est essentiellement symptomatique. Au cours de ces dernières années, plusieurs scores pronostiques ont été établis afin d'optimiser le traitement des patients.

Le score pronostique de Lille utilisé depuis 1996 est basé sur deux paramètres : Hb < 10g/L et GB < 4 ou > 25G/L. Il définit trois groupes dont les médianes de survie sont de 13, 26 et 93 mois (46). Il a évolué en 2009 en score international IPSS établi à partir d'une étude rétrospective de plus de 1000 patients. Il utilise 5 facteurs de pronostic péjoratif au diagnostic : âge > 65 ans, Hb < 10g/L, leucocytose > 25G/L, blatose sanguine > 1% et présence de signes généraux. La présence de 0, 1, 2 ou plus de 3 facteurs de risque définit respectivement un risque bas, intermédiaire 1, intermédiaire 2 ou haut. La médiane de survie correspondante est de 11.3, 7.9, 4 et 2.3 ans (45).

Le score DIPSS (dynamic IPSS) utilise les mêmes critères que le score IPSS mais affecte un poids plus élevé à l'anémie. Il peut être appliqué à n'importe quel moment de la maladie (47). En plus des critères IPSS et DIPSS, d'autres critères de mauvais pronostic ont été identifiés : un caryotype défavorable, la dépendance transfusionnelle ou une thrombopénie < $100 \cdot 10^9/L$.

Le score DIPSS Plus prend en compte, en plus du score IPSS, les besoins transfusionnels, la thrombopénie < $100 \cdot 10^9/L$ ainsi que le caryotype défavorable (48).

Enfin, la présence d'une faible charge allélique JAK2V617F est associée à un pronostic péjoratif dans la MFP car elle témoigne du développement d'un clone V617F négatif conférant à la maladie un phénotype plus agressif (49).

5) Traitement

L'aspirine à faible dose est utilisée au long cours dans la prévention du risque thromboembolique dans les SMP Ph1-. L'étude européenne ECLAP a permis de montrer que cette mesure réduisait nettement le risque d'accidents vasculaires sans augmenter le risque hémorragique (50).

a) PV

Le traitement de la maladie de Vaquez doit être établi en tenant compte de la durée de son évolution. Le premier objectif est de prévenir les évènements vasculaires qui sont le risque majeur de l'augmentation du volume globulaire. Le deuxième objectif est de limiter le risque de transformation leucémique.

Les saignées (300-400mL) sont le moyen le plus efficace et rapide de diminuer l'expansion globulaire. L'objectif est de ramener l'hématocrite autour de 45%. Les saignées provoquent une carence martiale et aggravent la thrombocytose. Les saignées régulières peuvent être utilisées comme traitement unique chez le sujet jeune, cependant, la nécessité de saignées plus fréquentes est une indication de traitement myélofreinateur.

L'hydroxyurée est la thérapeutique cytoréductrice de choix. Il est administré à la dose de charge de 25 mg/kg/jour puis un traitement d'entretien à dose variable est nécessaire. Son efficacité est meilleure que celle de l'anagrélide (51) et elle est moins leucémogène que le pipobroman (28). Dans les cas d'intolérance à l'hydroxyurée, la seconde ligne de traitement utilise du pipobroman. De plus, les PV réfractaires à l'hydroxyurée font actuellement l'objet d'essais cliniques par des inhibiteurs de JAK2.

b) TE

Chez les patients atteints de TE, il n'est recommandé d'utiliser un traitement myélofreinateur que pour les patients à haut risque en raison des complications liées à leur utilisation à long terme. Les traitements myélofreinateurs sont réservés aux patients ayant déjà été victimes de thrombose ou dont le nombre de plaquettes est supérieur à 1500 G/L ou dont l'âge est supérieur à 60 ans (52). Comme dans la PV, l'hydroxyurée est le traitement cytoréducteur de référence. En cas d'intolérance à l'hydroxyurée, les autres médicaments disponibles sont l'anagrélide qui a une action ciblée sur la lignée mégacaryocytaire, et l'interféron alpha pégylé qui peut être utilisé au cours de la grossesse (39).

c) MFP

L'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques est le seul traitement curatif. Elle ne concerne qu'une minorité de patients, suffisamment jeunes et disposant d'un donneur HLA identique.

En dehors de l'allogreffe, le traitement de la MFP est guidé par l'évaluation pronostique : le traitement myélofreinateur est réservé aux formes prolifératives sévères caractérisées par une hyperleucocytose, une blastose sanguine, une anémie, une thrombocytose, une splénomégalie volumineuse ou symptomatique. Lors de l'introduction du traitement, une surveillance hebdomadaire de l'hémogramme est nécessaire car la fibrose médullaire majore la toxicité des thérapeutiques. Le traitement de choix est l'hydroxyurée. Le pipobroman et l'interféron alpha sont utilisés en cas d'intolérance à l'hydroxyurée (39). Plusieurs inhibiteurs de JAK2 sont en essai clinique. Deux études randomisées comparant le ruxolitinib (un inhibiteur de JAK1 et JAK2) et un placebo ont été publiées et ont montré une amélioration des signes généraux et une réduction de la splénomégalie (53, 54) .

Le traitement des cytopénies repose sur les transfusions, les dérivés androgéniques, la corticothérapie, l'EPO. La splénectomie, avec un taux de complications de 40% et un taux de mortalité de 7% est de plus en plus exceptionnelle surtout depuis l'emploi des inhibiteurs de JAK2 (39).

6) Autres étiologies de polyglobulies et de thrombocytoses

En dehors des SMP Ph1-, il existe des causes fréquentes de polyglobulie et de thrombocytose. Ce sont dans ce cas des polyglobulies et des thrombocytoses qualifiées de réactionnelles. Ces causes doivent être écartées avant de s'orienter vers un diagnostic de SMP.

a) Polyglobulies

En dehors des SMP Ph1-, le diagnostic de polyglobulie (ou érythrocytose) doit être envisagé quand l'hémoglobine est supérieur à 18,5 g/dL chez l'homme et supérieur à 16,5 g/dL chez la femme. Les bilans de première intention afin de déterminer le mécanisme de la polyglobulie sont : un hémogramme complet, un ionogramme, un bilan hépatique, un gaz du sang, la recherche clinique et échographique d'une splénomégalie et la recherche d'une mutation de JAK2 lorsque ces examens sont normaux.

i. Polyglobulies acquises

Deux grands mécanismes physiopathologiques peuvent être à l'origine d'une polyglobulie secondaire :

- Une hypoxie sanguine ($\text{SaO}_2 < 92\%$) fréquemment retrouvée chez les patients insuffisants respiratoires chroniques, au cours de cardiopathies congénitales cyanogènes, lors d'un séjour prolongé en altitude élevée ou lors d'un tabagisme excessif (par excès de monoxyde de carbone et défaut de délivrance d'oxygène dans les tissus).
- Une sécrétion inappropriée d'EPO provoquée par une maladie rénale (tumeurs, rein polykystique, hydronéphrose...), des lésions hépatiques (hépatome, cirrhose, hépatite), une tumeur endocrine (Cushing) ou d'autres tumeurs diverses (hémangiome cérébelleux, tumeur de l'ovaire...).

ii. Polyglobulie des autres SMP

Une augmentation de la masse sanguine totale est retrouvée dans quelques cas de LMC avec chromosome Philadelphie, de MFP ou de TE.

iii. Erythrocytose pure

C'est une érythrocytose absolue, acquise, isolée, JAK2 négative sans cause secondaire d'érythrocytose et sans les critères d'une PV. Néanmoins, dans 5 à 10% des cas, après quelques années, les critères d'une PV apparaissent. Le mécanisme est mal compris car aucun argument en faveur d'une maladie clonale n'a été retrouvé. C'est un diagnostic d'élimination (55).

iv. Polyglobulies congénitales

Elles sont très rares et peuvent avoir une origine primitive, dans laquelle un domaine régulateur négatif intracytoplasmique du récepteur de l'EPO est tronqué, à cause de l'insertion d'une guanine provoquant un décalage du cadre de lecture. Les patients porteurs de cette anomalie ont un tableau de polyglobulie avec une concentration sérique d'EPO basse et une pousse spontanée des progéniteurs érythrocytaires (56). L'origine de ces polyglobulies peut également être secondaire, dans le cas des mutants de l'hémoglobine à affinité accrue pour l'oxygène, ou d'un déficit en 2,3-DPG mutase qui provoque également une augmentation de l'affinité de l'hémoglobine pour l'oxygène et une érythrocytose compensatrice par diminution de la libération d'oxygène dans les tissus.

Il existe des polyglobulies isolées chez les patients présentant une trisomie 21 mais la cause est inconnue.

v. *Fausses polyglobulies*

- Les patients atteints de thalassémie mineure présentent une fausse polyglobulie par augmentation du nombre de globules rouges. Une microcytose est associée.
- Par déshydratation (hémococoncentration, grands brûlés, diurétiques...) : l'hématocrite est élevée mais le volume plasmatique est diminué.
- La polyglobulie relative ou de stress ou syndrome de Geisbock touchant le plus souvent des hommes d'âge mûr, pléthoriques et hypertendus.

b) Thrombocytoses

Une thrombocytose est définie par une numération plaquettaire $> 450\text{G/L}$. Les thrombocytoses réactionnelles représentent environ 90% des étiologies de thrombocytose (57).

i. *Thrombocytoses d'entraînement*

Elles sont observées au décours d'actes chirurgicaux importants, d'un accouchement prolongé ou lors de grands traumatismes. En général le chiffre des plaquettes ne dépasse pas 600 à 800G/L. Une thrombocytose transitoire de rebond peut accompagner certaines situations pathologiques comme la régénération médullaire faisant suite à une hémorragie ou une hémolyse, ou au cours du traitement d'une thrombopénie périphérique. Certains médicaments (adrénaline, facteurs de croissance, antibiotiques, héparine de bas poids moléculaire) peuvent également être à l'origine d'une augmentation des plaquettes. Ces thrombocytoses sont transitoires (58).

ii. *Pathologies inflammatoires et infectieuses*

Une augmentation des plaquettes est fréquemment retrouvée chez les patients atteints de maladies inflammatoires aiguës ou chroniques telles que les polyarthrites chroniques, la rectocolite hémorragique, la colite ulcéreuse ou les connectivites. Les infections bactériennes sévères et prolongées sont également une cause de thrombocytose. Une corrélation est souvent observée entre l'importance de l'état inflammatoire et la thrombocytose qui peut atteindre des valeurs jusqu'à 1000 G/L. Sur le plan biologique, après une phase d'hypochromie isolée, une anémie microcytaire apparaît et s'accompagne classiquement d'une hyperleucocytose à polynucléaires neutrophiles et d'une discrète myélémie. Les paramètres classiques de l'inflammation : vitesse de sédimentation et CRP sont augmentés (58).

iii. Carence martiale

Une carence martiale s'exprime fréquemment sur le plan biologique par une anémie hypochrome microcytaire ainsi que par une thrombocytose modérée rarement supérieure à 800 G/L. La diminution de la ferritine et du fer sérique confirme le diagnostic. La numération plaquettaire se normalise après correction de la carence par supplémentation en sels ferreux. Toutefois, au cours de carences martiales très profondes, la numération plaquettaire peut être normale ou diminuée.

iv. Thrombocytose post-splénectomie

Après splénectomie, l'élévation du chiffre de plaquettes débute dans les 24 à 48 heures et atteint sa valeur maximale vers le 14^e jour (jusqu'à 1000 G/L) (58). Une hyperleucocytose à polynucléaires neutrophiles est fréquemment associée. La thrombocytose régresse ensuite au bout de quelques semaines mais elle persiste le plus souvent. On observe également une thrombocytose dans les asplénies qu'elles soient congénitales ou acquises (par exemple chez le sujet drépanocytaire homozygote).

v. Cancers

Les cancers, par le biais d'une inflammation ou par la sécrétion d'équivalents de facteurs thrombopoïétiques représentent 13% des causes de thrombocytose secondaire (57). Le chiffre des plaquettes peut dépasser 1000 G/L.

vi. Thrombocytose et hémopathies

Au-delà de la TE, une thrombocytose est fréquemment retrouvée au cours des SMP et de certains syndromes myélodysplasiques comme le syndrome 5q- et l'ARSI-T (anémie réfractaire sidéroblastique avec thrombocytose).

B. Les microparticules

1) Définition

Les microparticules sont des fragments membranaires phospholipidiques de taille comprise entre 0,1 et 1µm de diamètre. Elles correspondent à un bourgeonnement de la membrane plasmique consécutif à l'activation cellulaire ou à l'apoptose. Ces MP exposent à leur surface la phosphatidylsérine et des antigènes membranaires caractéristiques de la cellule dont elles sont issues. Longtemps considérées comme des débris cellulaires dépourvus de fonction biologique propre, ces microparticules (MP) sont détectables dans le sang en dehors de toute situation pathologique. Néanmoins, il a été récemment démontré que les MP jouent un rôle dans l'inflammation, la coagulation et les fonctions vasculaires. Elles sont impliquées dans la signalisation cellulaire et la régulation de nombreux processus pathologiques dont la néoangiogénèse (59). Toute cellule peut produire des MP.

2) Formation des MP

a) La membrane plasmique au repos

A l'état non activé, la membrane plasmique des cellules est constituée d'une bicouche continue de phospholipides, dont les surfaces externe et interne sont hydrophiles, et dont l'intérieur est de nature hydrophobe, lipidique. La phosphatidylcholine (PC) et la sphingomyéline (SM) sont localisées sur la couche externe de la membrane cellulaire alors que les aminophospholipides : phosphatidylsérine (PSer) et phosphatidyléthanolamine (PE) sont retrouvés au niveau du feuillet interne de la membrane plasmique (Figure 6a). Cette asymétrie de répartition est un processus actif consommant de l'énergie. La perte de cette asymétrie conduit à l'externalisation des phospholipides anioniques (PSer et PE) notamment lors de l'activation cellulaire, l'apoptose ou lors de la nécrose.

Cinq enzymes sont impliquées dans la régulation de l'asymétrie phospholipidique membranaire et la génération de microparticules :

L'aminophospholipide translocase « flippase »

L'aminophospholipide translocase ou « flippase » est une enzyme ATP dépendante, ubiquitaire, hautement spécifique du transport de la PSer et de la PE du feuillet externe de la membrane plasmique vers son feuillet interne. Pour chaque molécule de PSer transportée, une molécule d'ATP est nécessaire. L'augmentation du calcium cytosolique inhibe l'action de la flippase. Au repos, cette enzyme est active, le calcium étant maintenu dans le réticulum endoplasmique lisse (60).

La floppase

La floppase est également une enzyme ATP dépendante, ubiquitaire, responsable du transport des lipides (donc non spécifique des phospholipides) du feuillet interne vers le feuillet externe. Elle intervient en collaboration étroite avec la flippase dans le maintien de l'asymétrie membranaire (60).

La scramblase

La scramblase est une enzyme calcium dépendante, ubiquitaire, permettant un transport aspécifique bidirectionnel des phospholipides au travers de la membrane plasmique. Elle est inactive dans la cellule au repos (60, 61)

La calpaïne

La calpaïne est une cystéine protéase de la famille des papaïnases, ubiquitaire, qui est activée par une augmentation de la concentration en calcium cytosolique. La calpaïne est responsable de la libération de MP soit après clivage des filaments du cytosquelette ce qui facilite le bourgeonnement de la membrane plasmique soit après activation de l'apoptose via la procaspase 3 et Bcl-xL. Dans le purpura thrombotique thrombocytopénique (PTT), l'activité de la calpaïne circulante est fortement associée à la génération de microparticules plaquettaires (60).

La gelsoline

La gelsoline est une enzyme spécifique des plaquettes. Après activation par une augmentation du calcium cytosolique, elle dégrade la coiffe protéique constituée d'adducine et de capZ. Cette coiffe est située à l'extrémité des filaments d'actine du cytosquelette. Elle bloque les interactions entre les filaments du cytosquelette (actine, spectrine et filamine) ce qui permet le maintien de la structure cellulaire. La dégradation de la coiffe protéique permet la réorganisation des filaments du cytosquelette et une contraction de la plaquette (60).

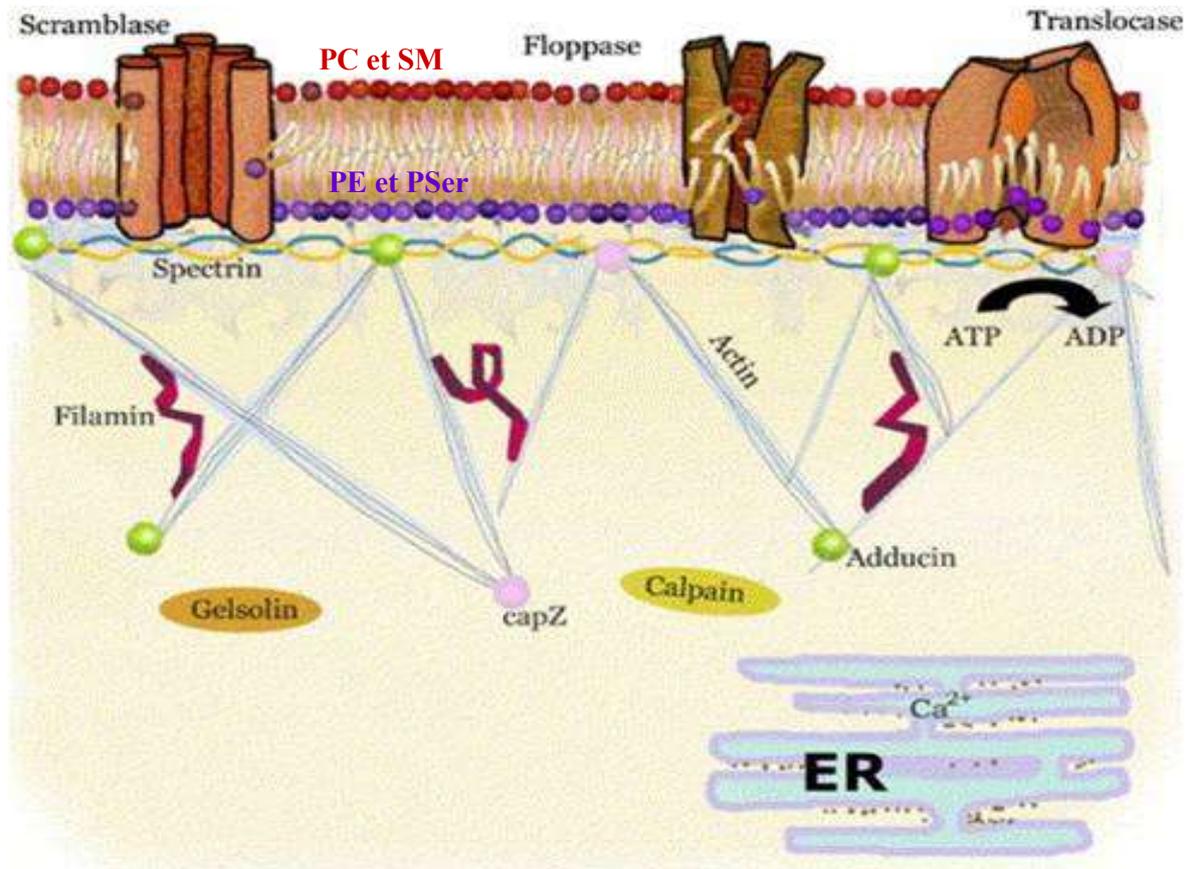


Figure 6a : Représentation schématique du cytosquelette au repos. Le calcium est stocké dans le reticulum endoplasmique (ER) (60).

b) Bourgeonnement de la membrane plasmique et libération des MP

En réponse à une stimulation ou au cours du processus d'apoptose, l'augmentation brutale du calcium cytosolique inhibe l'activité flippase et active parallèlement la floppase et la scramblase provoquant ainsi l'externalisation précoce de PSer (figure 6b). La PSer externalisée constitue un signal de reconnaissance permettant la clairance des cellules sénescents par le système réticulo-endothélial. L'influx calcique favorise également l'activité de la calpaïne et de la gelsoline qui interviennent dans la dissociation des structures membranaires du cytosquelette (figure 6b et 6c). L'afflux de PSer au niveau du feuillet externe et la protéolyse du cytosquelette provoquent le bourgeonnement de la membrane plasmique et la libération dans le sang des MP caractéristiques de la cellule émettrice (figure 6c et 6d) (62). De par leur petite taille, les MP diffusent rapidement et échappent en partie à la phagocytose.

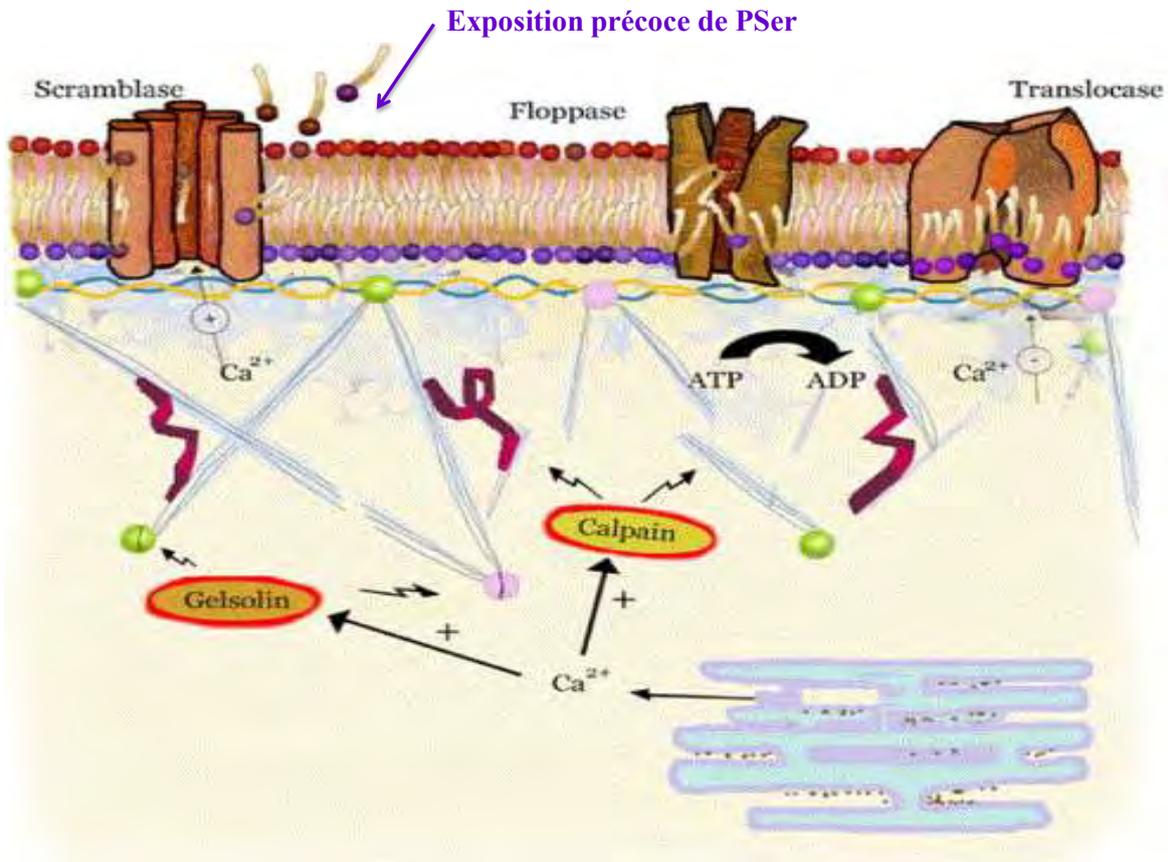


Figure 6b : Activation cellulaire. Le calcium est relargué par le ER ce qui conduit à l'activation de la calpaïne et de la gelsoline (60).

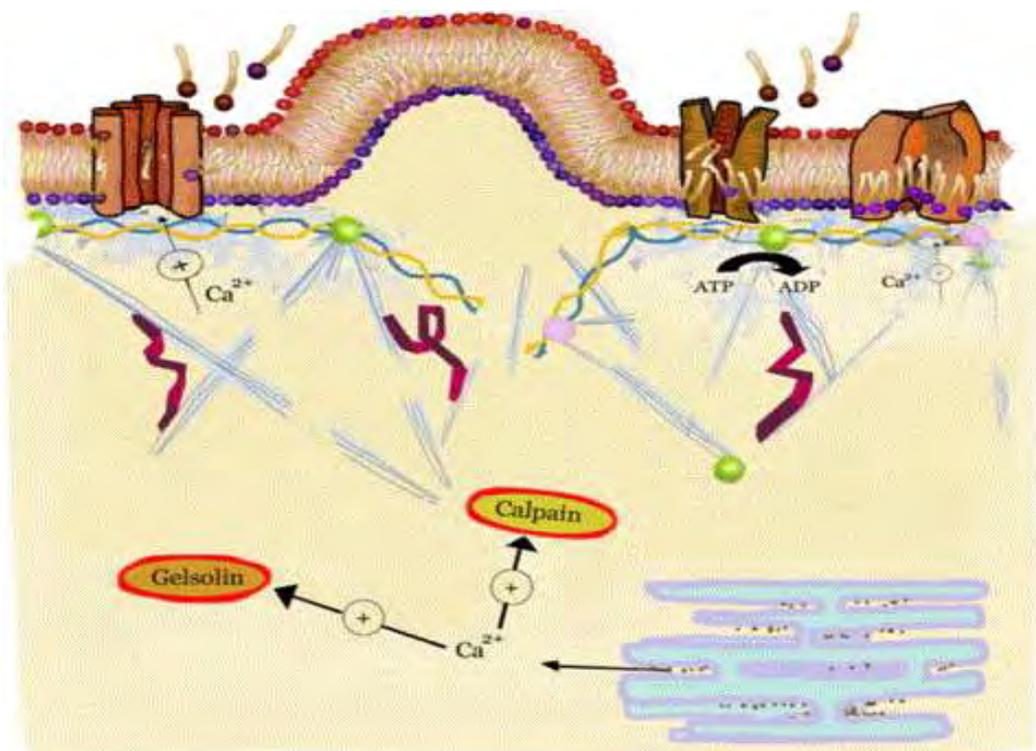


Figure 6c : Perturbations du cytosquelette suivant l'activation cellulaire. Les protéines d'ancrages au cytosquelette sont clivées ce qui permet le bourgeonnement cellulaire (60).

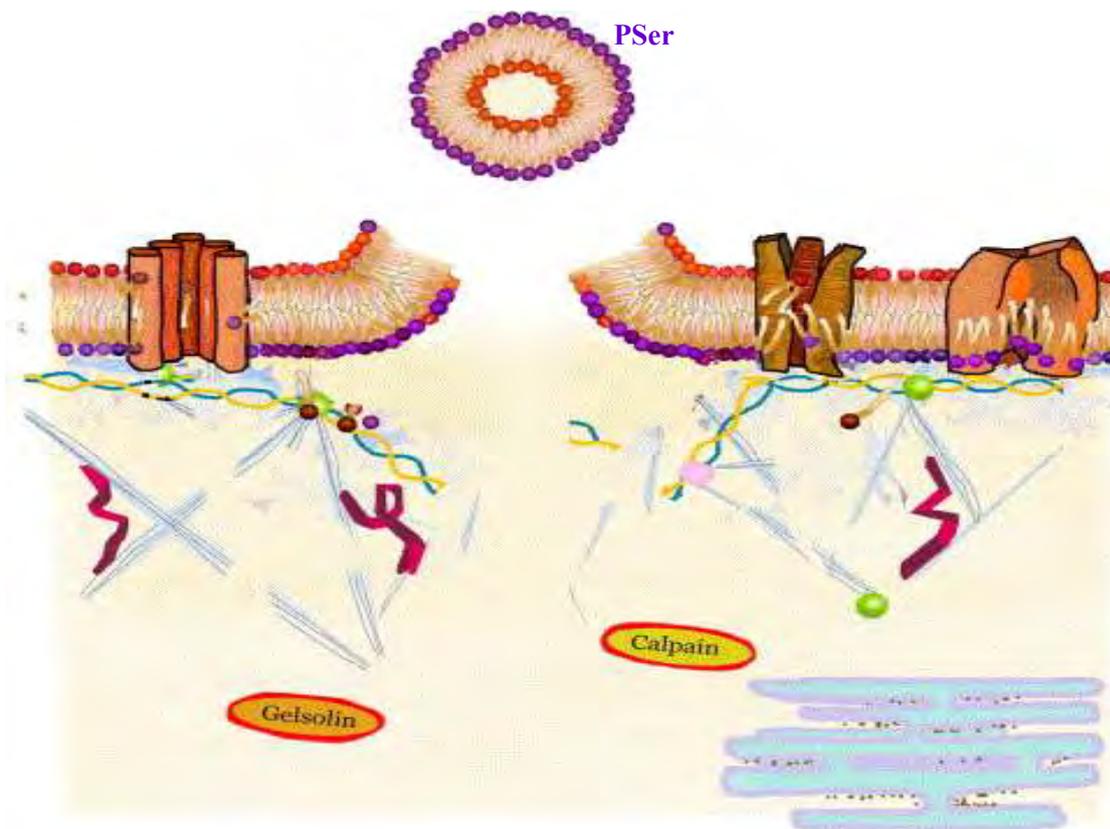


Figure 6d : La microparticule libérée expose la PSer à sa surface (60).

3) Composition et caractéristiques phénotypiques des MP circulantes

Il est possible de déterminer l'origine cellulaire des MP en fonction de l'expression de leurs antigènes membranaires qui sont caractéristiques de la cellule émettrice (tableau 2). Cependant, selon la nature du stimulus (qu'il soit inflammatoire ou apoptotique par exemple), la composition des MP circulantes en lipides oxydés varie. Les MP sont ainsi capables d'acquérir des antigènes membranaires lors d'un contact avec des cellules différentes de leur cellule d'origine mais également de transmettre ces antigènes à d'autres cellules (63).

cellule émettrice	antigènes de surface caractéristiques
érythrocyte	CD235(a) (GPA)
monocyte	CD14
granulocyte	CD11b, CD66b
lymphocyte	CD3, CD4, CD8
plaquette	GpIb (CD42b), PECAM-1 (CD31), GPIIbIIIa (CD41), P-selectine (CD62p), Gp IX(CD42), Gp IIIa (CD61)
endothélium	CD31 (PECAM1), CD51, CD54 (ICAM1), CD62E (E-sélectine), CD105, CD144, CD146,

Tableau 2 : Cellules émettrices et leurs principales caractéristiques antigéniques (64).

Au cours du processus inflammatoire, les cellules endothéliales, les monocytes, les granulocytes et les plaquettes expriment le CD142 ou facteur tissulaire.

Les microparticules plaquettaires (PMP) représentent 90% des MP présentes dans le sang périphérique et ont un rôle procoagulant particulièrement important (65, 66).

Il est important de différencier les MP des exosomes qui sont de simples granules de sécrétion des plaquettes activées de taille plus petite que les PMP (30 à 90 nm). Les exosomes sont caractérisés par leur pauvreté relative en Pser par rapport aux MP. Ils sont probablement spécialisés dans la maturation cellulaire et la réponse immune mais n'ont pas de rôle procoagulant (61).

4) Rôle des MP

a) Rôle procoagulant

La génération des microparticules est indispensable à la coagulation. Un défaut de génération de MP est responsable de syndromes hémorragiques tels que le syndrome de Scott. Dans cette pathologie, le défaut de vésiculation est associé à un déficit de transport de la Pser au feuillet externe de la membrane plasmique (67). Les MP circulantes, principalement d'origine plaquettaire, du fait de leur richesse en Pser permettent l'assemblage des complexes de la coagulation « tenase » et « prothrombinase » et la génération de thrombine. Les phospholipides à la surface des MP plaquettaires et endothéliales fournissent un grand nombre de sites de fixation des facteurs IIa, Va, VIII et IXa (60, 61).

La P_{Ser} augmente également l'activité procoagulante du facteur tissulaire (FT) qui est l'initiateur cellulaire majeur de la coagulation. La P-sélectine joue un rôle important dans l'initiation du processus thrombotique en recrutant des MP porteuses de PSGL1 (P-selectin glycoprotein ligand-1) riches en facteur tissulaire. Elle induit également la synthèse de facteur tissulaire par les monocytes et la génération de nouvelles MP procoagulantes.

Ces MP peuvent se lier au fibrinogène soluble ou immobilisé au sein d'agrégats leucoplaquettaires permettant de concentrer l'activité facteur tissulaire au site de l'endothélium lésé. L'activité facteur tissulaire du compartiment vasculaire est ainsi médiée par les MP plaquettaires principalement (68).

b) Autres rôles

Les MP sont de véritables effecteurs cellulaires intervenant dans la régulation de l'hémostase, l'inflammation, le tonus vasculaire et l'angiogénèse. Les MP interviennent ainsi dans de nombreux processus biologiques comme le montre le tableau 3 ci-dessous.

Domaine d'action / pathologie	Effets biologiques	Origines cellulaires des MP
Hémostase, coagulation, thrombose	Exposition de P _{Ser} , 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 TXA ₂ 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 (TGF β)	Plaquettes, leucocytes
Adhésion cellulaire	Augmentation de l'expression de cytoadhésines sur les cellules cibles	Plaquettes, leucocytes
Angiogénèse	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	Angiogénèse, tolérance immune, résistance aux cytotoxiques	Cellules tumorales, plaquettes
SIDA	Transmission de corécepteurs du VIH CCR5, CXCR4	Monocytes, plaquettes, mégacaryocytes

Tableau 3 : Principaux effets biologiques des microparticules (61).

5) Implication en pathologie

Les MP sont présentes aussi bien dans la phase aiguë que dans la phase chronique de diverses pathologies. Pendant la phase aiguë, les modifications de l'endothélium et l'activation de la coagulation sont associées à une augmentation des MP d'origine plaquettaire, endothéliale, érythrocytaire et monocytaire. De plus l'expression du FT par l'endothélium augmente.

Pendant la phase chronique, les MP détectées sont d'origine endothéliale, plaquettaire et monocytaire. La numération des MP au cours de la phase chronique pourrait ainsi être un outil supplémentaire pour l'évaluation de l'évolution de nombreuses pathologies ainsi que pour l'appréciation de l'effet des thérapeutiques.

Syndrome coronarien aigu (SCA)

Au niveau artériel, les MP contenues dans la plaque d'athérome sont particulièrement riches en FT et constituent l'acteur majeur de la thrombogénicité de la plaque. Lors de la rupture de la plaque d'athérome, les plaquettes, les facteurs de la coagulation, les MP circulantes et les MP hautement thrombogènes normalement séquestrées dans la paroi se retrouvent en contact ce qui provoque la formation d'un thrombus artériel (69).

Chez les patients atteints de SCA, l'augmentation de la concentration des microparticules endothéliales (EMP) dans le sang est une preuve directe de la lésion de l'endothélium car elles sont en lien avec le détachement des cellules endothéliales lors de la rupture de la plaque d'athérome. L'augmentation des EMP dans les SCA est également corrélée aux taux plasmatiques de facteur von Willebrand et d'Il6 qui reflètent l'inflammation vasculaire (70). Ces MPE sont un marqueur précoce de SCA, indépendant de la troponine. La concentration des EMP est corrélée avec les images angiographiques et la sévérité des sténoses (71).

Accidents vasculaires cérébraux (AVC)

Dans les AVC, la concentration des EMP est corrélée avec la concentration du facteur von Willebrand et de la E-sélectine soluble qui sont des marqueurs de l'atteinte vasculaire (72). De plus, il existe un lien entre la numération des EMP et l'importance de la lésion ischémique au diagnostic dans les vaisseaux de petit et gros calibres. Ceci suggère une corrélation entre la concentration d'EMP et le degré d'apoptose endothéliale et d'inflammation à l'intérieur de la lésion ischémique (73).

Thrombose veineuse profonde et embolie pulmonaire

Dans les processus thrombotiques veineux, l'adhésion de neutrophiles, de MP et de plaquettes au site de l'endothélium lésé est un mécanisme précocement associé à la formation d'un thrombus veineux. Cette adhésion est médiée par les interactions P-sélectine/PSGL1. La P-sélectine plaquettaire et endothéliale permet l'adhésion des leucocytes et le recrutement des PMP tous deux riches en PSGL1 sur l'endothélium.

Au diagnostic de thrombose veineuse profonde, les PMP sont corrélées avec l'augmentation des D-dimères et de la P-sélectine (74).

Cancer

Au cours du premier trimestre de la grossesse, les cellules trophoblastiques génèrent des MP capables d'induire l'apoptose de lymphocytes T par l'intermédiaire d'interactions Fas-Ligand/Fas (75). L'apoptose induite par ce type de MP pourrait constituer un processus d'échappement des cellules cancéreuses à la réponse immune en ciblant les cellules du système immunitaire porteuses de Fas ou en diminuant le taux d'expression de Fas-ligand disponible à la surface tumorale. De plus, le FT porté par les MP augmente la synthèse du VEGF (vascular endothelial growth factor) qui est un puissant régulateur de l'angiogénèse, de la croissance tumorale et du potentiel métastatique (76).

Le tableau 4 ci-dessous illustre les principales implications des MP en pathologie.

Pathologie	PMP	EMP	MoMP	GMP	HeMP	Principales implications cliniques démontrées
Drépanocytose	↗	↗	↗	↗	↗	Les MP FT augmentent pendant les crises vaso-occlusives
Hémoglobinurie paroxystique nocturne	↗	↗	↗			Les MP exercent une action procoagulante
Syndrome des antiphospholipides		↗				Les EMP sont corrélées avec l'anticoagulant lupique
Thrombopénie induite à l'héparine	↗	↗				Les PMP activent la coagulation
Diabète	↗	↗	↗	↗		L'activité procoagulante des MP varie avec le cycle glycémique
Insuffisance rénale chronique	↗	↗	↗	↗	↗	Les EMP sont corrélées avec la perte des fonctions endothéliales
Syndrome coronarien aigu	↗	↗				Les EMP sont corrélées avec les images angiographiques et la sévérité des sténoses
Accident vasculaire cérébral	↗	↗				Les EMP sont augmentées dans les vaisseaux de petit et gros calibres dans les démences vasculaires
Thrombose veineuse profonde et embolie pulmonaire	↗	↗				Les PMP sont corrélées avec l'augmentation des Ddimères et de la P-sélectine au diagnostic de thrombose veineuse profonde
Sepsis	↗	↗	↗	↗	↗	Les MP activent la coagulation
Cancer	↗		↗			Les MP-FT sont corrélées avec les métastases et la baisse de la survie

Abréviations : PMP : MP d'origine plaquettaire
 EMP : MP d'origine endothéliale
 MoMP : MP d'origine monocytaire
 GMP : MP d'origine granulocytaire
 HeMP : MP d'origine erythrocytaire

Tableau 4 : Ensemble de pathologies présentant des MP élevées et description de leurs principales implications cliniques (60).

6) Numération des MP

a) Etapes préanalytiques

Les trois principaux paramètres pré-analytiques majeurs influençant la numération des MP sont le délai avant la première centrifugation, l'agitation des tubes durant le transport et le protocole de centrifugation.

i. Recueil de l'échantillon

Le sang est collecté au niveau de la veine antécubitale avec une aiguille de type 21G dans un tube citrate à 0,109 M. Les premiers millilitres sont purgés afin d'éviter les artefacts dus à l'activation de la phase contact lors du prélèvement.

L'EDTA et l'héparine provoquent une génération artéfactuelle de microparticules. Il est donc très important de ne pas utiliser ces anticoagulants. En revanche, il n'a pas été mis en évidence de différence significative entre la numération des MP sur tubes citrates ou sur tubes CTAD. L'application d'un garrot léger (20 mmHg) ou celle d'un garrot plus fort (80 mmHg) n'influence pas la numération des microparticules. Enfin, le type d'aiguille utilisé (ailettes ou aiguille droite) n'a pas d'influence sur la numération des microparticules (77).

Après le prélèvement, une forte agitation durant le transport du tube jusqu'au laboratoire provoque une augmentation critique du nombre de MP. Une moindre variation du nombre de MP est obtenue lorsque les tubes sont maintenus en position verticale durant le transport.

Aussitôt que le délai entre le prélèvement veineux et la première étape de centrifugation est supérieur à une heure, une augmentation significative de la numération des MP est constatée. Cependant, l'augmentation du nombre de MP durant les deux premières heures demeure modérée, ce qui reste compatible avec la pratique courante des laboratoires hospitaliers (77).

ii. Centrifugation

Les conditions de centrifugation : temps et vitesse, varient beaucoup selon les études (60, 78). La première étape de centrifugation à 2500G pendant 15 minutes permet d'obtenir un plasma pauvre en plaquettes. Cependant, il reste toujours des plaquettes à l'issue de la première centrifugation. Une deuxième étape de centrifugation à 13000G pendant 2 minutes permet d'obtenir du plasma déplaqueté. Cependant comme des centrifugeuses ultrarapides ne sont pas toujours disponibles dans les laboratoires, la deuxième centrifugation peut également se faire à 2500G pendant 15 minutes (77).

iii. Congélation

Aucun impact majeur de la congélation profonde à -80°C sur la numération des MP n'a été retrouvé dans les différentes études (79). La numération des MP reste constante après un an de congélation à -80°C (80).

La décongélation des échantillons au bain marie à 37°C avant analyse permet de limiter la génération *in vitro* des MP (77).

b) Principales techniques de numération des MP

Les deux principales techniques de numération des MP sont l'immunocapture sur plaque et la cytométrie en flux.

i. Dénombrement des microparticules par immunocapture sur plaque

Le principe repose sur la capture des MP riches en PSer par de l'annexine V coatée sur des plaques multipuits.

L'annexine V est immobilisée sur des plaques multipuits. Les MP riches en PSer sont capturées en raison de la grande affinité de la PSer pour l'annexine V. La quantification des MP capturées est réalisée en mesurant l'activité prothrombinase par un test fonctionnel de type enzymatique. Les phospholipides portés par les MP sont le facteur limitant de la transformation de prothrombine en thrombine. Les valeurs des taux de MP sont exprimées en équivalents de PSer par référence à une courbe de calibration obtenue avec des vésicules synthétiques contenant 33% de PS. Le phénotypage des MP est réalisé de la même façon en remplaçant l'annexine V par un anticorps spécifique des lignées cellulaires étudiées (par exemple anti CD31 pour l'endothélium...). Le principal avantage de ce système est de permettre une évaluation du caractère procoagulant (quantité de thrombine générée) des MP capturées. Cette technique est plus économique que la cytométrie en flux car elle permet l'analyse de nombreux échantillons à la fois. L'inconvénient de cette méthode est de sous estimer les MP pauvres en PSer (60, 61).

Cette technique permet une numération des MP basée sur leur activité fonctionnelle, alors que la cytométrie en flux permet une numération des MP basée sur leur taille et les antigènes que ces MP expriment à leur surface.

ii. *Dénombrement des microparticules par cytométrie en flux*

La cytométrie en flux est la méthode de choix pour l'étude des microparticules. Il s'agit cependant d'une technique délicate car, les MP mesurant entre 0,1 et 1 μ m, il faut se placer dans des zones proches de la limite de sensibilité des cytomètres en ce qui concerne la détection de la taille. De plus, il est nécessaire de vérifier la propreté du cytomètre avant chaque série d'échantillon afin que des poussières ne soient pas numérees comme des MP. Les microparticules expriment l'annexine V qui se lie spécifiquement aux phospholipides chargés négativement comme la PS. La caractérisation et l'analyse des MP par cytométrie en flux (CMF) s'effectuent grâce à un double marquage par l'annexine V et un autre marqueur spécifique de la lignée cellulaire à étudier. La zone de taille des MP est définie en utilisant un mélange de billes fluorescentes de diamètres différents. La cytométrie en flux permet de déterminer le nombre d'évènements (forward scatter) ainsi que la densité des évènements (side scatter). L'avantage de cette technique est de pouvoir identifier les MP pauvres en Pser cependant elle ne permet pas la caractérisation de leur activité procoagulante (60).

II. PRESENTATION ET OBJECTIF DE L'ETUDE

Depuis quelques années, le laboratoire d'hématologie du Groupe Hospitalier de l'Institut Catholique de Lille (GHICL) s'intéresse à la physiopathologie des SMP, et en particulier à l'implication des Microparticules plaquettaires (PMP) dans les complications thrombotiques caractéristiques de ces pathologies. Dans ce but, un protocole d'étude multicentrique a été mis en place en 2010 : « Rôle des microparticules pro-coagulantes circulantes dans l'hypercoagulabilité des syndromes myéloprolifératifs chroniques Philadelphie négatifs », dont l'investigateur coordonnateur est le Docteur Agnès Charpentier et le promoteur est le GHICL. Le travail présenté ici est une étude menée parallèlement à ce protocole afin d'évaluer l'intérêt des PMP pour différencier précocement les PV et TE des causes secondaires de polyglobulie et de thrombocytose.

A. Problématique et objectifs de l'étude

Devant une thrombocytose ou une polyglobulie persistante, le seul critère diagnostique formel en faveur d'un Syndrome Myéloprolifératif est la présence d'une mutation JAK2 ou MPL. Or, si la mutation JAK2 est constatée dans environ 97% de PV, on ne retrouve ce marqueur moléculaire que dans 50% des TE et des MFP. De plus, le test de biologie moléculaire nécessite un délai de réponse de plusieurs semaines. En l'absence de mutation JAK2 ou MPL, le diagnostic de SMP s'avère beaucoup plus difficile et repose sur un ensemble de critères définis par l'OMS en 2008 (20) dans le but de différencier les SMP des autres causes réactionnelles de thrombocytose ou polyglobulie. Parmi ces critères, la biopsie ostéo-médullaire est un examen invasif et non dénué de risque hémorragique chez des patients potentiellement porteurs de SMP en raison de la fréquence des thrombopathies sous-jacentes. Pour ces raisons, nous avons cherché à mettre en évidence de nouveaux marqueurs diagnostiques simples, rapides et non invasifs permettant de différencier les SMP des thrombocytoses ou polyglobulies secondaires.

Des travaux préliminaires de l'équipe du laboratoire d'hématologie du GHICL (81, 82) ainsi que les études de Trappenburg et Villmow (66, 83) portant sur de petites séries de patients, ont mis en évidence une augmentation des microparticules plaquettaires circulantes dans les SMP Ph1- par rapport à des témoins sains. La numération des microparticules plaquettaires circulantes est un test non invasif dont les résultats peuvent être rapidement rendus. Ces résultats préliminaires nous ont ainsi incité à continuer le travail sous l'angle de l'apport diagnostique de la numération des microparticules plaquettaires afin de fournir une orientation rapide aux cliniciens sur la nature primitive ou secondaire d'une polyglobulie ou thrombocytose.

L'objectif principal de notre travail a ainsi consisté à étudier si la numération des microparticules plaquettaires permet de différencier les SMP des polyglobulies et thrombocytoses de cause secondaire.

Pour cela, nous avons comparé la concentration des microparticules plaquettaires sanguines circulantes dans chacun des trois sous-groupes de patients suivis pour un SMP Ph1- (PV, TE et MFP) avec un groupe de témoins sains et un groupe de patients présentant des causes secondaires de polyglobulie ou de thrombocytose. Chez ces mêmes patients, nous avons également étudié les autres catégories de microparticules ainsi que les MP coexprimant des marqueurs de différentes lignées. On suppose en effet que les MP peuvent acquérir au contact d'autres cellules des antigènes de surface différents de ceux de la lignée dont ces MP sont issues.

Les objectifs secondaires de notre travail ont consisté à étudier l'implication des PMP dans le pronostic et l'évolution des SMP Ph1-. Dans ce but, nous avons cherché une corrélation entre la concentration des PMP et les différents facteurs pronostiques connus : âge, leucocytose, thrombocytose, état mutationnel de JAK2 et de MPL, facteurs de risque cardiovasculaires (hypertension artérielle, diabète, hypercholestérolémie, tabac). De même, nous avons évalué l'implication des PMP dans le pronostic en étudiant l'évolution des PMP selon le traitement myélofreinateur ainsi que la réponse hématologique.

B. Schéma général de l'étude

1) Recrutement des patients

Les patients atteints de PV, TE et MFP étaient recrutés, selon les critères suivants, lors d'une consultation dans le service des maladies du sang du CHRU de Lille ou du GHICL :

- Age > 18 ans
- Diagnostic avéré de SMP Phi négatif (PV, TE ou MFP) selon les critères de l'OMS 2008

Certains patients n'étaient pas traités au diagnostic, d'autres avaient un traitement en cours. Parmi les patients non traités au diagnostic, certains ont bénéficié d'une numération des PMP tous les 6 mois pendant 2 ans.

De plus, des patients présentant des causes secondaires de thrombocytose et de polyglobulie ont été recrutés dans les différents services du GHICL après s'être assuré qu'ils ne présentaient pas d'antécédent thrombotique ni de néoplasie.

2) Recrutement des témoins

Les témoins ont été recrutés, selon les critères d'inclusions ci dessous, parmi les patients consultants dans le service des maladies du sang du GHICL ou du CHRU pour un motif bénin ou lors d'un bilan systématique dans le cadre d'une consultation d'une spécialité non associée à un risque thrombotique. :

- Sujets sains, ayant une numération formule sanguine et plaquettaire normale
- Absence d'antécédent thrombo-embolique personnel
- Absence de facteur de risque thrombo-embolique établi : thrombophilie connue, cancers, et autres maladies associées à un risque thrombotique.
- Absence de grossesse
- Absence de tabagisme actif
- Absence de traitement contraceptif oestrogénique ou de traitement hormonal substitutif chez les femmes

3) Organisation générale des prélèvements et analyses

Au décours de la consultation, un prélèvement sanguin veineux est réalisé par l'infirmière de consultation aussi bien pour les patients que pour les témoins. Ce bilan comporte les examens habituels nécessaires à la prise en charge du patient ainsi qu'un tube citraté de 5 mL supplémentaire destiné à cette étude. Les tubes destinés au dosage des microparticules sont transportés, en évitant toute agitation trop brutale, par un coursier dans un délai inférieur à deux heures au laboratoire de l'hôpital Saint-Philibert pour les patients du GHICL ou au laboratoire d'hémostase (Centre de Biologie et de Pathologie) pour les patients du CHRU. Le laboratoire du GHICL, situé à l'hôpital Saint-Philibert, effectue la numération et la caractérisation des microparticules pour tous les patients (GHICL et CHRU de Lille). Le plasma des patients de consultation du GHICL est congelé à -80°C afin d'effectuer ultérieurement la numération des microparticules plaquettaires. La numération et la caractérisation des microparticules des patients du CHRU sont effectuées sur des plasmas congelés par le laboratoire d'hémostase du CHRU et adressés a posteriori au laboratoire du GHICL.

4) Suivi des patients

Pour les patients atteints de SMP, inclus dans l'étude au diagnostic avant traitement myélofreinateur, la numération des microparticules est réalisée, tous les six mois lors de chacune des consultations requises pour le suivi ainsi que dans les situations nécessitant une consultation anticipée : introduction d'un traitement myélofreinateur, survenue d'un accident thrombotique ou hémorragique, survenue d'un épisode infectieux pendant la période de suivi de l'étude.

La population des témoins ainsi que les populations de patients présentant des causes secondaires de polyglobulie et de thrombocytose n'ont qu'un seul prélèvement initial.

5) Recueil des données

Les données suivantes ont été relevées: âge, sexe, présence ou absence de mutations de JAK2 et MPL, traitement myélofreinateur, facteur(s) de risque cardio-vasculaire, antécédents personnels et familiaux de thromboses, numération formule sanguine.

III. MATERIEL ET METHODE

A. Recueil des échantillons

A chaque visite, le sang des patients est collecté au pli du coude, après ponction veineuse franche avec une aiguille de type 21G dans un tube de 0,129 mol/L de citrate de sodium type Vacutainer® (BD Diagnostics, USA) après une purge des premiers millilitres.

Les échantillons sont acheminés au laboratoire de l'Hôpital Saint-Philibert dans un délai s'échelonnant entre 2 et 4 heures.

B. Méthode analytique

1) Double centrifugation

Une première centrifugation à 2500G (4000 tours/minute) pendant 15 minutes à température ambiante permet de récupérer du plasma pauvre en plaquettes (PPP).

Le plasma est décanté dès l'arrêt de la centrifugeuse en laissant environ 1 centimètre de plasma au dessus du culot pour ne pas contaminer le recueil par les plaquettes.

Le surnageant est ensuite centrifugé dans un petit cône ependorf 2 minutes à 13000G afin d'obtenir du plasma déplaqueté (Platelet Free Plasma ou PFP). Ce PFP est récupéré comme précédemment en laissant dans le fond du culot environ 10% du volume final pour se débarrasser des éventuelles plaquettes résiduelles.

2) Mode de conservation

Après homogénéisation, le PFP est aliquoté dans au moins deux cryotubes étiquetés puis congelés immédiatement à -80° en attente de leur analyse ultérieure.

C. Dénombrement des microparticules par cytométrie en flux

1) Principe

Les MP sont des fragments de membrane plaquettaire qui sont produits au cours de processus d'apoptose ou d'activation cellulaire. Elles sont de taille hétérogène comprise entre 0,1 et 1 μm et sont riches en phosphatidylsérine qui possède une grande affinité pour l'Annexine V. Le dosage des PMP par cytométrie en flux repose donc, parmi les fragments cellulaires de taille inférieure à 1 μm , sur la coexpression du marqueur plaquettaire CD41 (GpIIb) par un anticorps anti-CD41 et de la phosphatidylsérine par fixation spécifique d'Annexine V membranaire. L'addition dans l'échantillon de billes de comptage fluorescentes de concentration connue (Flow CountTM), permet de déterminer la concentration des PMP plasmatiques.

En raison de leur petite taille, l'analyse des MP nécessite de se placer dans des conditions de travail proches de la limite de sensibilité des cytomètres en ce qui concerne la détection de la taille. Au laboratoire de Saint Philibert nous disposons d'un automate de cytométrie en flux qui permet cette détection (Cytomics FC500, Beckman Coulter). Dans la littérature, la limite inférieure de taille de détection a été fixée à 0,5 μm ce qui permet d'exclure le bruit de fond de l'appareil tout en prenant en compte les MP.

Le protocole de dénombrement des microparticules par cytométrie en flux a été décrit en 2007 par Robert et al (84), ce qui a permis de l'adapter à notre laboratoire.

2) Vérification de la propreté de l'appareil

Il est indispensable de vérifier la propreté du cytomètre afin d'éliminer les impuretés qui pourraient être numérées comme des MP. Avant chaque série, un tube contenant environ 0,5 mL d'eau stérile est analysé au cytomètre afin de réaliser un « blanc échantillon ». Pour commencer la série, le nombre d'évènements au bout d'une minute, doit être inférieur à 5 par seconde. Si ce n'est pas le cas au bout de trois fois, une procédure de nettoyage du cytomètre à l'éthanol dilué à 50% doit être lancée. Cette première étape est très importante et doit être respectée.

3) Réglage de la zone d'analyse des MP sur le cytomètre

Le réglage de la zone d'analyse des MP sur le cytomètre s'effectue à l'aide d'un mélange de 3 catégories de billes fluorescentes de diamètres variés couvrant la zone de taille des MP (billes de 0,5 et 0,9 μm) et celle des plaquettes (billes de 3 μm) (Megamix, Biocytex). Ce mélange est également calibré en terme de concentration car il contient deux billes de 0,5 μm pour une bille de 0,9 μm .

Avant chaque série, le Megamix est analysé de la façon suivante :

- 1) On vérifie, en position FL1=1 sur le graphe FL1 Log x SS Log, que les billes sont correctement positionnées dans les zones pré-établies (A, B et C). (figure 7). Si ce n'est pas le cas, on règle le PMT FL1 et/ou SS afin d'y parvenir.

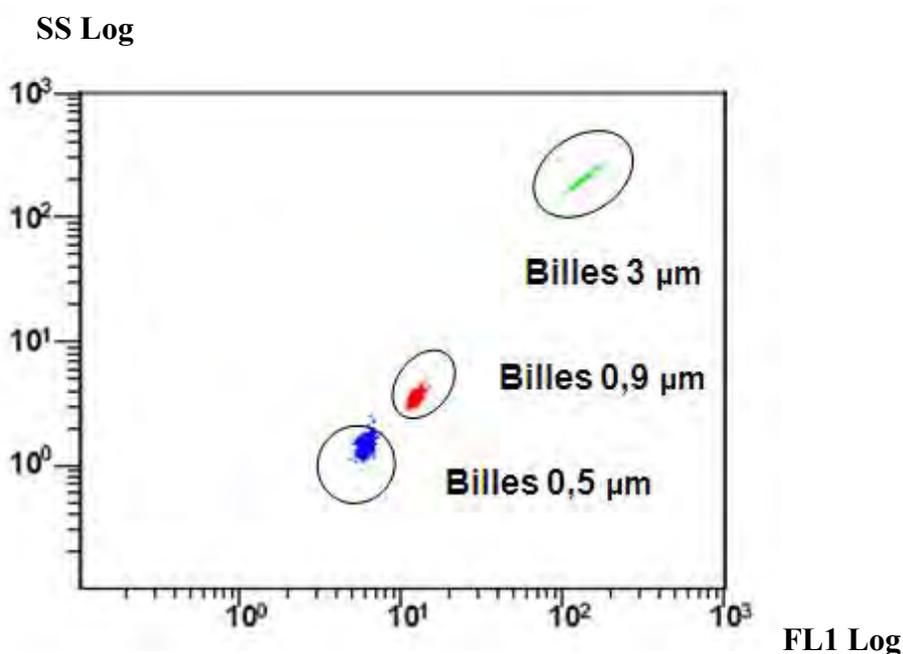


Figure 7 : Répartition des 3 catégories de billes du mélange Mégamix (Biocytex) selon leur intensité de fluorescence

2) On vérifie, en position FS1=1 sur l'histogramme FS LOG x Count, que le pourcentage de billes de 0,5 μm est compris entre 48 et 52% (figure 8). Dans le cas contraire, on modifie le PMT FS comme précédemment. En effet, choisir de détecter un pourcentage de billes de 0,5 μm autour de 50% permet le meilleur compromis entre la détection optimale des PMP et l'exclusion d'autres particules (84).

L'ensemble des billes de 0,5 μm permet de définir la limite inférieure de la fenêtre d'analyse des MP.

Nombre d'évènements

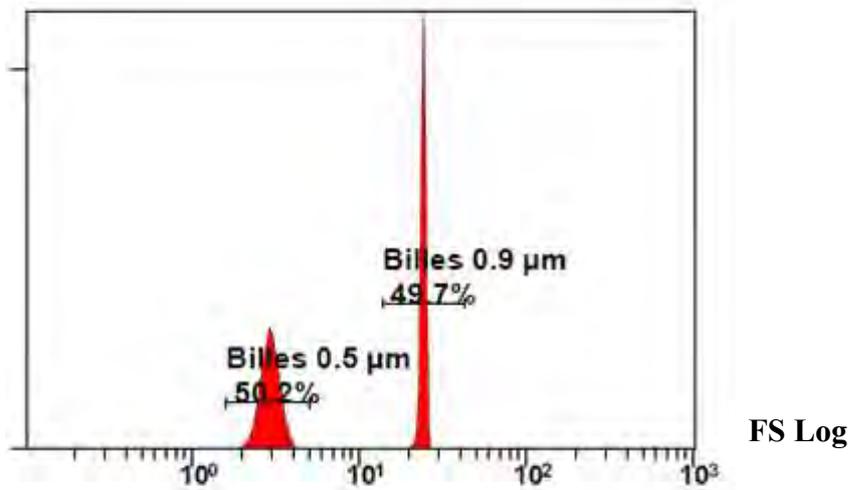


Figure 8 : Répartition des billes Megamix de 0,5 et 0,9 μm selon leur paramètre de taille (FS). La vallée entre les deux pics montre que la résolution du cytomètre est suffisante pour discriminer des microparticules de taille très proche.

3) Enfin, sur le graphe SS Log x FS Log, on vérifie que l'autogate MP (fin du nuage de billes de 0,9 μm) est toujours correctement positionnée. La limite supérieure de la fenêtre d'étude des MP est délimitée par la fin du nuage de 0,9 μm et doit venir tangenter cette autogate (figure 9).

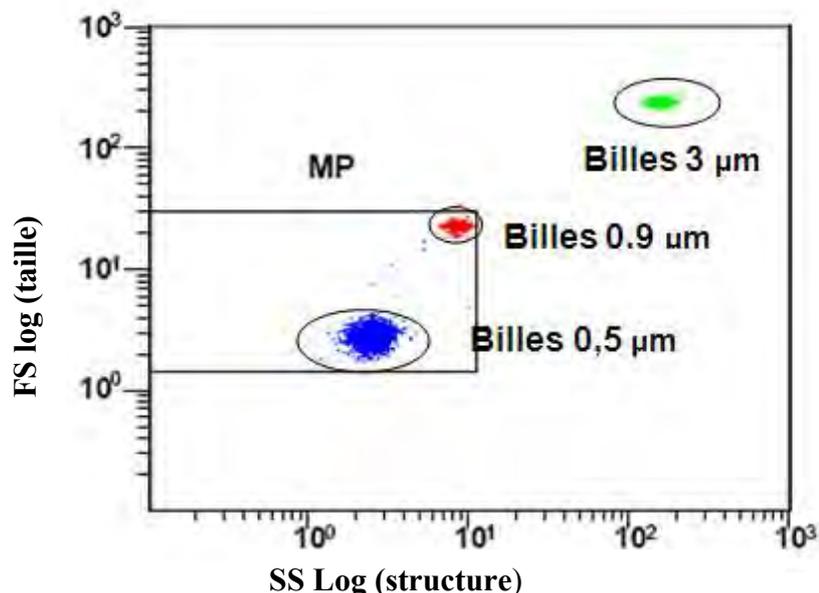


Figure 9 : Définition de la zone d'analyse des microparticules (MP) à l'aide du mélange de billes Mégamix (Biocytex). La partie inférieure de la zone d'analyse est définie par un seuil qui ne permet d'acquérir que les particules d'au moins 0,5 μm . La partie supérieure est définie par la fin du nuage de billes de 0,9 μm . Les billes de plus grand diamètre (3 μm) sont exclues de cette zone d'analyse car elles correspondent à la zone des plaquettes.

4) Marquage des MP dans les échantillons patients et témoins

Les PFP sont décongelés au bain marie à 37°C puis sont marqués comme indiqué dans le tableau suivant. Chaque catégorie de MP est marquée selon les antigènes caractéristiques de sa lignée grâce à un anticorps couplé à un fluorochrome (tableau 5). Nous avons étudié les coexpressions d'antigènes de lignées différentes à la surface des MP en ajoutant dans le même tube des anticorps dirigés contre ces antigènes. Nous nous sommes limités à l'étude de la coexpression de deux marqueurs afin de limiter l'encombrement à la surface des MP.

Les échantillons sont incubés pendant 30 minutes à l'obscurité et à température ambiante.

Puis, 500 μL de tampon et 30 μL de billes fluorescentes de comptage Flow-Count (Beckman Coulter) sont ajoutés et chaque tube est vortexé plusieurs secondes.

	1 μ L	10 μ L	5 μ L	5 μ L	5 μ L	MP étudiées
Tube 1	Annexine V	CD 144			CD 41	EMP (CD144), MP coexprimant des marqueurs plaquettaires et endothéliaux (CD144)
Tube 2	Annexine V		CD 14	CD11b	CD 41	MoMP (CD14), GMP (CD11b), MP coexprimant des marqueurs plaquettaires et monocytaires ou MP coexprimant des marqueurs plaquettaires et granulocytaires
Tube 3	Annexine V	CD 62P			CD 41	MP P Selectine (CD62P), MP coexprimant des marqueurs plaquettaire et la P Sélectine
Tube 4	Annexine V	CD 142			CD 41	MP FT (CD142), MP coexprimant des marqueurs plaquettaires et le FT
Tube 5	Annexine V	CD 235a (GPA)			CD 41	HeMP (CD235a), MP coexprimant des marqueurs plaquettaires (CD41) et érythrocytaires

Tableau 5 : Liste des différents marqueurs utilisés pour la numération des microparticules.

EMP : microparticules endothéliales

MoMP : microparticules monocytaires

GMP : microparticules granulocytaires

MP P Sélectine : microparticules exprimant la P Sélectine

MP FT : microparticules exprimant le facteur tissulaire

HeMP : microparticules érythrocytaires

5) Décompte des MP sur le cytomètre

Dans la demi-heure suivant le marquage, l'échantillon est analysé sur le cytomètre. L'acquisition est réalisée à vitesse lente (mode LOW) pendant une minute (figure 10 a et b).

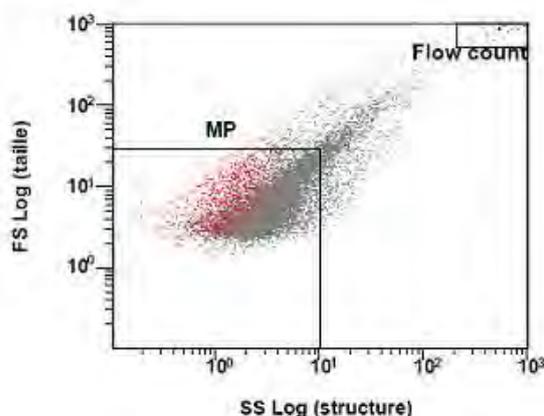


Figure 10 a

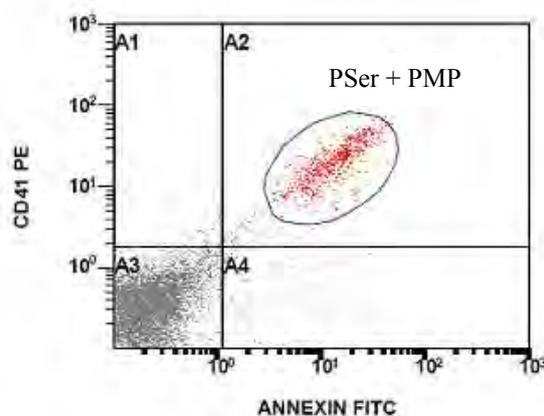


Figure 10 b

Figure 10 a et b : Représentation des microparticules plaquettaires chez un patient (nuage de points rouges). La figure a représente les microparticules totales (d'origine plaquettaire ou non) situées dans la zone d'analyse des MP. Le graphe b montre la sélection des MP plaquettaires (PSer + PMP) obtenues grâce à la coexpression du CD41 et de la PSer, cette dernière étant révélée par la fixation d'Annexine V. Les MP plaquettaires sont alors colorisées en rouge et apparaissent clairement au sein des autres microparticules du graphe a.

L'acquisition est arrêtée au bout d'une minute. La concentration des billes dans le flacon est connue ($C=1003$ billes/mL) et le nombre d'évènements PMP est dénombré par l'appareil. La concentration des PMP est donc déduite par la formule :

$$[MP] = (\text{nombre d'évènements MP} \times 1003) / \text{nombre de billes.}$$

Le principe est le même pour les autres catégories de MP ainsi que pour les MP coexprimant plusieurs antigènes.

6) Analyse statistique

Du fait de la grande dispersion de nos valeurs de PMP, nous avons choisi de travailler avec les valeurs médianes et leurs étendues plutôt qu'avec les valeurs moyennes. Les tests statistiques utilisés sont des tests non paramétriques : Scheffé, Kruskal-Wallis, Spearman, Mann-Whitney, Wilcoxon, courbes ROC. Pour tous ces tests, le seuil de significativité est $p=0,05$.

IV. RESULTATS

A. Description de la population étudiée

L'ensemble des données caractérisant la population étudiée est regroupé ci-dessous (tableau 6). Notre population est composée de 56 patients atteints de PV, 129 patients atteints de TE, 27 patients atteints de MFP, 5 patients présentant une érythrocytose pure, 68 témoins sains, 23 patients présentant une cause secondaire de polyglobulie (PS) et 36 patients présentant une cause secondaire de thrombocytose (TS).

Dans notre groupe de 56 PV, 7 patients ne sont pas traités à ce jour par myélofreinateur et 30 patients ont été inclus sous traitement myélofreinateur. Enfin, 19 patients n'étaient pas traités par myélofreinateur lors de leur inclusion et ont bénéficié d'un suivi de un à deux ans au cours duquel un traitement myélofreinateur a été instauré et une numération des MP a été réalisée tous les 6 mois.

Dans notre groupe de 129 TE, 36 patients ne sont pas traités par myélofreinateur à ce jour et 48 patients ont été inclus sous traitement myélofreinateur. Enfin, 45 patients n'étaient pas traités par myélofreinateur lors de leur inclusion et ont bénéficié d'un suivi de un à deux ans au cours duquel un traitement myélofreinateur a été initié chez 37 d'entre eux et une numération des MP a été réalisée tous les 6 mois.

Dans notre groupe de 27 MFP, 14 patients ne sont pas traités à ce jour par myélofreinateur, 12 patients ont été inclus sous traitement myélofreinateur. Enfin, 1 patient n'était pas traité par myélofreinateur lors de son inclusion et il a bénéficié d'un suivi de 2 ans au cours duquel un traitement myélofreinateur a été instauré et une numération des MP a été réalisée tous les six mois.

Au total, 88% des patients atteints de PV ont été mis sous traitement myélofreinateur, majoritairement sous hydroxyurée (55%) et pipobroman (30%). 66% des patients atteints de TE ont un traitement myélofreinateur. L'hydroxyurée est le traitement le plus utilisé dans ce groupe de patients (55% des TE). Enfin environ la moitié (49%) des patients présentant une MFP sont traités soit par hydroxyurée (30%) soit par pipobroman (19%). Trois patients ont une bithérapie myélofreinatrice.

Nos groupes de patients atteints de SMP Ph1- sont appariés en âge ($p > 0,05$; test de Scheffé) par contre nos groupes de témoins et de PS sont significativement plus jeunes que les autres groupes de patients ($p < 0,05$; test de Scheffé).

Pour chaque patient, les données suivantes de l'hémogramme ont été recueillies avant la mise sous traitement myélofreinateur : leucocytes, plaquettes, hémoglobine, hématocrite.

29% des patients atteints de PV et 25% des patients atteints de TE ont un antécédent thrombotique contre 22% chez les patients atteints de MFP.

La mutation JAK2V617F est présente chez 96% des patients atteints de PV, 63% des patients atteints de TE et 59% des patients atteints de MFP. La mutation de MPL a été retrouvée chez un patient atteint de TE. La mutation de l'exon 12 de JAK2 n'a été retrouvée chez aucun patient atteint de PV.

Il nous semblait intéressant d'étudier le groupe de patients atteints d'érythrocytose pure mais nous avons dû exclure ce groupe de l'analyse statistique en raison d'un nombre trop faible de patient

	PV	TE	MFP	Témoins	PS	TS
Sujet (n)	56	129	27	68	23	36
âge médian (étendues)	69 (35-95)	63 (18-90)	64 (38-85)	50 (28-94)	49 (17-83)	60 (19-92)
homme	25	40	14	29	21	12
femme	31	89	13	39	2	24
sex ratio homme/femme	0,8	0,5	1	0,7	10	0,5
Bilan biologique au diagnostic avant traitement myélofreinateur						
Leucocytose (10 ⁹ /L) médiane	9,8	8,5	8,9	7,3	7	12,6
Hémoglobine (g/dL) médiane	17,3	14,1	12,2	14,5	18	11,3
Hématocrite (%) médiane	51	42	37	42	51	35
Plaquette (10 ⁹ /L) médiane	468	651	227	232	193	592
Facteurs de risque cardiovasculaires et antécédents de thrombose						
Hypertension artérielle	29	43	10	/	/	/
Diabète	6	6	1	/	/	/
Dyslipidémie	19	37	3	/	/	/
Tabac	10	17	5	/	/	/
Antécédents de thrombose (%)	16 (29)	32 (25)	6 (22)	0	0	0
Traitement						
Non traités à ce jour par myélofreinateur (%)	7 (13)	44 (34)	14 (51)	/	/	/
Hydroxyurée Hydréa® (%)	31 (55)	71 (55)	8 (30)	/	/	/
Pipobroman Vercyte® (%)	17 (30)	5 (4)	5 (19)	/	/	/
Anagrélide Xagrid® (%)	2 (3)	9 (7)	0	/	/	/
Interféron (%)	0	2 (2)	0	/	/	/
Aspirine (%)	35 (63)	84 (65)	2 (7)	/	/	/
Mutation						
Pas de mutation retrouvée	2 (4)	46 (35)	10 (37)	/	/	/
JAK2V617F (%)	54 (96)	81 (63)	16 (59)	/	/	/
JAK2 exon 12 (%)	0	0	0	/	/	/
MPL (%)	0	1 (1)	0	/	/	/
Pas d'information	0	1 (1)	1 (4)			

Tableau 6: Caractéristiques des populations étudiées.

Dans notre population de patients présentant une polyglobulie secondaire (PS), la polyglobulie est principalement consécutive à une hypoxie sanguine. Les causes d'hypoxie retrouvées sont une insuffisance respiratoire chronique, un syndrome d'apnée du sommeil et un tabagisme important.

Nous avons recensé dans le tableau ci-dessous (tableau 7) les étiologies des thrombocytoses retrouvées chez nos patients présentant une cause secondaire de thrombocytose.

cause de thrombocytose / n	36
infection / inflammation (%)	20 (56)
thrombocytose d'entraînement (%)	10 (27)
carence martiale (%)	1 (3)
Thrombocytose sans étiologie, « pure » (%)	5 (14)

Tableau 7 : Etiologies des thrombocytoses retrouvées chez nos patients présentant une cause secondaire de thrombocytose.

Les épisodes infectieux et inflammatoires représentent plus de la moitié (56%) des causes de thrombocytoses réactionnelles observées dans notre population. Les thrombocytoses d'entraînement désignent les thrombocytoses observées au cours d'actes chirurgicaux importants ou lors de grands traumatismes. Elles sont la cause de thrombocytose chez 27% de nos patients. Enfin, chez un seul de nos patients, la thrombocytose observée était secondaire à une carence martiale.

Nous avons employé le terme de thrombocytose « pure » par analogie au terme d'érythrocytose pure chez 5 de nos patients présentant une thrombocytose persistante (>450G/L) sans cause réactionnelle retrouvée mais qui ne remplissent pas les critères de TE.

B. Relation entre l'âge et les PMP

Nos groupes de témoin et de PS n'étant pas appariés en âge avec nos autres catégories de patients, nous avons d'abord étudié un éventuel impact de l'âge sur la concentration des PMP afin d'étudier si le paramètre âge risquait d'influencer nos résultats de PMP.

En utilisant le coefficient de corrélation de Spearman, nous n'avons retrouvé aucune corrélation entre l'âge et la concentration médiane en PMP/ μ L dans l'ensemble des groupes de patients et de témoins que nous avons inclus dans notre étude : $r=0,016$.

C. Relation entre le chiffre de plaquettes et la numération des PMP

Nos populations de patients atteints de TE et de TS ont une numération plaquettaire significativement plus élevée que les autres catégories de patients ($p < 0,005$; test de Kruskal-Wallis). Afin de prouver que la concentration des PMP est un marqueur indépendant de la numération plaquettaire, nous avons étudié la corrélation entre le chiffre de plaquettes et la numération des PMP chez les patients non traités par myélofreinateur.

En utilisant le coefficient de corrélation de Spearman, nous n'avons pas retrouvé de corrélation entre la numération des PMP et le chiffre de plaquettes chez les patients atteints de PV, de TE, de MFP, de PS et chez nos témoins.

Il existe cependant une corrélation entre la numération plaquettaire et celle des PMP chez les patients atteints de TS ($r=0,4$; $p < 0,05$).

D. Intérêt de la numération des PMP dans le diagnostic des SMP Ph1-

1) Comparaison de toutes les populations de patients et de témoins entre elles

Pour étudier l'intérêt de la numération des PMP comme nouvel élément d'aide au diagnostic des SMP Ph1-, nous avons comparé la concentration médiane des PMP et la médiane du pourcentage des PMP par rapport aux MP totales dans les populations suivantes : chez les patients atteints de SMP Ph1-, chez les patients présentant des causes secondaires de polyglobulie (PS) et de thrombocytose (TS) et chez les témoins. Afin de s'affranchir d'un éventuel effet du traitement myélofreinateur sur la numération des PMP, nous avons exclu, pour cette partie de l'étude, les patients sous traitement myélofreinateur.

Le tableau 8 est un tableau récapitulatif de la répartition des PMP dans chacune de nos catégories de patients. La figure 11 est une représentation en boîte à moustache de la distribution des valeurs de PMP/ μL chez les patients atteints de PV, TE et MFP par rapport aux témoins et aux patients atteints de causes secondaires de polyglobulie et de thrombocytose.

	PV	PS	TE	TS	MFP	Témoins
n	26	23	81	36	15	68
Concentration médiane de PMP/ μ L (extrêmes)	2899 (471-14913)	504 (41-2160)	3805 (219-84761)	644 (150-5079)	2361 (101-45163)	646 (91-2676)
Médiane du pourcentage des PMP par rapport aux MP totales	80 (34-99)	63 (7-95)	91 (36-106)	79 (19-98)	73 (42-96)	76 (30-99)

Tableau 8 : Répartition des PMP dans nos différents groupes de patients

La concentration médiane des PMP est significativement plus élevée dans chacun des groupes de patients atteints de SMP que dans les groupes de patients présentant des causes secondaires de polyglobulie et de thrombocytose et que dans le groupe de témoins ($p < 0,05$; test de Kruskal-Wallis).

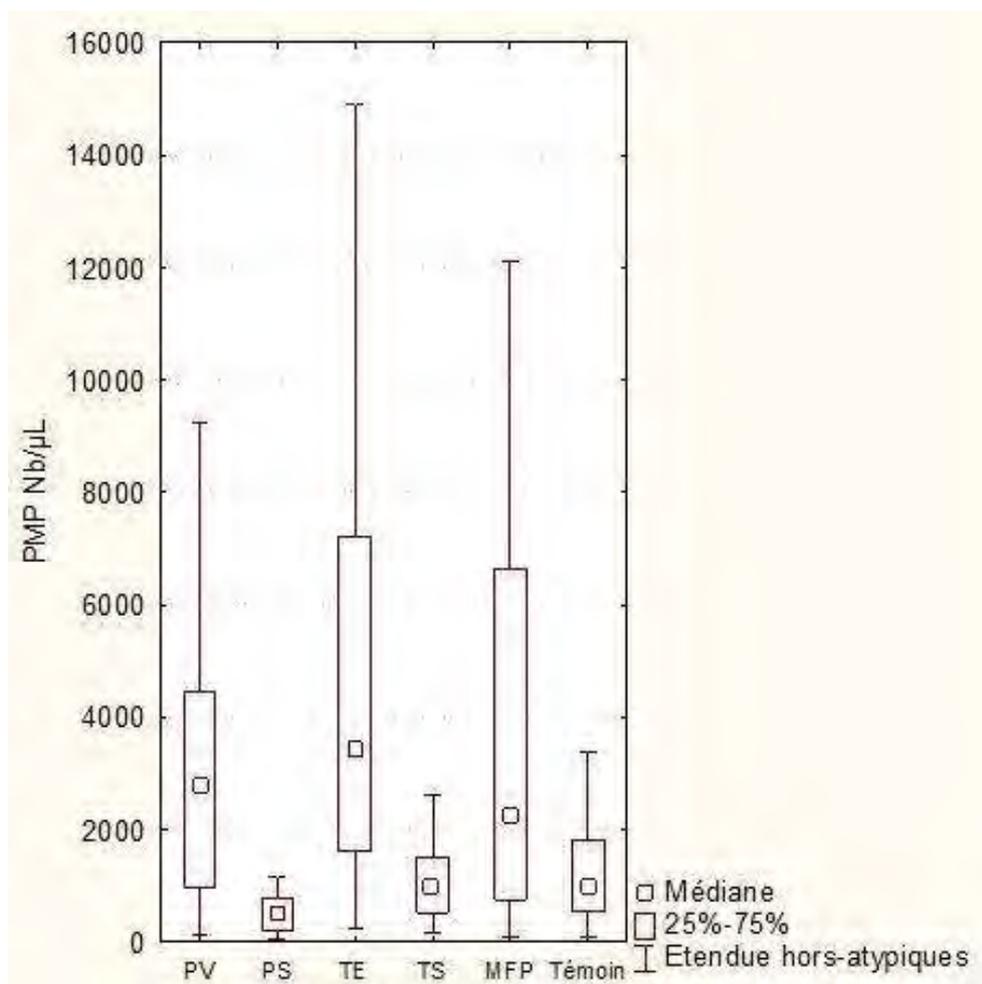


Figure 11 : Distribution des valeurs de PMP (en nombre/ μ L chez les patients atteints de PV, TE et MFP par rapport aux témoins et aux patients atteints de causes secondaires de polyglobulie et de thrombocytose.

Afin de d'étudier l'intérêt de la numération des PMP dans le diagnostic différentiel entre les SMP et les causes secondaires de polyglobulie et de thrombocytose, nous avons ensuite utilisé le test de Kruskal-Wallis pour comparer les valeurs médianes des concentrations de PMP entre les patients atteints de SMP et les témoins, entre les PV et les PS et entre les TE et les TS.

2) SMP et témoins sains

Les valeurs médianes des concentrations de PMP sont significativement plus élevées dans chacun des groupes de patients atteints de SMP : TE (3805 PMP/ μ L), PV (2899 PMP/ μ L), MFP (2361 PMP/ μ L) que chez les témoins sains (646 PMP/ μ L) : ($p < 10^{-7}$), ($p < 10^{-6}$), ($p = 0,01$) respectivement (tableau 8, figure 11).

Il n'a pas été mis en évidence de différence significative au niveau du pourcentage médian de PMP par rapport aux MP totales entre les patients atteints de SMP et les témoins ($p = 1$)

3) PV et polyglobulie secondaire

Les valeurs médianes des concentrations de PMP sont significativement plus élevées chez les patients atteints de PV (2899 PMP/ μ L) que chez les patients présentant une cause secondaire de polyglobulie (504 PMP/ μ L) ($p < 10^{-7}$) (tableau 8, figure 11). En revanche, il n'y a pas de différence significative au niveau du pourcentage des PMP par rapport aux MP totales entre ces deux catégories de patients ($p = 0,1$).

Grâce à la méthode ROC (Receiver Operating Characteristic), nous avons pu établir un seuil de concentration en PMP permettant de discriminer les patients atteints de PV des patients atteints de PS (figure 12). Au seuil de 694 PMP/ μ L, il est possible de distinguer les PV des PS avec une sensibilité de 93,8% et une spécificité de 75%.

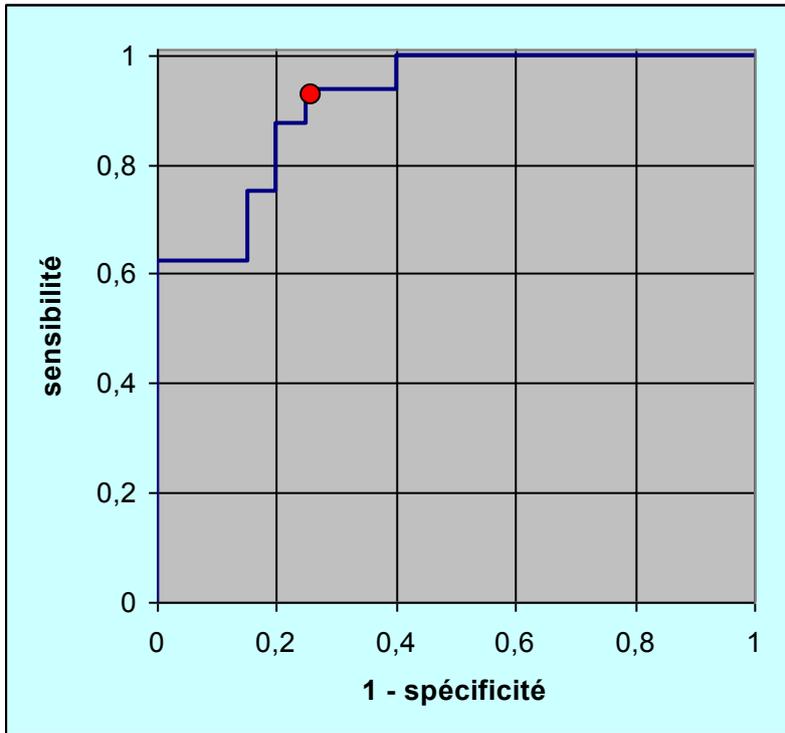


Figure 12 : Courbe ROC des valeurs des PMP des groupes PV et PS. Au seuil de 694 PMP/ μ L, la sensibilité est de 93.8% et la spécificité est de 75%.

La figure 13 ci-dessous illustre la répartition des valeurs de la numération des PMP chez nos patients atteints de PV et de PS par rapport au seuil établi par la méthode ROC.

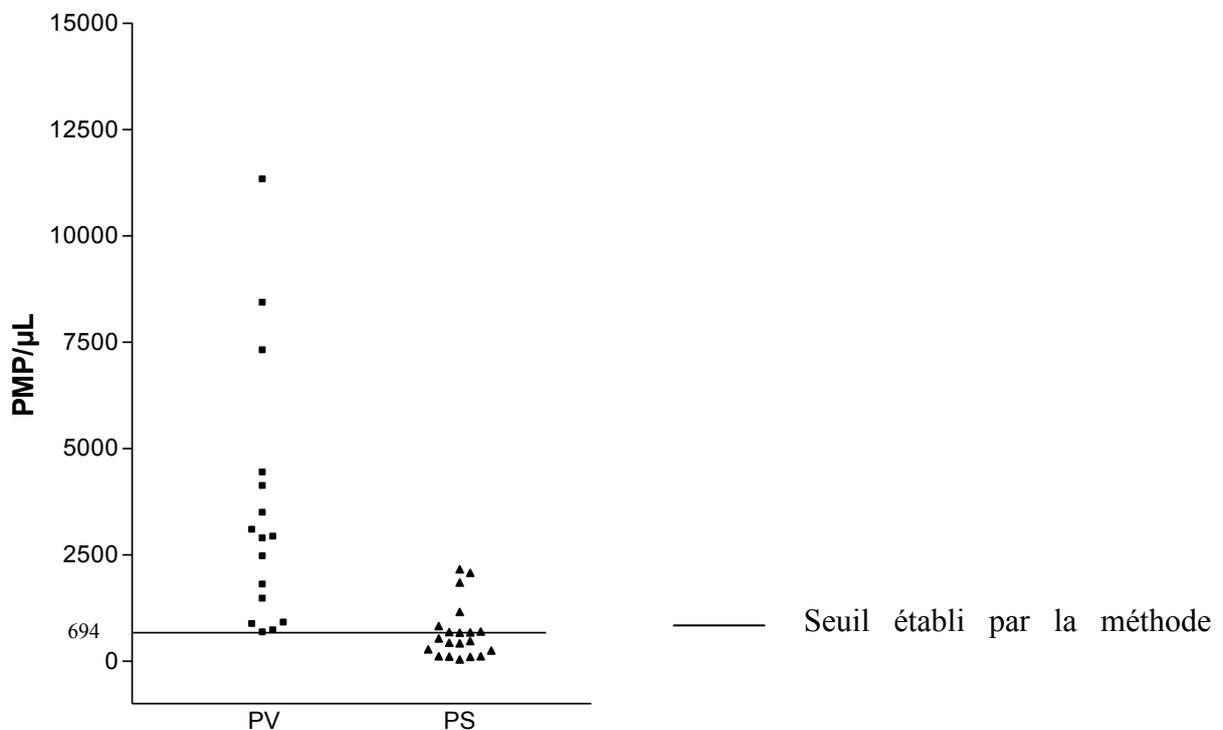


Figure 13 : Distribution du nombre de PMP chez les patients atteints de PV et de PS en fonction du seuil établi par la méthode ROC.

4) TE et thrombocytose secondaire

Les valeurs médianes des PMP sont significativement plus élevées chez les patients atteints de TE (3805 PMP/ μ L) que chez les patients présentant une cause secondaire de thrombocytose (644 PMP/ μ L) ($p < 10^{-7}$) (tableau 8, figure 11). Il en est de même au niveau du pourcentage de PMP par rapport aux MP totales (91% pour les TE et 79% pour les TS) ($p=0,006$).

De même que pour les PV, nous avons établi grâce à la méthode ROC un seuil de 899 PMP/ μ L permettant de discriminer les TE des TS avec une sensibilité de 93,8% et une spécificité de 65% (figure 14).

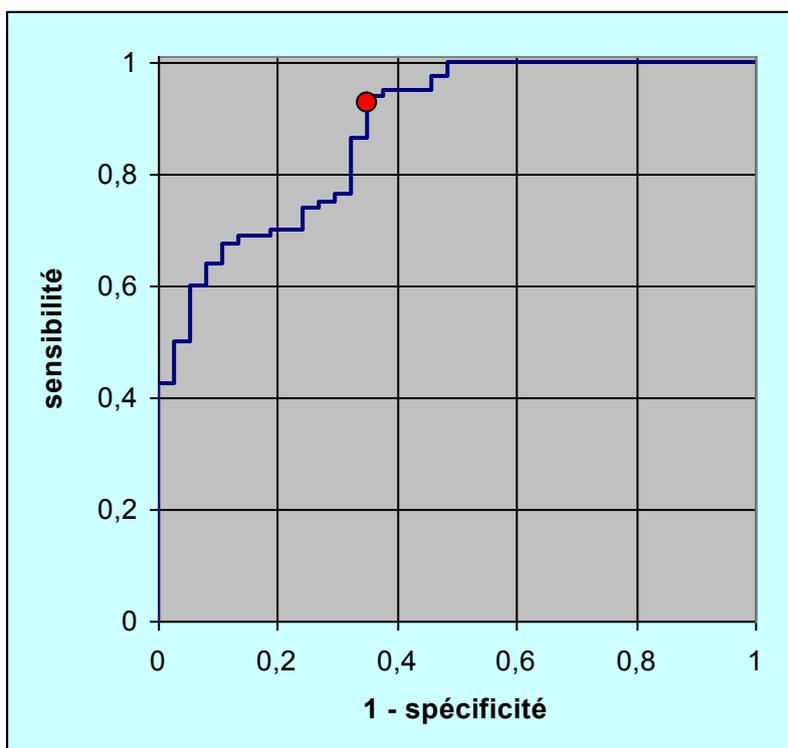


Figure 14 : Courbe ROC des valeurs des PMP des groupes TE et TS. Au seuil de 899 PMP/ μ L, la sensibilité est de 93,8% et la spécificité est de 65%.

La figure 15 illustre la distribution des valeurs de la numération des PMP chez les patients atteints de TE et de TS en fonction du seuil établi par la méthode ROC.

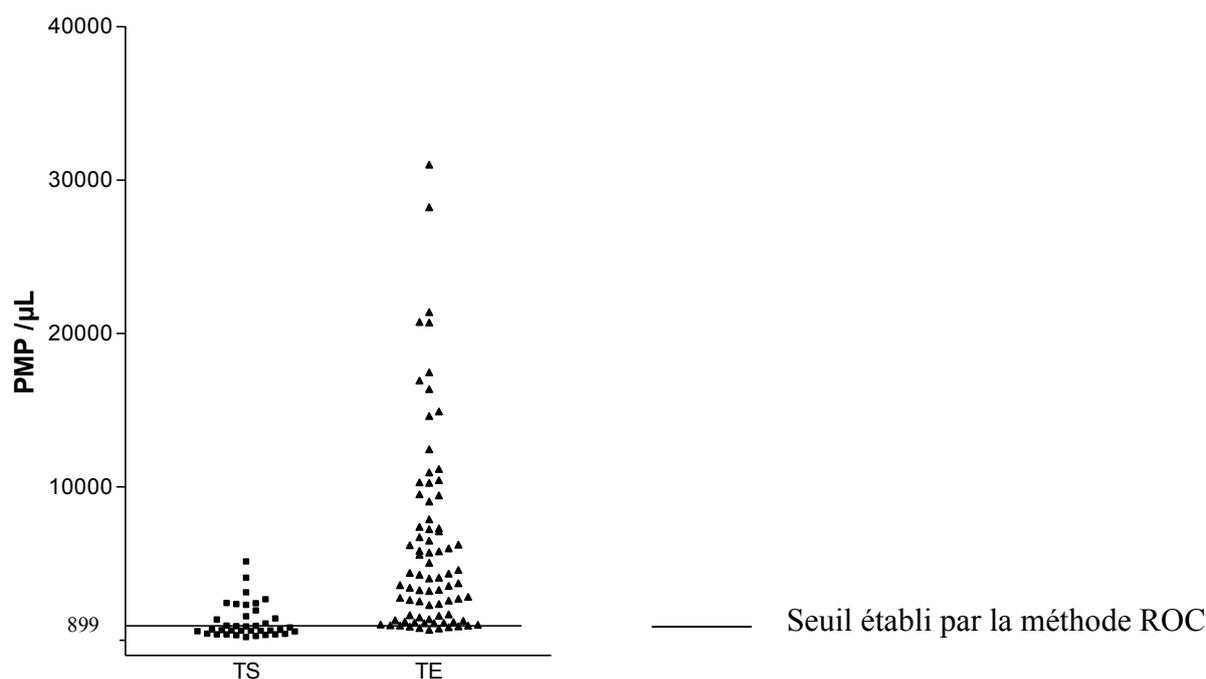


Figure 15 : Distribution du nombre de PMP dans la TE et dans la TS en fonction du seuil établi par la méthode ROC.

E. Effet des traitements myélofreinateurs sur la concentration des PMP chez les patients atteints de PV et de TE

Au sein de notre population de patients atteints de SMP, nous avons pu étudier un sous groupe de patients inclus dans notre étude au diagnostic, avant tout traitement myélofreinateur, et pour lesquels une numération des PMP a été effectuée tous les 6 mois. Au cours de leur suivi, un traitement myélofreinateur a été instauré chez tous les patients atteints de PV (19) et chez 37 patients atteints de TE. Notre population de MFP n'a pas pu être étudiée car un seul patient a bénéficié d'une numération des PMP tous les 6 mois.

Ce sous groupe nous a permis d'étudier l'effet des traitements myélofreinateurs sur la concentration des PMP

1) PV

La concentration médiane des PMP a été comparée avant et 6 mois après mise sous traitement myélofreinateur chez les mêmes patients atteints de PV (tableau 9).

	PV avant traitement	PV 6 mois après traitement
n	19	19
Concentration médiane des PMP/ μ L	2691	755

Tableau 9 : Influence du traitement myélofreinateur sur la numération des PMP dans la PV. Le test de Wilcoxon montre qu'il existe une diminution significative de la concentration des PMP 6 mois après la mise sous traitement myélofreinateur ($p < 0,05$).

Nous avons ensuite étudié l'évolution de la concentration des PMP au cours du temps dans notre population de patients atteints de PV et ayant bénéficié d'une numération des PMP tous les 6 mois pendant un à 2 ans (figure 16). Nous avons choisi de représenter les patients étant arrivés au terme de deux ans de suivi de la numération des microparticules soit 5 patients sur les 19 atteints de PV. Un traitement myélofreinateur a été introduit chez tous les patients après la première numération des PMP.

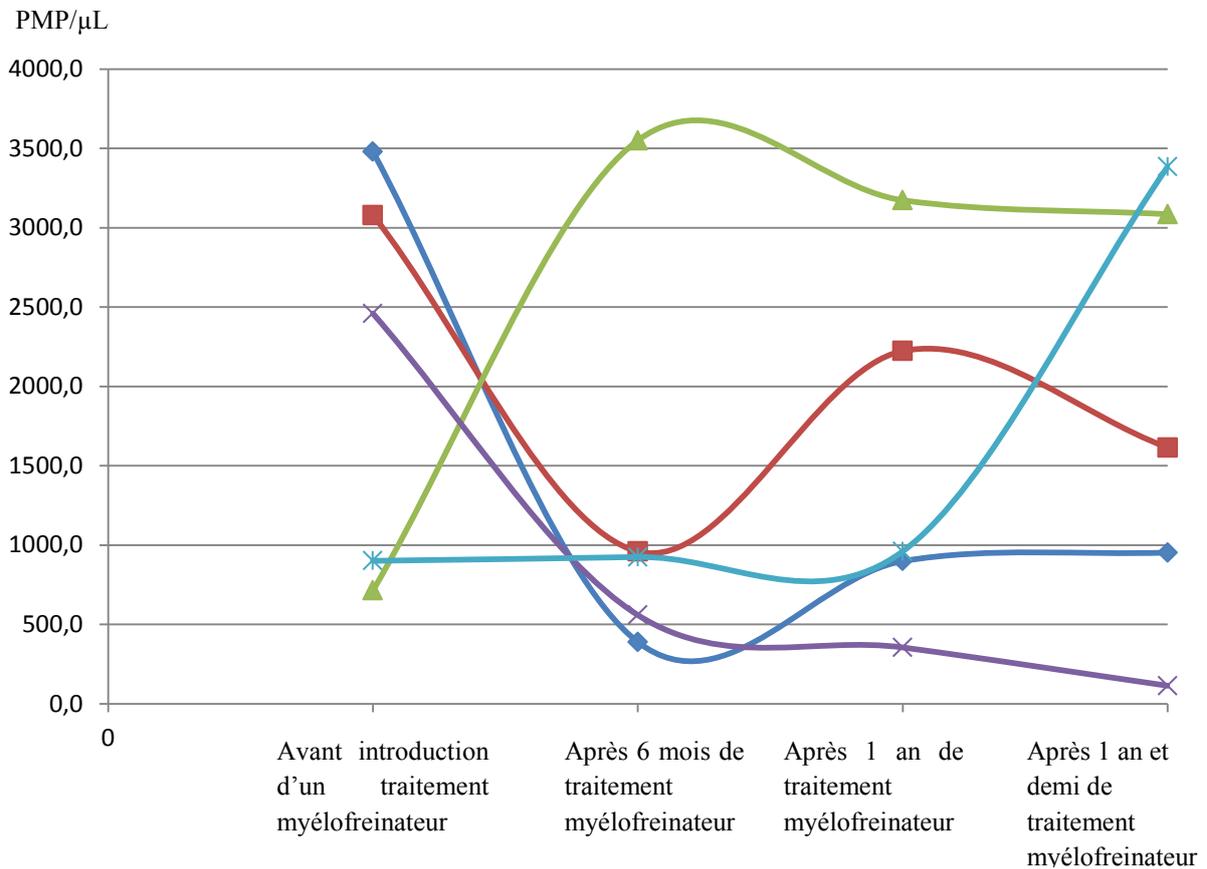


Figure 16 : Evolution de la numération des PMP chez les patients atteints de PV au cours du temps après mise sous traitement myélofreinateur.

On observe, chez 4 patients sur les 5 représentés, une diminution de la concentration des PMP au bout de 6 mois de traitement myélofreinateur puis on constate une ascension de la numération des PMP après un an de traitement. Pour 3 des 5 patients, le nombre de PMP à 18 mois est plus bas qu'au départ. Au regard de la courbe verte, on peut se demander s'il n'y a pas eu un problème analytique lors de la numération des PMP avant introduction d'un traitement myélofreinateur.

2) TE

De même, la concentration médiane des PMP a été comparée avant et 6 mois après introduction d'un traitement myélofreinateur chez les mêmes patients atteints de TE (tableau 10).

	TE avant traitement	TE 6 mois après traitement
n	37	37
Concentration médiane des PMP/ μ L	3586	2482

Tableau 10 : Influence du traitement myélofreinateur sur la numération des PMP dans la TE.

La concentration des PMP diminue significativement 6 mois après l'introduction d'un traitement myélofreinateur ($p=0,01$; test de Wilcoxon).

Puis, nous avons étudié l'évolution de la concentration des PMP au cours du temps chez nos patients atteints de TE ayant bénéficié d'une numération des PMP tous les 6 mois pendant 2 ans (figure 17).

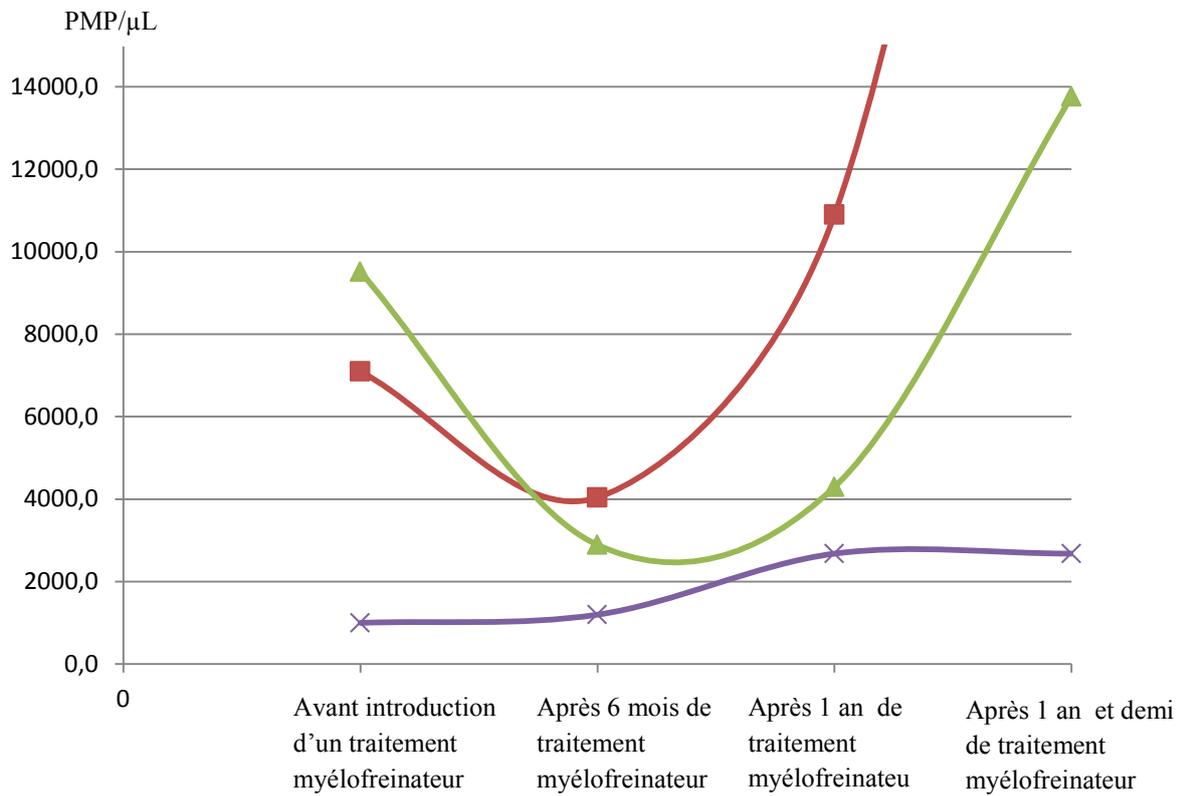


Figure 17 : Evolution de la concentration des PMP chez les patients atteints de TE au cours du temps.

De même que pour les patients atteints de PV, on constate une diminution de la concentration des PMP après introduction d'un traitement myélofreinateur puis une augmentation après un an de traitement.

F. Réponse hématologique et PMP

Les patients atteints de SMP Ph1- sont considérés en réponse hématologique lorsque les 3 critères suivants sont remplis :

- GB < $10 \times 10^9/L$
- Plaquettes < 400 G/L
- Hématocrite < 46%

Dans notre population de patients traités par myélofreinateur depuis plus de 1 an, nous avons ainsi étudié la numération des PMP chez les patients selon la présence ou l'absence de réponse hématologique (tableau 14).

	Absence de réponse hématologique	Présence d'une réponse hématologique
n	14	19
concentration médiane des PMP (nombre par μL)	2548	2223

Tableau 14 : Influence de la réponse hématologique sur la concentration des PMP.

Aucune différence significative au niveau de la concentration des PMP n'a été retrouvée chez nos deux catégories de patients ($p=0,85$; test de Kruskal-Wallis).

G. Facteurs de risque cardiovasculaire et PMP

Comme la littérature décrit une augmentation de la concentration des PMP chez les patients diabétiques, nous avons cherché un lien entre les facteurs de risque cardiovasculaire (diabète, hypertension artérielle, hypercholestérolémie, tabac) et les PMP chez nos patients atteints de SMP, non traités par myélofreinateur. Il n'a pas toujours été facile de recueillir des informations sur la présence de facteurs de risque cardiovasculaire dans les dossiers des patients. Afin d'avoir des effectifs significatifs, nous avons choisi pour l'analyse statistique de regrouper tous les patients atteints de SMP Ph1-, non traités par myélofreinateur, sans faire de distinction PV, TE et MFP et de les classer en deux catégories : 0 facteur de risque cardiovasculaire (0 FR), 1 ou plusieurs facteurs de risque cardiovasculaire ($\geq 1FR$) (tableau 11).

	O FR	≥ 1FR
n	20	60
Concentration médiane des PMP/ μ L	3423	3279

Tableau 11 : Concentration des PMP chez les patients atteints de SMP Ph1- non traités par myélofreinateur en fonction du nombre de facteur de risque cardiovasculaire.

Il n'existe pas de différence significative entre la concentration des PMP chez les patients n'ayant pas de facteur de risque cardiovasculaire et ceux ayant au moins un facteur de risque cardiovasculaire ($p=0,62$; test de Test de Mann-Whitney).

H. Risque thrombotique et PMP

Tefferi a proposé une stratification du risque thrombotique en fonction de l'âge, de la présence d'antécédents thrombotiques, de la numération plaquettaire et de la présence de facteurs de risque cardiovasculaire (85) (tableau 12).

risque bas	âge < 60 ans et absence d'antécédent de thrombose
risque intermédiaire	<ul style="list-style-type: none"> • âge < 60 ans et absence d'antécédent thrombotique • Plaquettes > 1500 G/L ou présence de facteurs de risque cardiovasculaire (Hypertension artérielle, dyslipidémie, diabète, tabac)
risque élevé	âge > 60 ans ou antécédent de thrombose

Tableau 12 : Stratification du risque thrombotique dans les SMP Ph1- selon Tefferi (85).

Nous avons classé nos patients atteints de SMP Ph1-, non traités par myélofreinateur selon la classification de Tefferi et nous avons comparé les médianes des concentrations de PMP (tableau 13). Afin d'avoir un effectif suffisant pour chaque niveau de risque, nous avons regroupé l'ensemble des patients atteints de SMP Ph1- sans faire de distinction PV, TE et MFP.

	risque bas	risque intermédiaire	risque élevé
n	12	12	54
Concentration médiane des PMP/ μ L	3068	5187	3270

Tableau 13 : Répartition des valeurs de la numération des PMP en fonction de la stratification du risque thrombotique.

Nous n'avons pas retrouvé d'augmentation significative de la concentration des PMP lorsque le risque thrombotique augmente ($p=0,53$; test de test de Kruskal-Wallis).

I. Relation entre l'existence d'un antécédent de thrombose et la concentration en PMP

Dans la littérature, les thromboses étant une cause connue d'augmentation des PMP, nous avons recherché une corrélation entre les antécédents thrombotiques et la numération des PMP chez les patients atteints de SMP Ph1- non traités par myélofreinateur. Nous n'avons pas de notion de l'ancienneté de l'accident thrombotique chez nos patients. Pendant la durée de notre étude, aucune numération des PMP n'a été effectuée au décours d'une thrombose parce que le cas ne s'est pas présenté.

La corrélation entre les antécédents thrombotiques et la numération des PMP n'a pas pu être étudiée ni dans la PV ni dans la MFP en raison d'un nombre trop faible de patients non traités par myélofreinateur et ayant un antécédent thrombotique ($n=4$ dans la PV et $n=1$ dans la MFP).

Le tableau 15 ci dessous récapitule la médiane de la concentration des PMP selon la présence ou l'absence d'antécédent thrombotique dans notre population de patients atteints de TE, non traités par myélofreinateur.

	Patients atteints de TE avec antécédent de thrombose	Patients atteints de TE sans antécédent de thrombose
n	22	59
Concentration médiane des PMP (nombre/ μ L)	3538	4498

Tableau 15 : Influence de la présence d'un antécédent thrombotique sur la numération des PMP dans la TE.

La figure 19 est une représentation en boîte à moustache de l'influence de la présence d'un antécédent thrombotique sur la numération des PMP chez nos patients atteints de TE.

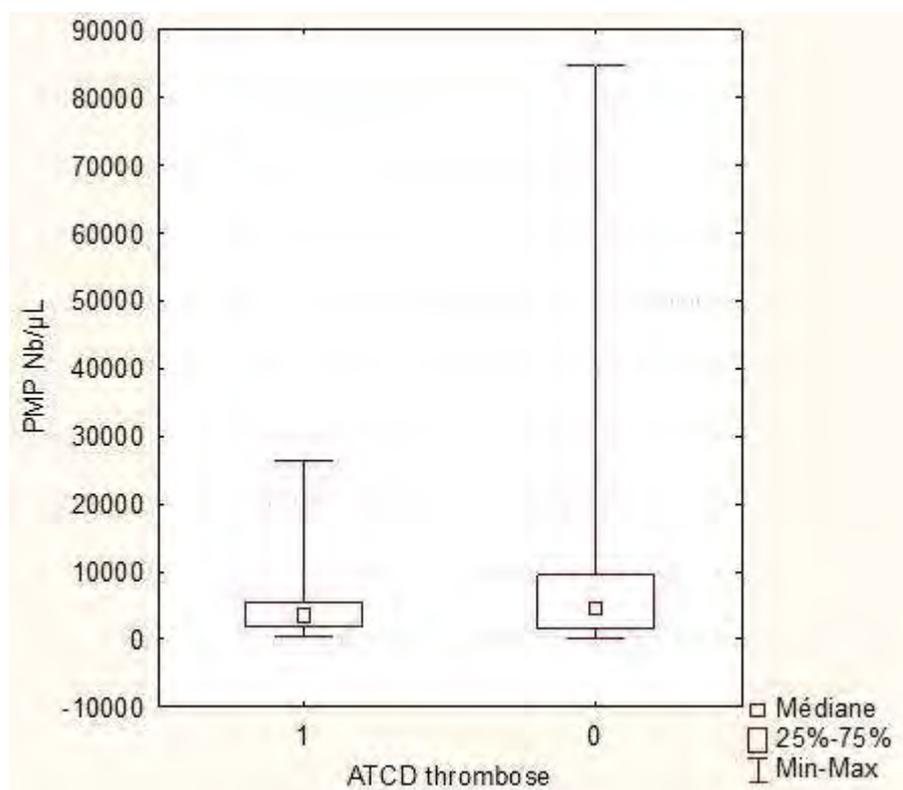


Figure 19: Influence du facteur de risque antécédent de thrombose sur les valeurs des PMP chez les patients atteints de TE.

1 : Antécédent de thrombose

0 : Pas d'antécédent de thrombose

Aucune différence significative n'a été retrouvée chez les patients atteints de TE entre ceux ayant un antécédent thrombotique et ceux n'ayant pas d'antécédent thrombotique ($p = 0,2$; Test de Mann-Whitney).

J. Relation entre la présence de la mutation JAK2V617F et la concentration en PMP

La présence de la mutation JAK2V617F étant probablement corrélée à l'augmentation du risque thrombotique dans la TE, il nous a semblé intéressant de rechercher une éventuelle relation entre la présence de la mutation JAK2V617F et la concentration des PMP dans nos populations de patients atteints de SMP Ph1-, non traités par myélofreinateur.

1) PV

En raison du très faible effectif de PV non mutées JAK2V617F (seuls deux patients ne possèdent pas la mutation), la corrélation entre la présence de la mutation JAK2V617F et la concentration en PMP n'a pas pu être étudiée pour les PV.

2) TE

Les concentrations médianes des PMP dans nos populations de TE JAK2+ et de TE JAK2- non traitées par myélofreinateur sont regroupées dans le tableau 16 ci-dessous.

	TE JAK2-	TE JAK2+
n	29	50
Concentration médiane des PMP (nombre/ μ L)	3829	4358

Tableau 16 : Influence de la mutation JAK2V617F sur la numération des PMP dans la TE.

Les TE JAK2+ ont une médiane de PMP significativement plus élevée que les TE JAK2- ($p < 10^{-5}$; Test de Mann-Whitney).

La figure 20 ci-dessous est une représentation en boîte à moustache de l'influence de la distribution des PMP chez les patients atteints de TE selon le statut mutationnel de JAK2.

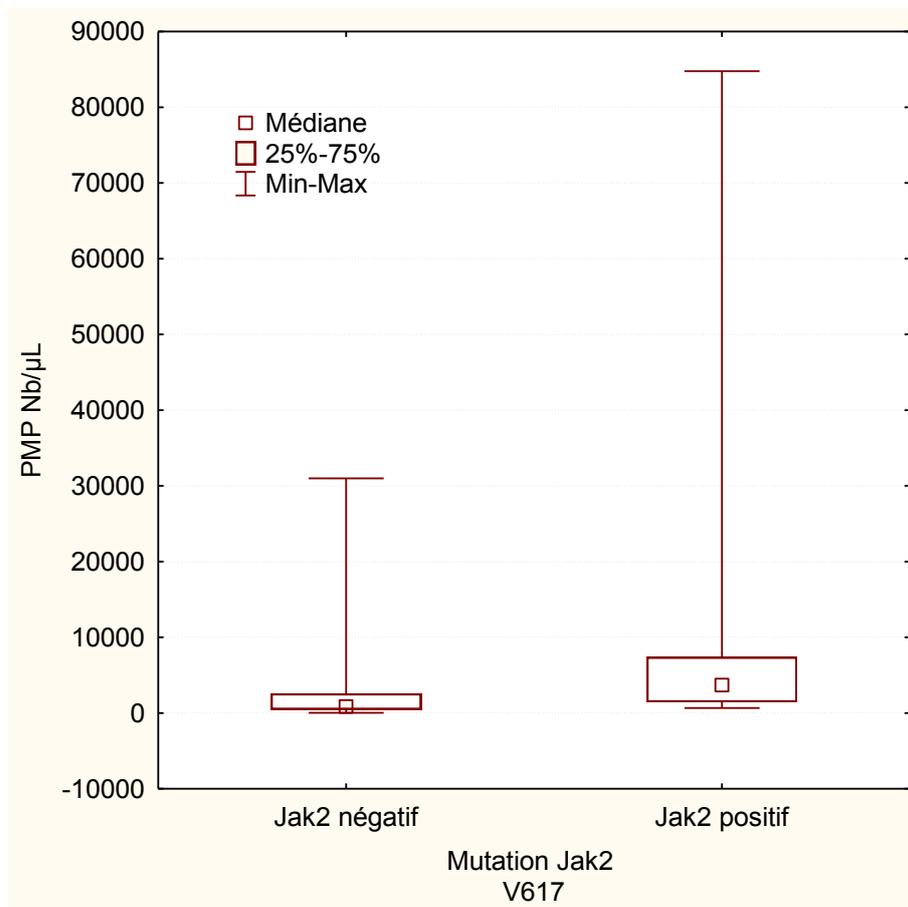


Figure 20 : Influence de la mutation JAK2V617F dans la distribution des PMP chez les patients atteints de TE.

3) MFP

En raison d'un trop faible nombre de patients atteints de MFP, non traités par myélofreinateur et JAK2V617F négatifs, nous n'avons pas pu étudier l'influence de la mutation JAK2V617F sur la numération des PMP dans la MFP.

K. Utilité de la numération des autres microparticules

Il nous a semblé intéressant d'étudier la numération des MP autres que les PMP aussi bien chez nos patients atteints de SMP Ph1- non traités par myélofreinateur que chez nos patients présentant des causes secondaires de polyglobulie et de thrombocytose et chez nos témoins afin d'essayer de définir un profil immunophénotypique des MP chez les patients atteints de SMP Ph1-. Cette numération n'a pas été effectuée chez la totalité des patients.

Les tableaux 17 et 18 ci-dessous montrent la répartition des MP autres que les PMP dans nos différentes catégories de patients.

	Médiane EMP en nombre par μ L (extrêmes)	Médiane MoMP en nombre par μ L (extrêmes)	Médiane GMP en nombre par μ L (extrêmes)	Médiane HeMP en nombre par μ L (extrêmes)	Médiane MP P-selectine en nombre par μ L (extrêmes)	Médiane MP FT en nombre par μ L (extrêmes)	Médiane MFI de l'annexine V par nombre total de MP (extrêmes)
TE (n=44)	108 (0-628)	63 (2-222)	47 (6-10272)	213 (38-1443)	385 (0-35265)	122 (24-3885)	7,4 (1,2-47,8)
TS (n=17)	32 (0-734)	32 (6-399)	21 (6-147)	135 (39-1201)	156 (25-2761)	77 (5-1628)	15,2 (5-47)
PV (n=16)	123 (4-1685)	51 (7-184)	66 (2-1687)	183 (10-1499)	754 (14-3027)	155 (13,6-1702)	8,9 (1,2-53,7)
PS (n=19)	57 (0-170)	21 (0-140)	22 (2-181)	239 (19-3765)	153 (26-933)	97 (17-271)	8,8 (3,4-46,2)
MFP (n=4)	73 (58-156)	38 (32-48)	67 (9-695)	178 (86-797)	94 (15-266)	84 (10-163)	10,5 (2,8-27,5)
témoins (n=11)	69 (50-229)	54 (19-655)	49 (8-1509)	159 (38-395)	153 (0-809)	134 (77-498)	9 (3-41)

Tableau 17 : Répartition des autres MP, en concentration, dans nos différentes catégories de patients.

	Médiane des EMP en % par rapport aux MP totales (extrêmes)	Médiane des MoMP en % par rapport aux MP totales (extrêmes)	Médiane des GMP en % par rapport aux MP totales (extrêmes)	Médiane des HeMP en % par rapport aux MP totales (extrêmes)	Médiane des MP Pselectine en % par rapport aux MP totales (extrêmes)	Médiane des MP FT en % par rapport aux MP totales (extrêmes)	Médiane des MFI de l'annexine V en % par rapport aux MP totales (extrêmes)
TE (n=44)	12 (0-18)	1,2 (0-11)	1,3 (0,1-98,8)	4,5 (0-37)	11,4 (0-38)	2,9 (0,3-30,3)	0,002 (0-0,02)
TS (n=17)	3,7 (0-16)	2,9 (0,4-8,1)	1,2 (0,5-3,6)	16 (5-57)	24 (3,9-61)	5 (0,2-34)	0,016 (0,0017-0,08)
PV (n=16)	3,7 (0-17,5)	1,2 (0,2-4,46)	1,4 (0,1-17,4)	7,6 (0-52)	17,6 (1-43,3)	4,9 (0-29)	0,002 (0,0001-0,02)
PS (n=19)	6,7 (0-12,1)	1,5 (0-15)	1,9 (0,1-19)	29,8 (4-97,5)	13 (1,7-39,7)	7,7 (1-39)	0,01 (0,001-0,067)
MFP (n = 4)	8,1 (7-12)	3,1 (2,6-8,3)	6,1 (1,7-36,8)	19 (2-23)	12 (1-14,8)	6,7 (1-14)	0,006 (0-0,03)
Témoins (n=11)	10,1 (6-18,5)	6,4 (2,8-44,5)	4,8 (0,8-102)	17,5 (6,5-34)	25 (0-55)	17 (11-34)	0,012 (0,002-0,057)

Tableau 18 : Répartition des autres MP, en pourcentage par rapport aux MP totales, dans nos différentes catégories de patients.

EMP : microparticules endothéliales

MoMP : microparticules monocytaires

GMP : microparticules granulocytaires

MP P Sélectine : microparticules exprimant la P Sélectine

MP FT : microparticules exprimant le facteur tissulaire

HeMP : microparticules érythrocytaires

MFI de l'annexine V: Moyenne d'intensité de fluorescence de l'annexine V.

1) Microparticules endothéliales

Les valeurs médianes des EMP en nombre/ μ L sont significativement plus élevées dans la TE (108/ μ L) que dans les thrombocytoses secondaires (32/ μ L) ($p=0,002$; test de Kruskal-Wallis). Aucune différence significative n'a été retrouvée au niveau des pourcentages des EMP par rapport aux MP totales entre les différents groupes.

2) Microparticules érythrocytaires

Aucune différence significative n'a été retrouvée au niveau des valeurs médianes de HeMP en nombre/ μ L entre les différents groupes. Cependant, le pourcentage médian de HeMP par rapport aux MP totales est significativement plus bas dans la PV (7,6%) par rapport aux polyglobulies secondaires (29,8%) ($p=0,0008$) ainsi que dans la TE (4,5%) par rapport aux thrombocytoses secondaires (16%) ($p=0,003$; test de Kruskal-Wallis).

3) Autres MP

Les valeurs médianes des MoMP en nombre/ μ L et en pourcentage par rapport aux MP totales ne diffèrent pas significativement entre nos différents groupes.

Il en est de même pour les GMP, pour les FT MP et pour les MP P-sélectine.

4) Moyenne de l'intensité de fluorescence de l'annexine V

Nous avons étudié la moyenne de l'intensité de fluorescence de l'annexine V dans nos différentes catégories de patients car nous voulions avoir un reflet de la quantité de sites antigéniques de P-Ser à la surface des MP. Il existe une diminution significative, chez les TE par rapport aux TS, de la moyenne de l'intensité de fluorescence de l'annexine V par rapport au nombre total de MP et du pourcentage par rapport aux MP totales ($p < 10^{-6}$; test de Kruskal-Wallis).

Nous avons ensuite représenté sous forme de diagramme la répartition du pourcentage de PMP, HeMP et EMP (qui sont les MP les plus nombreuses) dans nos différents groupes de patients (figure 21 et 22).

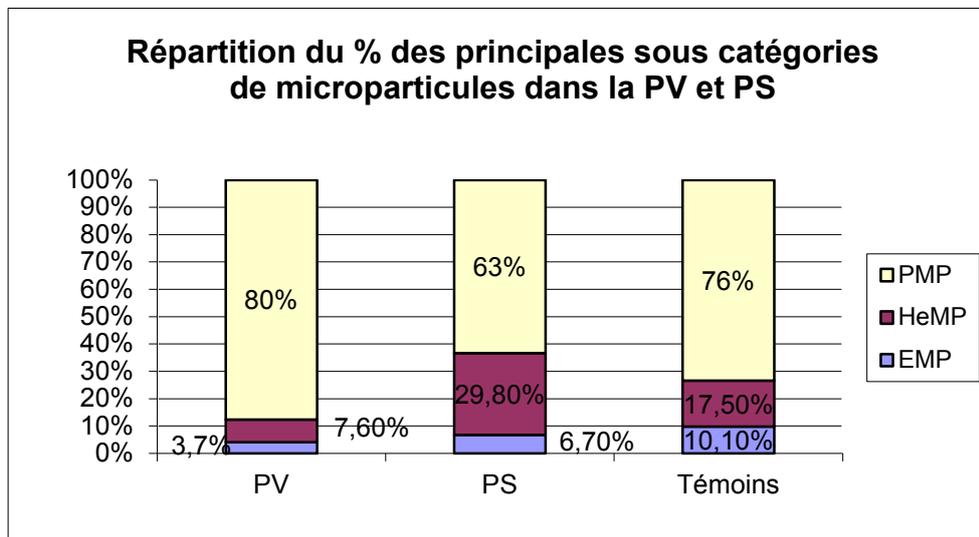


Figure 21 : Répartition du pourcentage des principales sous catégories de MP dans la PV et la PS.

Les microparticules plaquettaires sont les MP majoritaires chez les patients atteints de PV, PS et chez les témoins. Cependant, elles représentent 80% des MP totales chez les patients atteints de PV mais seulement 63% des MP totales chez les patients atteints de PS. Les microparticules érythrocytaires représentent environ 30% des MP totales chez les patients atteints de PS mais seulement 7,6% chez les patients atteints de PV. Les MP endothéliales représentent moins de 5% des MP totales chez les patients atteints de PV et 6,7% des MP totales chez les patients atteints de PS. Il existe donc une répartition différente des MP chez les patients atteints de PV et de PS.

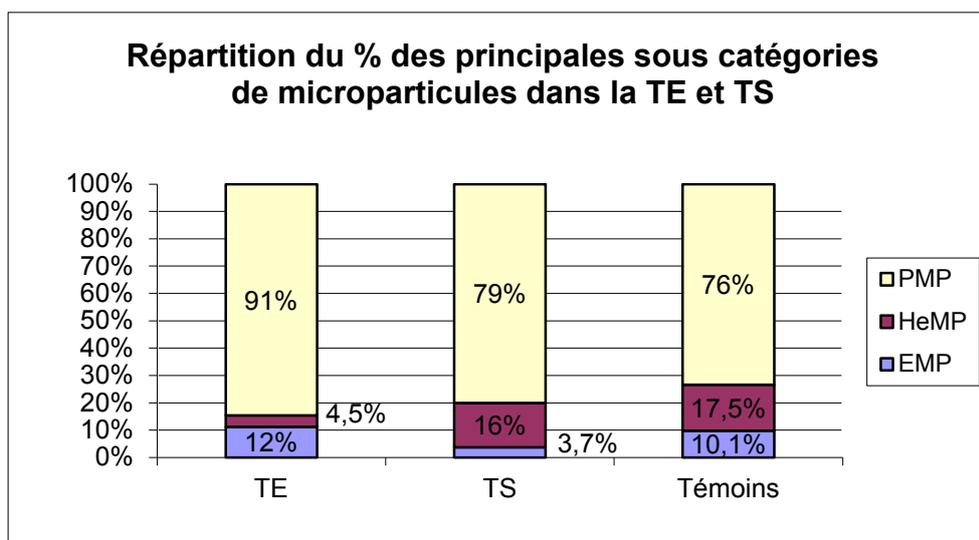


Figure 22 : Répartition du pourcentage des principales sous catégories de MP dans la TE et la TS.

Les microparticules plaquettaires sont les MP majoritaires chez les patients atteints de TE, TS et chez les témoins. Cependant les PMP représentent 91% des MP totales chez les patients atteints de TE et 79% des MP totales chez les patients atteints de TS. Les microparticules endothéliales représentent 16% des MP totales chez les patients atteints de TS et moins de 5% des MP totales chez les patients atteints de TE. Les microparticules endothéliales sont les plus nombreuses après les PMP chez les patients atteints de TE. Elles représentent 12% des MP totales chez les patients atteints de TE et seulement 3,7% des MP totales chez les patients atteints de TS. Comme pour les patients atteints de PV et de PS, la répartition des principales sous catégories de MP est différente entre les patients atteints de TE et ceux atteints de TS.

5) Coexpression des microparticules plaquettaires et des marqueurs de lignées différentes

Les MP étant capables d'acquérir de nouveaux antigènes au contact de cellules, nous avons étudié la coexpression, à la surface des MP, de marqueurs appartenant à des lignées différentes dans toutes nos catégories de patients. N'ayant trouvé des informations significatives que pour les MP coexprimant des marqueurs plaquettaires et endothéliaux et pour les MP coexprimant des marqueurs plaquettaires et le FT, nous avons choisi de ne pas montrer les données pour toutes les autres coexpressions étudiées (tableau 19).

	MP coexprimant des marqueurs plaquettaires et endothéliaux médiane en nombre par μL	MP coexprimant des marqueurs plaquettaires et le FT médiane en nombre par μL
TE (n=44)	34	32
TS (n=17)	11	12
PV (n=16)	43	21
PS (n=19)	19	12
MFP (n=4)	13	14
témoins (n=11)	17	23

Tableau 19 : Répartition (en concentration) des MP coexprimant des marqueurs plaquettaires et endothéliaux et des MP coexprimant des marqueurs plaquettaires et le FT chez nos différentes catégories de patients.

Il existe une augmentation significative de la médiane des MP plaquettaires coexprimant des marqueurs endothéliaux dans la TE (34/ μL) par rapport aux thrombocytoses secondaires (11/ μL) ($p=0,03$; test de Kruskal-Wallis). Nous avons également constaté une augmentation significative des MP plaquettaires coexprimant le FT dans la TE (32/ μL) par rapport aux thrombocytoses secondaires (12/ μL) ($p=0,05$; test de Kruskal-Wallis).

V. DISCUSSION

A. Respect des conditions préanalytiques et analytiques

La numération des microparticules requiert un respect strict des conditions préanalytiques et analytiques. Les échantillons prélevés au CHRU de Lille sont acheminés par des infirmières depuis les services cliniques jusqu'au centre de biologie pathologie. L'emploi du Transport Automatique Léger (TAL) est proscrit en raison de la grande agitation que subissent les échantillons dans le TAL ce qui provoque la génération potentielle de microparticules. Les échantillons venant de l'Hôpital Saint-Vincent sont acheminés dans des caisses par un transporteur jusqu'au laboratoire de l'Hôpital Saint-Philibert dans un délai inférieur à 2h. Tous les échantillons sont donc traités de façon similaire. A leur arrivée au laboratoire de l'Hôpital Saint-Philibert ou du CHRU, les échantillons destinés à la numération des microparticules sont immédiatement centrifugés puis congelés selon le respect des règles préanalytiques par une équipe de techniciens ou d'internes formés.

La numération des microparticules par cytométrie en flux est uniquement réalisée au laboratoire de l'hôpital Saint-Philibert par des techniciens ou des internes ayant de l'expérience en cytométrie en flux et formés à la numération des microparticules.

Nous nous sommes donc assurés du respect des conditions préanalytiques et analytiques par des consignes strictes sur les conditions et les délais de transport des échantillons et par la qualification du personnel réalisant la numération des microparticules par cytométrie en flux.

Il est cependant arrivé qu'un échantillon destiné à la numération des microparticules soit pris en charge trop tardivement après son arrivée au laboratoire de l'Hôpital Saint-Philibert ou que les deux étapes de centrifugation ne soient pas correctement effectuées. Nous avons alors exclu ces patients de l'étude.

La médiane des concentrations de PMP chez les patients atteints de TE non traités par myélofreinateur est de 3805 PMP/ μ L pour les patients du GHICL et de 3287 PMP/ μ L pour les patients du CHRU. Ceci est un argument en faveur de la maîtrise de l'étape préanalytique de notre travail.

B. Analyse de la population de patients

1) Données épidémiologiques

Nos populations de patients atteints de TE et de MFP, avec un âge médian au diagnostic respectivement de 63 ans et 64 ans, sont un peu plus jeunes que celles décrites dans les différentes études épidémiologiques (âge médian au diagnostic proche de 70 ans). Notre population de patients atteints de PV est en revanche plus âgée (âge médian au diagnostic de 69 ans contre un âge médian au diagnostic compris entre 60 et 65 ans dans différentes études) (2, 3). Le sex ratio homme/femme est légèrement plus prononcé pour les femmes dans notre étude que dans la littérature dans la PV (sex ratio à 0,8 dans notre étude et à 1,1 dans la littérature) ainsi que dans la TE (sex ratio à 0,5 dans notre étude et à 0,8 dans la littérature) et il est bien inférieur à celui décrit dans la littérature pour la MFP (sex ratio à 1 dans notre étude et sex ratio > 2 dans la littérature).

2) Antécédents thrombotiques et traitement myélofreinateur

En ce qui concerne les antécédents thrombotiques, nos chiffres sont en accord avec les données récentes de la littérature (12-39% pour la PV et 11 à 25% pour la TE) puisque nous avons relevé des antécédents de thrombose chez 25% de nos patients atteints de PV et chez 29% de ceux atteints de TE (22). Concernant les MFP, le pourcentage de patients ayant un antécédent de thrombose est un peu élevé dans notre étude (22% contre 7% dans la littérature). Les complications thrombotiques sont en effet plus rares dans la MFP que dans la PV et la TE (44).

En ce qui concerne le traitement myélofreinateur, 55% de nos patients atteints de PV sont traités par hydroxyurée et 30% par pipobroman. Un traitement myélofreinateur a été instauré chez 66% de nos patients atteints de TE. Il s'agit majoritairement (à 55%) de l'hydroxyurée. Dans la TE, les recommandations sont de n'utiliser un traitement myélofreinateur que pour les patients à haut risque en raison des complications liées à leur utilisation à long terme. Les traitements myélofreinateurs sont réservés aux patients ayant déjà été victimes de thrombose, ou dont le nombre de plaquettes est supérieur à 1500.10^9 , ou dont l'âge est supérieur à 60 ans (86). Le traitement de choix est alors l'hydroxyurée qui a fait preuve de son efficacité dans la réduction du risque vasculaire (87).

49% de nos patients atteints de MFP sont sous traitement myélofreinateur : hydroxyurée (30%) et pipobroman (19%). La mise sous traitement myélofreinateur est problématique dans la MFP, en effet la fibrose médullaire majore la toxicité des thérapeutiques. Les traitements sont donc réservés aux formes symptomatiques ou prolifératives caractérisées par une leucocytose, une thrombocytose et une splénomégalie volumineuse (débord splénique de plus de 10 cm). L'hydroxyurée et le pipobroman sont les traitements myélofreinateurs les plus utilisés (39).

3) Anomalies génétiques

La fréquence de la mutation JAK2V617F dans notre population de patients atteints de PV est similaire à celle récemment décrite (95%). Elle est en revanche plus élevée dans nos populations de patients atteints de TE et de MFP (63% et 62% contre 50% dans la littérature) (6).

La mutation de MPL a été constatée à une très faible fréquence dans notre étude (un seul patient porteur de la mutation).

C. Rôle de la numération des microparticules plaquettaires dans le diagnostic de SMP

1) Norme des PMP

La valeur médiane des PMP déterminée dans notre population de témoins (âge moyen 50 +/- 30 ans) est plus faible que celle décrite dans une étude de Robert et al portant sur 60 sujets sains (âge moyen 44 +/- 18 ans). En effet, la valeur médiane des PMP chez nos témoins est de 646 PMP/ μ L contre 1350 PMP/ μ L dans l'étude de Robert et Al (84).

Nous n'avons retrouvé de corrélation ni entre les valeurs des PMP et l'âge de nos patients ni entre les valeurs des PMP et la numération plaquettaire. Ces résultats concordent avec ceux de l'étude de Trappenburg et al portant sur 21 patients atteints de TE et 10 patients sains (66). Nos populations de témoins sains et de TS ne sont pas appariées an âge avec nos autres groupes de patients mais comme l'âge n'est pas corrélé à la numération des PMP, nous avons considéré que nous pouvions exploiter ces populations.

Nous avons en revanche constaté une corrélation entre le chiffre de plaquettes et la concentration des PMP chez les patients présentant une thrombocytose réactionnelle. Ceci suggère que la formation des PMP pourrait être directement issue des plaquettes lorsque la thrombocytose est de cause réactionnelle mais proviendrait d'une autre origine lorsqu'il s'agit d'un SMP. Cette première constatation est essentielle afin d'évaluer l'intérêt des PMP comme marqueur biologique différentiel entre les TE et les causes secondaires de thrombocytose.

2) Relation entre la présence de la mutation JAK2V617F et le taux de PMP

Nos résultats sont en désaccord avec celle de Trappenburg et al sur le fait que la présence de la mutation JAK2V617F n'a pas d'influence sur le nombre de PMP dans les SMP Ph1- (66). L'étude de Trappenburg a été réalisée sur seulement 21 patients atteints de TE dont 8 étaient traités par hydroxyurée. Or dans notre étude, la mise sous traitement myélofreinateur diminue la concentration des PMP.

3) Intérêt de la numération des PMP pour différencier la PV et la TE des causes secondaires de polyglobulie et de thrombocytose.

Les résultats de notre étude montrent que les concentrations des PMP sont significativement plus élevées chez les patients atteints de SMP que chez les témoins et les patients atteints de causes secondaires de polyglobulie et de thrombocytose.

Une étude de Villmow et al datant de 2002, portant sur 47 patients atteints de SMP (10 LMC, 13 PV, 12TE et 12 MFP), a retrouvé un pourcentage médian de microparticules plaquettaires significativement plus élevé chez les patients atteints de PV, TE et MFP que chez les témoins. La numération des MP était effectuée par cytométrie en flux ; cependant, les auteurs de cette étude ont travaillé sur du sang total dilué dans du tampon phosphate et mis en présence de concentrations saturantes de CD42b qui est un marqueur plaquettaire. Les PMP étaient définies comme tout évènement CD42b positif sous le seuil de détection de taille des plaquettes (83).

L'étude de Trappenburg et al datant de 2009 a étudié la répartition des MP chez 21 patients atteints de TE et 10 patients sains. La numération des MP était effectuée par cytométrie en flux après une triple centrifugation des échantillons. Des anticorps spécifiques des lignées lymphocytaire, granulocytaire, monocytaire, endothéliale et plaquettaire étaient utilisés. Les MP étaient distinguées du bruit de fond sur la base de leurs caractéristiques forward scatter (FS) et side scatter (SS) ainsi que par leur positivité à l'annexine V. Cette étude a mis en évidence que 90% des MP sont d'origine plaquettaire chez les patients atteints de TE ce qui concorde avec nos résultats (66).

Ainsi, deux études et la notre, utilisant la cytométrie en flux avec des méthodologies différentes, concluent à l'excès de PMP dans les SMP Ph1-.

Afin de montrer l'intérêt de la numération des PMP pour différencier la PV et la TE des causes secondaires de polyglobulie et de thrombocytose , nous avons utilisé la méthode ROC pour établir des seuils permettant de discriminer PV et PS ainsi que TE et TS. La méthode ROC permet d'obtenir un seuil afin de discriminer deux séries de valeurs avec la meilleure sensibilité et spécificité possible (sachant que ces deux paramètres varient en sens inverse). Les seuils ont été établis chez les patients non traités par myélofreinateur car notre premier objectif était d'évaluer le rôle des PMP comme marqueur diagnostique des SMP Ph1-.

Ne connaissant pas la prévalence de la PS et de la TS dans la population générale, nous n'avons pas calculé les valeurs prédictives positives et négatives.

Le seuil permettant de distinguer les PV des PS est de 694 PMP/ μ L ce qui correspond à une sensibilité de 93,8% et une spécificité de 75%. Avec ce seuil, un seul de nos patients atteints de PV (sur les 26 patients soit 3,8%) se situe en dessous du seuil (faux négatif) et 5 patients (sur 23 soit 21,7%) présentant une cause secondaire de polyglobulie se situent au dessus du seuil (faux positif).

Le seuil permettant de distinguer les TE des TS est de 899 PMP/ μ L ce qui correspond à une sensibilité de 93,8% et une spécificité de 65%. 6 (sur 81 soit 7,4%) de nos patients atteints de TE se situent en dessous du seuil (faux négatifs) et 10 (sur 36 soit 27,7%) de nos patients présentant une thrombocytose réactionnelle se situent au dessus du seuil.

Ces seuils sont valables dans nos populations de patients, dans nos conditions de travail. Nous avons repris les dossiers des patients présentant une discordance entre le diagnostic clinique et la numération des PMP selon les seuils établis afin de voir s'il s'agit d'une erreur préanalytique de notre part ou si la numération des PMP aurait pu apporter une aide au diagnostic.

Voici quelques illustrations de l'utilité des PMP comme marqueur discriminant des SMP par rapport aux étiologies secondaires de polyglobulie et de thrombocytose :

- M.H, avait été provisoirement diagnostiqué comme atteint d'une PV dans l'attente des résultats de biologie moléculaire. Or nous avons des valeurs de PMP basses : 210/ μ L. Aucune mutation de JAK2 n'a été retrouvée chez ce patient. Le diagnostic final a été celui d'une PS plutôt qu'une PV.
- M.V, présentait une thrombocytose persistante qui avait dans un premier temps été étiquetée comme une thrombocytose réactionnelle. Sa concentration en PMP était élevée (5570/ μ L). Les mutations de JAK2V617F et de MPL étaient négatives cependant sur d'autres arguments M.V a été reclassé en TE.
- Mme H, présentait une thrombocytose persistante et le diagnostic de TE avait été posé. Sa concentration en PMP était de 565/ μ L ce qui correspond plutôt à une TS selon nos seuils. Sur le plan moléculaire, aucune mutation n'a été retrouvée. Après quelques mois de suivi, en absence de réel argument en faveur d'une TE, cette patiente a été reclassée en TS.

Avec la standardisation de cette analyse par cytométrie en flux, les PMP pourraient devenir un marqueur fiable et rapide permettant de distinguer les SMP Ph1- des causes secondaires de polyglobulie et thrombocytose. Ce marqueur serait particulièrement intéressant dans les cas de SMP non muté JAK2 et MPL.

4) Définition des « thrombocytoses pures »

Par analogie aux érythrocytoses pures, nous proposons le terme de « thrombocytose pure » chez 5 patients présentant une thrombocytose persistante sans étiologie réactionnelle retrouvée et sans critère de SMP. La concentration médiane des PMP chez ces patients était de 355/ μ L ce qui est faible. Il serait intéressant chez ces patients de surveiller une fois par an la concentration des PMP afin de voir s'il ne s'agit pas d'un état latent, « pré-SMP », qui pourrait évoluer vers la TE ou la PV.

La concentration médiane de PMP dans notre groupe de 5 patients atteints d'érythrocytose pure est de 1110/ μ L. 4 patients ont une concentration de PMP supérieure au seuil établi par la méthode ROC pour différencier PV et PS. La concentration médiane des PMP dans ce groupe est à interpréter avec prudence car l'effectif est faible. De plus il n'a jamais été retrouvé d'argument en faveur d'une clonalité dans les érythrocytoses pures.

D. Microparticules plaquettaires et risque thrombotique

1) Relation entre les antécédents de thrombose et la numération des PMP

Comme dans deux autres études (Trappenburg et al et Villmow et al) (66, 83) nous n'avons pas mis en évidence de corrélation entre les antécédents de thrombose et la numération des PMP. Cependant, aucun patient n'a thrombosé pendant notre étude et nous n'avons pas de notion de la date de la thrombose chez nos patients. Il est très probable qu'une thrombose ancienne n'ait pas d'impact sur la numération des PMP.

2) Microparticules plaquettaires et risque cardiovasculaire et thrombotique

Nous n'avons retrouvé aucune corrélation entre la concentration des PMP et les principaux facteurs de risque cardiovasculaire (hypertension artérielle, diabète, dyslipidémie, tabac) qui sont des facteurs de risque thrombotique. Ceci peut s'expliquer par le fait que les patients étaient bien traités et suivis au niveau cardiovasculaire : traitement anti-hypertenseur, antidiabétiques oraux, traitement hypolipémiant. On peut penser que lorsque les facteurs de risque cardiovasculaires sont maîtrisés, il n'y a pas d'impact sur la numération des PMP.

Nous n'avons pas non plus retrouvé de corrélation entre la concentration des PMP et la stratification du risque cardiovasculaire (bas, intermédiaire, élevé) proposée par Tefferi (85).

Cette stratification est basée sur l'âge, les antécédents de thrombose, la numération plaquettaire et le nombre de facteurs de risque cardiovasculaire. Comme nous n'avons retrouvé de corrélation entre aucun de ces paramètres et les PMP, notre résultat n'est pas surprenant.

3) MP exprimant la P-sélectine

La P-sélectine est le médiateur de l'adhésion des plaquettes aux leucocytes. L'activation plaquettaire est associée à l'expression de la P-sélectine (CD62P) qui se transloque de la membrane des granules alpha jusqu'à la surface de la plaquette. Plusieurs études ont montré que l'augmentation de l'expression de la P-sélectine est un marqueur de l'activation plaquettaire dans les syndromes myéloprolifératifs. Cependant il n'a jamais été prouvé que l'expression de CD62P était corrélée avec les thromboses ou les hémorragies chez ces patients (88, 89).

Nous n'avons pas mis en évidence de différence significative au niveau des MP exprimant la P-sélectine entre nos différents groupes de patients.

4) Microparticules plaquettaires exprimant le facteur tissulaire (FT)

Comme dans l'étude de Trappenburg et al, nous avons mis en évidence une augmentation significative du nombre de MP plaquettaires exprimant le FT dans la TE par rapport aux TS. Le FT est l'initiateur cellulaire majeur de la coagulation. Une augmentation du nombre de MP plaquettaires exprimant le facteur tissulaire pourrait refléter l'état procoagulant de la TE et être un facteur de risque de thrombose. Cependant, dans notre étude et celle de Trappenburg ces MP représentent environ 1% des MP totales. Il est donc difficile de conclure sur le rôle prothrombotique de ces microparticules.

Dans une étude de 2007 portant sur 75 patients atteints de TE (37 mutés JAK2V617F et 38 non mutés) et 50 témoins, l'expression du FT sur les plaquettes a été corrélée à la présence de la mutation JAK2V617F (90). Nous n'avons cependant retrouvé aucune corrélation entre la présence de MP coexprimant des marqueurs plaquettaires et le FT et la présence de la mutation V617F de JAK2 dans notre série de TE.

5) Microparticules plaquettaires exprimant des marqueurs endothéliaux

Dans notre série de patients atteints de TE, nous avons retrouvé une augmentation significative des MP plaquettaires exprimant des marqueurs endothéliaux (CD144) par rapport à notre série de patients présentant des causes secondaires de thrombocytose.

L'étude de Trappenburg et al (66) a également retrouvé chez la moitié des patients atteints de TE une augmentation des MP coexprimant le marqueur endothélial CD62E avec le marqueur plaquettaire CD41. Ces MP originaires de deux lignées sont observées uniquement chez les patients à risque thrombotique mais ne sont pas retrouvées dans les autres cas de perturbation endothéliale : diabète (91), et insuffisance rénale. Chirinos et al (92) ont décrit une augmentation marquée des MP CD62E positives chez les patients ayant une maladie thromboembolique veineuse mais la coexpression avec les marqueurs plaquettaires n'a pas été étudiée. Le CD62E ou E-sélectine est une molécule d'adhésion qui médie le contact entre les cellules endothéliales et d'autres cellules notamment les plaquettes. Au repos, les cellules endothéliales n'expriment pas la E-sélectine mais, lors de l'activation cellulaire, la forme soluble de cette molécule est relarguée. La présence de MP exprimant le CD62E reflète un état d'activation endothéliale. Dans cette étude, l'explication donnée pour la double positivité des MP est l'interaction entre des plaquettes ou des fragments de plaquettes et les cellules endothéliales ayant pour conséquence une activation cellulaire et la génération de MP originaires des 2 lignées par transfert d'antigènes. Leur conclusion est qu'une augmentation du nombre de MP coexprimant le CD41 et le CD62E pourrait donc être de signification pathologique puisqu'elle semble être liée aux facteurs de risque de thrombose dans la TE.

Cette explication reste valable dans notre étude. En effet, même si nous avons utilisé le CD144 au lieu du CD62E pour numérer les microparticules endothéliales, il est très probable que la double positivité des MP pour des marqueurs plaquettaires et endothéliaux soit la conséquence d'un transfert d'antigène se produisant lors du contact entre une cellule endothéliale et les PMP au cours du processus procoagulant. Les MP coexprimant des marqueurs plaquettaires et endothéliaux pourraient être des marqueurs de l'état prothrombotique particulièrement important dans les SMP Ph1-.

E. Microparticules plaquettaires et suivi du traitement

1) Corrélation entre le taux de PMP et la présence d'un traitement myélofreinateur

Nous avons mis en évidence une diminution significative de la concentration des PMP chez nos patients après 6 mois de traitement myélofreinateur. La dose de charge administrée lors de l'instauration des thérapies myélofreinatrices pourrait expliquer cette diminution franche des PMP en début de traitement.

2) Microparticules plaquettaires et réponse hématologique

La réponse hématologique chez les patients atteints de SMP Ph1- nécessite la présence des trois critères suivants :

- GB < 10x10⁹/L
- Plaquettes < 400 G/L
- Hématocrite < 46%

Nous n'avons retrouvé aucune corrélation entre la numération des microparticules plaquettaires et la réponse hématologique chez nos patients traités bénéficiant d'une numération des microparticules tous les 6 mois. Ce résultat est décevant mais nécessiterait cependant d'être contrôlé sur une plus grande série de patients. En effet, si une relation était établie entre la diminution des PMP et la réponse hématologique chez les patients atteints de SMP Ph1-, ces PMP pourraient alors être considérées comme un marqueur de suivi et de rémission.

F. Hypothèses physiopathologiques

1) SMP et microparticules endothéliales

Nous avons constaté une augmentation significative des EMP (en nombre par μL) dans notre population de patients atteints de TE par rapport à notre population de patients présentant des causes secondaires de thrombocytose. Nous avons utilisé le CD144 ou VE cadherin pour caractériser les EMP. C'est une molécule d'adhésion appartenant à la famille des cadhérines qui est située au niveau du site de contact entre les cellules et intervient dans l'adhésion des cellules endothéliales ou épithéliales (93). Une augmentation des MP exprimant le CD144 pourrait ainsi refléter un état d'activation de l'endothélium. Cet état d'activation étant chronique dans la TE et seulement passager dans les causes secondaires de thrombocytose, ceci pourrait expliquer la différence significative de EMP entre ces deux catégories de patients.

2) SMP et microparticules érythrocytaires

Aucune étude n'a étudié la répartition des microparticules érythrocytaires chez les patients atteints de SMP. Les HeMP (en % médian par rapport au % des autres MP) sont significativement plus élevées dans notre population de patients présentant des causes secondaires de polyglobulie par rapport à notre population de patients atteints de PV. La même augmentation significative est retrouvée entre le groupe de patients présentant des causes secondaires de thrombocytose et le groupe de patients atteints de TE.

3) SMP et moyenne de l'intensité de fluorescence de l'annexine V

Nous avons constaté une diminution significative de la moyenne de l'intensité de fluorescence de l'annexine V chez les patients atteints de TE par rapport à ceux atteints de TS. La moyenne de l'intensité de fluorescence de l'annexine V est le reflet de la quantité de Pser à la surface des microparticules. Ceci est un argument pour penser que les MP des TE et des TS ne sont pas originaires de la même cellule.

4) Répartition des principales sous-classes de microparticules

Le profil de répartition des principales sous classes de microparticules est différent chez les patients atteints de SMP de celui des patients atteints de causes secondaires de polyglobulie et de thrombocytose. En effet, les patients atteints de SMP ont un pourcentage plus élevé de microparticules plaquettaires par rapport aux MP totales (cette différence est significative entre la TE et la TS mais pas entre la PV et la PS) alors les patients atteints de causes secondaires de polyglobulie et de thrombocytose ont un pourcentage de microparticules érythrocytaires par rapport aux microparticules totales significativement plus élevé que ceux atteints de PV et de TE.

Les PV et les TE sont des maladies clonales qui provoquent une prolifération de cellules hématopoïétiques. Flaumenhaft a montré, en utilisant des immunoblot, ainsi que par des études de microscopie électronique et de cytométrie en flux, qu'une partie des PMP est d'origine mégacaryocytaire chez les individus sains (94, 95). Nous n'avons pas pu étudier l'origine plaquettaire ou mégacaryocytaire des PMP chez nos patients car la technique est difficile à mettre en œuvre. En partant du principe qu'il existe une production de PMP par les mégacaryocytes chez tous les individus, plusieurs hypothèses peuvent être émises sur l'origine des PMP chez les patients atteints de PV et TE par rapport à ceux présentant une PS ou une TS. La première hypothèse serait que les mégacaryocytes produiraient plus de PMP dans la PV et la TE que dans les polyglobulies et thrombocytoses secondaires. A l'inverse, la deuxième hypothèse serait que la production de PMP par les plaquettes serait augmentée dans les SMP Ph1-.

VI. CONCLUSION

Notre étude portant sur 56 patients atteints de PV, 129 patients atteints de TE et 27 patients atteints de MFP constitue à ce jour et à notre connaissance la plus grande série de patients atteints de SMP dont les microparticules plaquettaires ont été dénombrées.

Nos résultats montrent tout l'intérêt que peuvent avoir les PMP comme potentiel nouveau marqueur de discrimination rapide des SMP Ph1-, en particulier en absence de marqueur moléculaire. En effet, lorsqu'aucune mutation n'est retrouvée, le diagnostic de SMP Ph1- est difficile et nécessite le recours à la BOM qui est un examen délicat chez ces patients en raison du risque hémorragique important dû aux fréquentes thrombopathies sous jacentes.

Il semble également se dégager « un profil d'expression » des différentes catégories de MP dans les SMP. Il est possible que ce profil d'expression soit lié à l'état procoagulant particulièrement important dans ce groupe de pathologie comme en témoigne l'augmentation des microparticules exprimant le facteur tissulaire et des microparticules plaquettaires exprimant des marqueurs endothéliaux chez les patients atteints de SMP Ph1-. Cependant, nous n'avons pas réalisé ce profil complet chez tous nos patients et il serait intéressant de le faire afin d'obtenir des effectifs plus élevés qui permettraient une meilleure analyse statistique.

BIBLIOGRAPHIE

1. Dameshek W. Some speculations on the myeloproliferative syndromes. *Blood*. 1951 Apr;6(4):372-5.
2. Maynadie M, Girodon F, Manivet-Janoray I, Mounier M, Mugneret F, Bailly F, et al. Twenty-five years of epidemiological recording on myeloid malignancies: data from the specialized registry of hematologic malignancies of Cote d'Or (Burgundy, France). *Haematologica*. 2011 Jan;96(1):55-61.
3. Phekoo KJ, Richards MA, Moller H, Schey SA. The incidence and outcome of myeloid malignancies in 2,112 adult patients in southeast England. *Haematologica*. 2006 Oct;91(10):1400-4.
4. Lataillade JJ, Pierre-Louis O, Hasselbalch HC, Uzan G, Jasmin C, Martyre MC, et al. Does primary myelofibrosis involve a defective stem cell niche? From concept to evidence. *Blood*. 2008 Oct 15;112(8):3026-35.
5. 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. *Lancet*. 2005 Mar 19-25;365(9464):1054-61.
6. Tefferi A, Gilliland DG. Oncogenes in myeloproliferative disorders. *Cell Cycle*. 2007 Mar 1;6(5):550-66.
7. Najman A. Maladie de Vaquez. *EMC-Hématologie*. 2010:1-14.
8. Scott LM, Tong W, Levine RL, Scott MA, Beer PA, Stratton MR, et al. JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera and idiopathic erythrocytosis. *N Engl J Med*. 2007 Feb 1;356(5):459-68.
9. Vainchenker W, Delhommeau F, Constantinescu SN, Bernard OA. New mutations and pathogenesis of myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2011 Aug 18;118(7):1723-35.
10. Pardanani AD, Levine RL, Lasho T, Pikman Y, Mesa RA, Wadleigh M, et al. MPL515 mutations in myeloproliferative and other myeloid disorders: a study of 1182 patients. *Blood*. 2006 Nov 15;108(10):3472-6.
11. Campbell PJ, Green AR. The myeloproliferative disorders. *N Engl J Med*. 2006 Dec 7;355(23):2452-66.
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. *Lancet*. 2005 Dec 3;366(9501):1945-53.
13. Ha JS, Kim YK, Jung SI, Jung HR, Chung IS. Correlations between Janus kinase 2 V617F allele burdens and clinicohematologic parameters in myeloproliferative neoplasms. *Ann Lab Med*. 2012 Nov;32(6):385-91.
14. Scott LM, Scott MA, Campbell PJ, Green AR. Progenitors homozygous for the V617F mutation occur in most patients with polycythemia vera, but not essential thrombocythemia. *Blood*. 2006 Oct 1;108(7):2435-7.
15. Barosi G, Bergamaschi G, Marchetti M, Vannucchi AM, Guglielmelli P, Antonioli E, et al. JAK2 V617F mutational status predicts progression to large splenomegaly and leukemic transformation in primary myelofibrosis. *Blood*. 2007 Dec 1;110(12):4030-6.
16. Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, Teo SS, Tiedt R, Passweg JR, et al. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med*. 2005 Apr 28;352(17):1779-90.
17. Skoda R. The genetic basis of myeloproliferative disorders. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2007:1-10.
18. Oh ST, Simonds EF, Jones C, Hale MB, Goltsev Y, Gibbs KD, Jr., et al. Novel mutations in the inhibitory adaptor protein LNK drive JAK-STAT signaling in patients with myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2010 Aug 12;116(6):988-92.

19. Schmidt MH, Dikic I. The Cbl interactome and its functions. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005 Dec;6(12):907-18.
20. Tefferi A, Thiele J, Orazi A, Kvasnicka HM, Barbui T, Hanson CA, et al. Proposals and rationale for revision of the World Health Organization diagnostic criteria for polycythemia vera, essential thrombocythemia, and primary myelofibrosis: recommendations from an ad hoc international expert panel. *Blood.* 2007 Aug 15;110(4):1092-7.
21. Bonicelli G, Abdulkarim K, Mounier M, Johansson P, Rossi C, Jooste V, et al. Leucocytosis and thrombosis at diagnosis are associated with poor survival in polycythaemia vera: a population-based study of 327 patients. *Br J Haematol.* 2013 Jan;160(2):251-4.
22. Tefferi A. Polycythemia vera and essential thrombocythemia: 2012 update on diagnosis, risk stratification, and management. *Am J Hematol.* 2012 Mar;87(3):285-93.
23. Falanga A, Marchetti M. Thrombotic disease in the myeloproliferative neoplasms. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2012;2012:571-81.
24. Chou YS, Gau JP, Yu YB, Pai JT, Hsiao LT, Liu JH, et al. Leukocytosis in polycythemia vera and splenomegaly in essential thrombocythemia are independent risk factors for hemorrhage. *Eur J Haematol.* 2013 Mar;90(3):228-36.
25. Finazzi G, Caruso V, Marchioli R, Capnist G, Chisesi T, Finelli C, et al. Acute leukemia in polycythemia vera: an analysis of 1638 patients enrolled in a prospective observational study. *Blood.* 2005 Apr 1;105(7):2664-70.
26. Najean Y, Dresch C, Rain JD. The very-long-term course of polycythaemia: a complement to the previously published data of the Polycythaemia Vera Study Group. *Br J Haematol.* 1994 Jan;86(1):233-5.
27. Kiladjian JJ, Rain JD, Bernard JF, Briere J, Chomienne C, Fenaux P. Long-term incidence of hematological evolution in three French prospective studies of hydroxyurea and pipobroman in polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Semin Thromb Hemost.* 2006 Jun;32(4 Pt 2):417-21.
28. Kiladjian JJ, Chevret S, Dosquet C, Chomienne C, Rain JD. Treatment of polycythemia vera with hydroxyurea and pipobroman: final results of a randomized trial initiated in 1980. *J Clin Oncol.* 2011 Oct 10;29(29):3907-13.
29. Andersson PO, Ridell B, Wadenvik H, Kutti J. Leukemic transformation of essential thrombocythemia without previous cytoreductive treatment. *Ann Hematol.* 2000 Jan;79(1):40-2.
30. Shibata K, Shimamoto Y, Suga K, Sano M, Matsuzaki M, Yamaguchi M. Essential thrombocythemia terminating in acute leukemia with minimal myeloid differentiation--a brief review of recent literature. *Acta Haematol.* 1994;91(2):84-8.
31. Finazzi G, Barbui T. Treatment of essential thrombocythemia with special emphasis on leukemogenic risk. *Ann Hematol.* 1999 Sep;78(9):389-92.
32. Abdulkarim K, Girodon F, Johansson P, Maynadie M, Kutti J, Carli PM, et al. AML transformation in 56 patients with Ph- MPD in two well defined populations. *Eur J Haematol.* 2009 Feb;82(2):106-11.
33. Passamonti F, Rumi E, Pietra D, Elena C, Boveri E, Arcaini L, et al. A prospective study of 338 patients with polycythemia vera: the impact of JAK2 (V617F) allele burden and leukocytosis on fibrotic or leukemic disease transformation and vascular complications. *Leukemia.* 2010 Sep;24(9):1574-9.
34. Murphy S, Peterson P, Iland H, Laszlo J. Experience of the Polycythemia Vera Study Group with essential thrombocythemia: a final report on diagnostic criteria, survival, and leukemic transition by treatment. *Semin Hematol.* 1997 Jan;34(1):29-39.
35. Lussana F, Caberlon S, Pagani C, Kamphuisen PW, Buller HR, Cattaneo M. Association of V617F Jak2 mutation with the risk of thrombosis among patients with essential thrombocythaemia or idiopathic myelofibrosis: a systematic review. *Thromb Res.* 2009 Sep;124(4):409-17.

36. Quintas-Cardama A, Kantarjian H, Pierce S, Cortes J, Verstovsek S. Prognostic Model to Identify Patients With Myelofibrosis at the Highest Risk of Transformation to Acute Myeloid Leukemia. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2013 Feb 4.
37. Wolanskyj AP, Schwager SM, McClure RF, Larson DR, Tefferi A. Essential thrombocythemia beyond the first decade: life expectancy, long-term complication rates, and prognostic factors. *Mayo Clin Proc*. 2006 Feb;81(2):159-66.
38. Passamonti F, Thiele J, Girodon F, Rumi E, Carobbio A, Gisslinger H, et al. A prognostic model to predict survival in 867 World Health Organization-defined essential thrombocythemia at diagnosis: a study by the International Working Group on Myelofibrosis Research and Treatment. *Blood*. 2012 Aug 9;120(6):1197-201.
39. Dupriez B, Demory J-L, Le Bousse-Kerdiles M-C, Giraudier S, Bilhou-Nabera C, Abgrall J-F, et al. Myelofibrose Primitive. *EMC-Hématologie*. 2008:1-14.
40. Silverstein MN, Wollaeger EE, Baggenstoss AH. Gastrointestinal and abdominal manifestations of agnogenic myeloid metaplasia. *Arch Intern Med*. 1973 Apr;131(4):532-7.
41. Barosi G, Ambrosetti A, Centra A, Falcone A, Finelli C, Foa P, et al. Splenectomy and risk of blast transformation in myelofibrosis with myeloid metaplasia. Italian Cooperative Study Group on Myeloid with Myeloid Metaplasia. *Blood*. 1998 May 15;91(10):3630-6.
42. Mesa RA, Li CY, Ketterling RP, Schroeder GS, Knudson RA, Tefferi A. Leukemic transformation in myelofibrosis with myeloid metaplasia: a single-institution experience with 91 cases. *Blood*. 2005 Feb 1;105(3):973-7.
43. Barosi G, Viarengo G, Pecci A, Rosti V, Piaggio G, Marchetti M, et al. Diagnostic and clinical relevance of the number of circulating CD34(+) cells in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Blood*. 2001 Dec 1;98(12):3249-55.
44. Barbui T, Carobbio A, Cervantes F, Vannucchi AM, Guglielmelli P, Antonioli E, et al. Thrombosis in primary myelofibrosis: incidence and risk factors. *Blood*. 2010 Jan 28;115(4):778-82.
45. Cervantes F, Dupriez B, Pereira A, Passamonti F, Reilly JT, Morra E, et al. New prognostic scoring system for primary myelofibrosis based on a study of the International Working Group for Myelofibrosis Research and Treatment. *Blood*. 2009 Mar 26;113(13):2895-901.
46. Dupriez B, Morel P, Demory JL, Lai JL, Simon M, Plantier I, et al. Prognostic factors in agnogenic myeloid metaplasia: a report on 195 cases with a new scoring system. *Blood*. 1996 Aug 1;88(3):1013-8.
47. Passamonti F, Cervantes F, Vannucchi AM, Morra E, Rumi E, Pereira A, et al. A dynamic prognostic model to predict survival in primary myelofibrosis: a study by the IWG-MRT (International Working Group for Myeloproliferative Neoplasms Research and Treatment). *Blood*. 2010 Mar 4;115(9):1703-8.
48. Gangat N, Caramazza D, Vaidya R, George G, Begna K, Schwager S, et al. DIPSS plus: a refined Dynamic International Prognostic Scoring System for primary myelofibrosis that incorporates prognostic information from karyotype, platelet count, and transfusion status. *J Clin Oncol*. 2011 Feb 1;29(4):392-7.
49. Tefferi A, Lasho TL, Huang J, Finke C, Mesa RA, Li CY, et al. Low JAK2V617F allele burden in primary myelofibrosis, compared to either a higher allele burden or unmutated status, is associated with inferior overall and leukemia-free survival. *Leukemia*. 2008 Apr;22(4):756-61.
50. Landolfi R, Di Gennaro L, Falanga A. Thrombosis in myeloproliferative disorders: pathogenetic facts and speculation. *Leukemia*. 2008 Nov;22(11):2020-8.
51. Harrison CN, Campbell PJ, Buck G, Wheatley K, East CL, Bareford D, et al. Hydroxyurea compared with anagrelide in high-risk essential thrombocythemia. *N Engl J Med*. 2005 Jul 7;353(1):33-45.
52. Barbui T, Finazzi G, Dupuy E, Kiladjian JJ, Briere J. Treatment strategies in essential thrombocythemia. A critical appraisal of various experiences in different centers. *Leuk Lymphoma*. 1996 Sep;22 Suppl 1:149-60.

53. Verstovsek S, Mesa RA, Gotlib J, Levy RS, Gupta V, DiPersio JF, et al. A double-blind, placebo-controlled trial of ruxolitinib for myelofibrosis. *N Engl J Med.* 2012 Mar 1;366(9):799-807.
54. Harrison C, Kiladjan JJ, Al-Ali HK, Gisslinger H, Waltzman R, Stalbovskaya V, et al. JAK inhibition with ruxolitinib versus best available therapy for myelofibrosis. *N Engl J Med.* 2012 Mar 1;366(9):787-98.
55. Pearson TC, Wetherley-Mein G. The course and complications of idiopathic erythrocytosis. *Clin Lab Haematol.* 1979;1(3):189-96.
56. Sokol L, Luhovy M, Guan Y, Prchal JF, Semenza GL, Prchal JT. Primary familial polycythemia: a frameshift mutation in the erythropoietin receptor gene and increased sensitivity of erythroid progenitors to erythropoietin. *Blood.* 1995 Jul 1;86(1):15-22.
57. Griesshammer M, Bangerter M, Sauer T, Wennauer R, Bergmann L, Heimpel H. Aetiology and clinical significance of thrombocytosis: analysis of 732 patients with an elevated platelet count. *J Intern Med.* 1999 Mar;245(3):295-300.
58. Bruge Debreu J, Charpentier A. Thrombocytose : conduite à tenir au laboratoire. *EMC-Biologie médicale.* 2013:1-8.
59. Campello E, Spiezia L, Radu CM, Bulato C, Castelli M, Gavasso S, et al. Endothelial, platelet, and tissue factor-bearing microparticles in cancer patients with and without venous thromboembolism. *Thromb Res.* 2011 May;127(5):473-7.
60. Piccin A, Murphy WG, Smith OP. Circulating microparticles: pathophysiology and clinical implications. *Blood Rev.* 2007 May;21(3):157-71.
61. Morel O, Morel N, Hugel B, Jesel L, Vinzio S, Goichot B, et al. [The significance of circulating microparticles in physiology, inflammatory and thrombotic diseases]. *Rev Med Interne.* 2005 Oct;26(10):791-801.
62. Freyssinet JM. Cellular microparticles: what are they bad or good for? *J Thromb Haemost.* 2003 Jul;1(7):1655-62.
63. Scholz T, Temmler U, Krause S, Heptinstall S, Losche W. Transfer of tissue factor from platelets to monocytes: role of platelet-derived microvesicles and CD62P. *Thromb Haemost.* 2002 Dec;88(6):1033-8.
64. Sabatier F, Lacroix R, Camoin-Jau L, Anfosso F, Sampol J, Dignat-George F. [Circulating endothelial cells, microparticles and progenitors: towards the definition of vascular competence]. *Rev Med Interne.* 2011 Jan;32(1):54-63.
65. Rank A, Nieuwland R, Delker R, Kohler A, Toth B, Pihusch V, et al. Cellular origin of platelet-derived microparticles in vivo. *Thromb Res.* 2010 Oct;126(4):e255-9.
66. Trappenburg MC, van Schilfgaarde M, Marchetti M, Spronk HM, ten Cate H, Leyte A, et al. Elevated procoagulant microparticles expressing endothelial and platelet markers in essential thrombocythemia. *Haematologica.* 2009 Jul;94(7):911-8.
67. Toti F, Satta N, Fressinaud E, Meyer D, Freyssinet JM. Scott syndrome, characterized by impaired transmembrane migration of procoagulant phosphatidylserine and hemorrhagic complications, is an inherited disorder. *Blood.* 1996 Feb 15;87(4):1409-15.
68. Muller I, Klocke A, Alex M, Kotsch M, Luther T, Morgenstern E, et al. Intravascular tissue factor initiates coagulation via circulating microvesicles and platelets. *FASEB J.* 2003 Mar;17(3):476-8.
69. Mallat Z, Benamer H, Hugel B, Benessiano J, Steg PG, Freyssinet JM, et al. Elevated levels of shed membrane microparticles with procoagulant potential in the peripheral circulating blood of patients with acute coronary syndromes. *Circulation.* 2000 Feb 29;101(8):841-3.
70. Quilici J, Banzet N, Paule P, Meynard JB, Mutin M, Bonnet JL, et al. Circulating endothelial cell count as a diagnostic marker for non-ST-elevation acute coronary syndromes. *Circulation.* 2004 Sep 21;110(12):1586-91.
71. Mutin M, Canavy I, Blann A, Bory M, Sampol J, Dignat-George F. Direct evidence of endothelial injury in acute myocardial infarction and unstable angina by demonstration of circulating endothelial cells. *Blood.* 1999 May 1;93(9):2951-8.

72. Nadar SK, Lip GY, Lee KW, Blann AD. Circulating endothelial cells in acute ischaemic stroke. *Thromb Haemost.* 2005 Oct;94(4):707-12.
73. Simak J, Gelderman MP, Yu H, Wright V, Baird AE. Circulating endothelial microparticles in acute ischemic stroke: a link to severity, lesion volume and outcome. *J Thromb Haemost.* 2006 Jun;4(6):1296-302.
74. Morel O, Toti F, Hugel B, Freyssinet JM. Cellular microparticles: a disseminated storage pool of bioactive vascular effectors. *Curr Opin Hematol.* 2004 May;11(3):156-64.
75. Abrahams VM, Straszewski-Chavez SL, Guller S, Mor G. First trimester trophoblast cells secrete Fas ligand which induces immune cell apoptosis. *Mol Hum Reprod.* 2004 Jan;10(1):55-63.
76. Belting M, Dorrell MI, Sandgren S, Aguilar E, Ahamed J, Dorfleutner A, et al. Regulation of angiogenesis by tissue factor cytoplasmic domain signaling. *Nat Med.* 2004 May;10(5):502-9.
77. Lacroix R, Judicone C, Poncelet P, Robert S, Arnaud L, Sampol J, et al. Impact of pre-analytical parameters on the measurement of circulating microparticles: towards standardization of protocol. *J Thromb Haemost.* 2012 Mar;10(3):437-46.
78. Yuana Y, Bertina RM, Osanto S. Pre-analytical and analytical issues in the analysis of blood microparticles. *Thromb Haemost.* 2010 Mar;105(3):396-408.
79. Shet AS, Aras O, Gupta K, Hass MJ, Rausch DJ, Saba N, et al. Sickle blood contains tissue factor-positive microparticles derived from endothelial cells and monocytes. *Blood.* 2003 Oct 1;102(7):2678-83.
80. Rubin O, Crettaz D, Canellini G, Tissot JD, Lion N, et al. Microparticles in stored red blood cells: an approach using flow cytometry and proteomic tools. *Vox Sang.* 2008 Nov;95(4):288-97.
81. Tintillier-Colin V, Cambier N, Bourgeois-Petit E, Rose C, Forzy G, Demory JL, Charpentier A et al. Elevated platelet microparticles in chronic Ph1 negative Myeloproliferative diseases. [abstract ASH]. 2010.
82. Charpentier A, Cambier N, Devaux S, Tintillier-Colin V, Wemaux M, Bruge Debreu J, et al. La numération des Microparticules Plaquettaires est discriminante pour séparer PV et TE des Thrombocytoses et Polyglobulies secondaires. [Abstract ASH]. 2010.
83. Villmow T, Kemkes-Matthes B, Matzdorff AC. Markers of platelet activation and platelet-leukocyte interaction in patients with myeloproliferative syndromes. *Thromb Res.* 2002 Nov 1;108(2-3):139-45.
84. 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? *J Thromb Haemost.* 2009 Jan;7(1):190-7.
85. Tefferi A, Elliott M. Thrombosis in myeloproliferative disorders: prevalence, prognostic factors, and the role of leukocytes and JAK2V617F. *Semin Thromb Hemost.* 2007 Jun;33(4):313-20.
86. Briere J. Thrombocytémie essentielle. Critères du diagnostic. Stratification pronostique. Ebauche de stratégie thérapeutique. *EMC-Hématologie.* 2006:1-19.
87. 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. *N Engl J Med.* 1995 Apr 27;332(17):1132-6.
88. Cahill MR, Macey MG, Newland AC. Correlation of GP53 and P-selectin expression in myeloproliferative disorders and normal controls. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 1996 Mar;7(2):169-71.
89. Griesshammer M, Beneke H, Nussbaumer B, Grunewald M, Bangerter M, Bergmann L. Increased platelet surface expression of P-selectin and thrombospondin as markers of platelet activation in essential thrombocythaemia. *Thromb Res.* 1999 Nov 1;96(3):191-6.

90. Falanga A, Marchetti M, Vignoli A, Balducci D, Russo L, Guerini V, et al. V617F JAK-2 mutation in patients with essential thrombocythemia: relation to platelet, granulocyte, and plasma hemostatic and inflammatory molecules. *Exp Hematol.* 2007 May;35(5):702-11.
91. Sommeijer DW, Joop K, Leyte A, Reitsma PH, ten Cate H. Pravastatin reduces fibrinogen receptor gpIIIa on platelet-derived microparticles in patients with type 2 diabetes. *J Thromb Haemost.* 2005 Jun;3(6):1168-71.
92. Chirinos JA, Heresi GA, Velasquez H, Jy W, Jimenez JJ, Ahn E, et al. Elevation of endothelial microparticles, platelets, and leukocyte activation in patients with venous thromboembolism. *J Am Coll Cardiol.* 2005 May 3;45(9):1467-71.
93. Hordijk PL, Anthony E, Mul FP, Rientsma R, Oomen LC, Roos D. Vascular-endothelial-cadherin modulates endothelial monolayer permeability. *J Cell Sci.* 1999 Jun;112 (Pt 12):1915-23.
94. 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.* 2009 Jan 29;113(5):1112-21.
95. Italiano JE, Jr., Mairuhu AT, Flaumenhaft R. Clinical relevance of microparticles from platelets and megakaryocytes. *Curr Opin Hematol.* 2010 Nov;17(6):578-84.

Université de Lille 2
FACULTE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES DE LILLE
DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE
Année Universitaire 2012/2013

Nom : BARRIERE
Prénom : Stéphanie

Titre de la thèse : Apport de la numération des microparticules plaquettaires par cytométrie en flux pour le diagnostic des syndromes myéloprolifératifs Ph1-.

Mots-clés : Syndromes myéloprolifératifs Ph1-, cytométrie en flux, microparticules plaquettaires, JAK2V617F, thromboses, polyglobulie secondaire, thrombocytose réactionnelle.

Résumé : La classification de l'Organisation Mondiale de la Santé révisée en 2008 regroupe sous le terme de syndromes myéloprolifératifs Ph1- : la Polyglobulie Vraie, la Thrombocytémie essentielle et la Myélofibrose Primitive. Ce sont des maladies rares, caractérisées par un état procoagulant particulièrement important et dont le diagnostic est parfois difficile lorsqu'aucune mutation n'est retrouvée. Les microparticules sont des fragments de membrane plaquettaire, qui sont générés au cours du processus d'activation cellulaire ou d'apoptose. Toute cellule peut produire des microparticules. Depuis quelques années, ces microparticules sont considérées comme des biomarqueurs reflétant l'état procoagulant de nombreuses pathologies.

La cytométrie en flux et l'immunocapture sur plaque sont les principales méthodes de numération des microparticules ; la méthode de choix étant la cytométrie en flux. Le principe de dénombrement des microparticules par cytométrie en flux est basé sur leur richesse en phosphatidylsérine et nécessite des conditions préanalytiques particulières. Le protocole a été adapté à notre laboratoire grâce à sa description en 2007 par Robert et al.

L'objectif de notre étude est d'évaluer l'intérêt de la numération des microparticules plaquettaires par cytométrie en flux comme potentiel marqueur diagnostique des syndromes myéloprolifératifs Ph1-.

Notre étude porte sur 56 patients atteints de polyglobulie vraie, 129 atteints de thrombocytémie essentielle, 27 atteints de myélofibrose primitive, 23 patients présentant une cause secondaire de polyglobulie, 37 patients présentant une cause secondaire de thrombocytose et 68 témoins.

Nos résultats ont montré que les valeurs médianes des microparticules plaquettaires sont significativement plus élevées dans le groupe de patients atteints de syndrome myéloprolifératifs : Thrombocytémie Essentielle (3805 PMP/ μ L), Polyglobulie Vraie (2899 PMP/ μ L), Myélofibrose Primitive (2361 PMP/ μ L) que chez les témoins (646 PMP/ μ L) : ($p < 10^{-7}$), ($p < 10^{-6}$), ($p = 0.01$). Par ailleurs, les valeurs médianes de PMP sont significativement plus élevées dans notre série de polyglobulie vraie par rapport aux patients ayant des causes secondaires de polyglobulie (504 PMP/ μ L) ($p < 10^{-7}$) ainsi que dans notre série de thrombocytémie essentielle par rapport aux patients ayant des causes secondaires de thrombocytose (644 PMP/ μ L) ($p < 10^{-7}$). De plus, nous avons étudié chez certains patients la répartition des microparticules endothéliales, érythrocytaires, monocytaires, granulocytaires ainsi que des microparticules exprimant la PSelectine et le facteur tissulaire. Il semble se dégager un profil particulier d'expression de microparticules dans les syndromes myéloprolifératifs lié à l'état procoagulant particulièrement important dans ce groupe de maladies.

Les résultats concernant les autres catégories microparticules nécessitent d'être confirmés sur un plus grand nombre de patients. Cependant les microparticules plaquettaires semblent être un biomarqueur prometteur pour différencier rapidement les syndromes myéloprolifératifs des autres causes de thrombocytose et de polyglobulie.

Membres du jury :

Président :	Monsieur le Professeur P. DUTHILLEUL
Assesseurs :	Monsieur le Professeur J-L DEMORY Madame le Docteur N. CAMBIER
Directeur de thèse :	Madame le Docteur A. CHARPENTIER