

Article original

Dépistage des thrombopénies immunologiques de l'enfant par cytométrie en flux
Flow Cytometry Screening for Immune Thrombocytopenia in the Pediatric Population**R.ZOUITEN¹, M.BRAHIMI², M.EI HORRI³, H.RAMDANI¹, O.BOUHEBILA⁴, O.CHABI⁴**

1- Hôpital mère et enfant de l'armée, Beni Messous, Alger.

2- Laboratoire d'hématologie, EHU 1^{er} Novembre, Oran.

3- Hôpital Militaire Universitaire Spécialisé (CORFA), Staouali, Alger.

4- Université des sciences de la santé, faculté de pharmacie, Alger.

Résumé : Introduction : Le purpura thrombopénique immunologique (PTI) est une maladie auto-immune acquise caractérisée par une faible numération plaquettaire (< 100 000/mm³) due à une destruction des plaquettes médiée par des "auto- anticorps". La cytométrie en flux peut être utilisée comme outil diagnostique permettant de mieux comprendre l'étiologie immunitaire de la maladie, si elle est simplifiée et standardisée. Cette étude est une continuité aux travaux réalisés par Pr.Zouiten en 2021; dont l'objectif est d'évaluer les performances de la cytométrie en flux dans le diagnostic de PTI pédiatrique.

Matériel et méthode : Il s'agit une étude cas-témoin transversale menée sur 31 témoins sains, 5 témoins thrombopéniques et 38 patients PTI pour évaluer le taux des PAIg par deux méthodes (directe et indirecte). Les MFI IgG et IgM obtenues ont servi à la réalisation d'une courbe ROC et la fixation es valeurs seuils.

Résultats : La méthode directe a révélé une spécificité de 75% et une sensibilité de 77,77% avec une prédominance de positivité en IgM , la même chose était trouvée par la méthode indirecte mais avec une sensibilité de 82,35% et une spécificité de 84,21%.

Conclusion : La cytométrie en flux optimisée a montré de bonnes performances de détection de PAIg, compatibles avec la littérature et l'étude de référence malgré quelques différences techniques et méthodologiques, elle présente donc une réelle possibilité de standardisation inter-laboratoire.

Mots clés : Anticorps anti-plaquette, purpura thrombopénique immunologique, cytométrie en flux, PAIg, thrombocytopenie immunitaire.

Abstract: Introduction: Immune thrombocytopenic purpura (ITP) is an acquired autoimmune disease characterized by a low platelet count (<100,000/mm³) due to platelet destruction mediated by "autoantibodies." Flow cytometry can be used as a diagnostic tool to better understand the immune etiology of the disease if it is simplified and standardized. This study is a continuation of the work carried out by Pr. Zouiten in 2021, with the objective of evaluating the performance of flow cytometry in the diagnosis of pediatric ITP.

Material and methods: This is a cross-sectional case-control study conducted on 31 healthy controls, 5 thrombocytopenic controls, and 38 ITP patients to evaluate the PAIg level using two methods: direct and indirect. The obtained IgG and IgM MFI (Mean Fluorescence Intensity) values were used to create ROC curves and establish cut-off values.

Results: The direct method revealed a specificity of 75% and a sensitivity of 77.77%, with a predominance of IgM positivity. The same finding was observed with the indirect method, but with a sensitivity of 82.35% and a specificity of 84.21%.

Conclusion: The optimized flow cytometry assay showed good performance for PAIg detection, which is consistent with the literature and the reference study despite some technical and methodological differences. It therefore presents a real possibility for inter-laboratory standardization.

Keywords: Anti-platelet antibody, immune thrombocytopenic purpura, flow cytometry, PAIg, immune thrombocytopenia.

Introduction :

La thrombopénie immunologique (PTI) est une maladie auto-immune bénigne du sang, caractérisée par une association d'une destruction périphérique des plaquettes normales et une insuffisance de leur production médullaire, entraînant une diminution de leur nombre et un risque hémorragique de gravité variable selon la sévérité de la thrombopénie [1][2].

Le PTI est diagnostiqué par élimination d'autres causes de thrombocytopenie à l'aide des examens cliniques, biologiques et thérapeutiques. Cette méthode diagnostique est complexe, aggravée par l'hétérogénéité de la maladie et les examens inclus sont parfois invasifs, coûteux et très longs, ce qui complique son identification avec certitude[3]. Plusieurs méthodes ont été développées pour la mise en évidence des anticorps antiplaquettes, telles que l'ELISA, la MAIPA et le RIA. Bien que très spécifiques, ces techniques sont lourdes, longues à mettre en oeuvre et peu sensibles, ce qui justifie leur absence dans les guidelines actuelles d'ASH[4] et BSH[5], Néanmoins les sociétés asiatiques savantes plaident pour l'intégration de ces tests dans la démarche diagnostique.

La cytométrie en flux (CMF) est largement répandue grâce à ses nombreux avantages : simple, rapide, peu coûteuse et réalisable même en cas de thrombopénie sévère ou lorsque le volume d'échantillon sanguin est limité [6]. Cependant elle n'est pas encore validée comme outil de diagnostic à cause de sa faible spécificité liée à son incapacité de différencier entre les PAIg (*platelet associated immunoglobulin*) pathologiques des PAIg non pathologiques [7]. Compte tenu de cela et afin d'établir la sensibilité et la spécificité, et valider la détection des PAIg par CMF chez une population pédiatrique, notre étude a pour objectif d'optimiser cette technique de recherche des anticorps antiplaquettes d'isotype IgG et IgM soit fixés directement sur les plaquettes du patient ou bien libre dans le plasma, et en suite d'évaluer ses performances diagnostiques dans le PTI.

Matériels et méthodes :

I. Population et type d'étude :

Il s'agit d'une étude cas-témoin transversale menée sur une période de 6 mois ; de décembre 2024 jusqu'à mai 2025 au niveau de l'hôpital mère et enfant de l'armée. Notre population a été répartie en trois groupes : un groupe présentant les patients atteints de PTI (selon les critères de diagnostic d'ASH 2019), et deux groupes témoins. Le premier était des témoins sains indemnes de toute pathologie ; le second était des patients présentant une thrombopénie d'origine non immunologique.

II. Appareillage et réactifs :

- Cytomètre en flux BD FACSLyric™
- PBS: BD™ CellWASH, Lot N°1919802828, REF 349524.
- Solution de lavage: PBS/EDTA 1%.
- Goat F(ab')₂ Anti-Human IgG R-PE, Invitrogen™, Ref H10104.
- Goat F(ab')₂ Anti-Human IgM R-FITC, Invitrogen™, Ref H15101.
- Anti-Human CD42b, eBioscience™, Ref 25-0429-42.

III. Recueil et préparation des échantillons :

Les échantillons sanguins ont été collectés sur des tubes EDTA-K3. Une première centrifugation à faible vitesse (1100 tr/min) pendant 10 mins, permettant d'obtenir le plasma riche en plaquettes (PRP), qui est ensuite centrifugé à une forte vitesse (2700 tr/min) pendant 5 mins, conduisant à l'obtention d'un culot plaquettaire utilisé pour la méthode directe, et un surnageant constitué de plasma pauvre en plaquettes (PPP) destiné pour la méthode indirecte. Le PPP soit conservé à -20°C ou bien utilisé immédiatement pour la recherche des anticorps antiplaquettes solubles, tandis que le culot plaquettaire était soumis à des lavages dont le nombre diffère selon la méthode.

IV. Analyse cytométrique :

Les données ont été obtenues par le cytomètre BD FACSLyric™ sur le logiciel BD FACSuite software, ensuite elles ont été analysées par le logiciel Kaluza Analysis Software version 2.3.1(Beckman Coulter licence d'évaluation gratuite).

Le nombre de plaquettes analysées dans le « gate » final était de 9000 à 10.000 pour les témoins sains, et 1000 au minimum pour les patients sévèrement thrombopéniques, les résultats sont exprimés en MFI (intensité moyenne de fluorescence) obtenue pour l'IgG et l'IgM.

V. Evaluation des performances du test :

Les performances du test ont été évaluées à la base des critères intrinsèques et extrinsèques. Les critères intrinsèques incluant la sensibilité et la spécificité ; calculées à l'aide d'une courbe ROC et la valeur seuil qu'elle offre. Les critères extrinsèques incluant les valeurs prédictives positives (VPP) et négatives (VPN) et les rapports de vraisemblance (LR+,LR-).

Résultats :

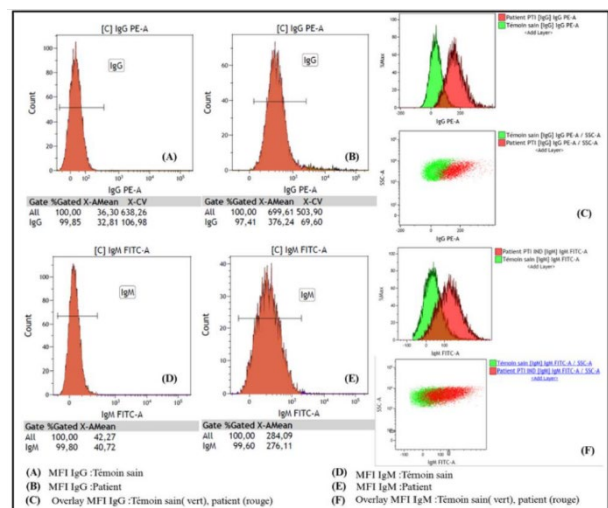
VI. Description de la population étudiée :

L'étude a inclus un total de (74) échantillons : (31) témoins sains, (38) patients PTI et cinq témoins thrombopéniques ; Parmi ces derniers, quatre sont atteints d'hémopathies malignes (Leucémies aiguës) et un d'une insuffisance hépatocellulaire.

Les témoins sains inclus dans les deux méthodes (n=27 pour la méthode directe et n=16 pour la méthode indirecte), étaient des sujets de bonne santé indemnes de toutes pathologies avec une numération plaquettaire normale [150-450 G/l].

VII. Comparaison des MFI IgG et IgM patient/témoin

La figure ci-dessous (**Figure 1**) illustre la comparaison des intensités moyennes de fluorescence (MFI) des IgG et IgM d'un témoin sain et d'un patient atteint de PTI par méthode directe.



VIII. Détermination des valeurs intrinsèques du test

Les courbes ROC **Figure 2** ont été tracées sur la base des valeurs des MFI des IgG et des IgM des témoins (sains et thrombopéniques) et des patients. Les valeurs seuils choisies sont 102,96 pour IgG et 99,18 pour IgM. A ces seuils, pour la combinaison MFI IgG/IgM dans la méthode directe, la sensibilité était de 77,77% avec une spécificité de 75%.

Pour la méthode indirecte, la sensibilité était de 82,35% avec une spécificité de 84,21%.

Tableau 1: Taux d'expression des différents isotypes

Méthode	Paramètre	% de positivité	% de cumulé
Directe	IgG seul	22,22	22,22
	IgM seul	33,33	55,55
	IgG+IgM	22,22	77,77
Indirecte	IgG seul	11,76	11,76
	IgM seul	32,35	44,29
	IgG+IgM	38,23	82,35

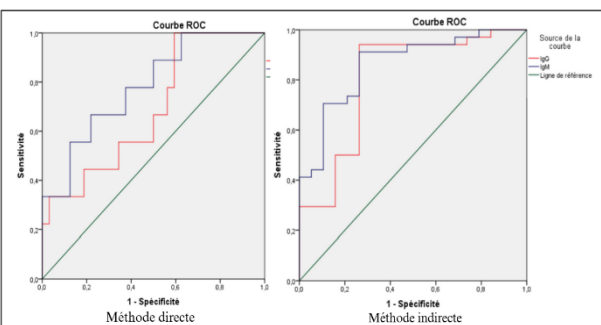


Figure 1: Courbes ROC PAIg Directe et indirecte. Les AUCs de la méthode directe (IgG:0,688, IgM:0,781) ont été modérées tandis que celle de la méthode indirecte ont été plus élevées avec des valeurs des IgG:0,805 et des IgM: 0,861.

IX. Détermination des valeurs extrinsèque du test:

le LR+ de la méthode directe était 3,11[1,55-6,23] et le LR- à 0,30[1,55-6,23] tandis que la méthode indirecte a montré un LR+ de 5,22[1,83-15] et un LR- à 0,21[0,10-0,44].

La VPP de la méthode directe à 47% [30%-64%] et celle de la méthode indirecte à 90% [77%-96%].

Discussion :

La thrombocytopénie immunitaire est une maladie auto-immune acquise caractérisée par une diminution du nombre des plaquettes consécutive à leur destruction accélérée médiée par des auto anticorps anti-plaquettaires[8]. Des tests de détection des PAIg sont de plus en plus utilisés comme outil de diagnostic de PTI et pour surveiller la réponse des patients pendant le traitement [9-10]. Dans cette présente étude, les performances globales de la CMF ont été évalués, en suivant un protocole optimisé en 2021 au niveau du laboratoire de l'hôpital militaire de Constantine (HMRUC) [1]

Un total de Soixante- quatorze (74) échantillons a été inclus dans l'étude, parmi eux trente et un (31) sont des témoins sains répartis en (n=27) pour la méthode directe et (n=16) pour l'indirecte. Cette limitation pour la méthode indirecte est expliquée d'une part par l'exigence que ces témoins doivent être impérativement du groupe O afin d'éviter toute interférence liée aux antigènes A et B exprimés par les plaquettes, d'autre part, la méthode directe a été lancée en premier mobilisant davantage de temps et de ressources.

Les patients PTI ont été sélectionnés selon les guidelines de l'ASH, il s'agissait d'une population pédiatrique avec une moyenne d'âge de 5,31ans pour la méthode directe et 6,64 ans pour la méthode indirecte.

La comparaison des MFI IgG et IgM par la superposition des histogrammes d'un témoin et ceux d'un patient positif en IgG et l'autre positifs en IgM (figure 1), a montré une différence nette au niveau des intensités des MFI, ce qui signifie que les patients ont une fixation plus importante des anticorps secondaires ; cohérent avec la présence d'anticorps antiplaquettes dans le PTI. Cette distinction visuelle renforce la capacité du test à différencier les patients atteints de PTI des témoins.

Les résultats des MFI des témoins sains et thrombopéniques et celles des patients ont été utilisés pour tracer des courbes ROC (**Figure 2**), et déterminer les valeurs seuils permettant d'améliorer à la fois la sensibilité et la spécificité de diagnostic du PTI. En tenant compte que les AUCs de la méthode directe étaient modérés (IgG:0,688, IgM:0,781) indiquant des performances diagnostiques acceptables, tandis que celles de la méthode indirecte étaient proches de 1 (IgG: 0,805 ,IgM:0,861) indiquant une meilleure performance. La méthode directe a été effectuée sur le culot plaquettaire de 9 enfants PTI présentant un taux moyen de plaquettes de 25,44 G/L. La sensibilité de la combinaison IgG/IgM était de 77,77% avec une spécificité de 75% corrélant avec l'étude de Hee Jin Huh et al (2009)[11]. La méthode indirecte était appliquée sur le sérum de 34 patients (29 étaient congelés) présentant un taux moyen de plaquettes de 26,26 G/L, la combinaison IgG/IgM a permis d'atteindre une sensibilité de 82,35% et une spécificité de 84,21% comparable à celle rapportée par l'étude de Aaron Tomer (2006) [12].

Des différences de sensibilité de détection sont observées entre les deux méthodes. Pour la méthode directe, le petit nombre de patient (n=9), réduisant la stabilité de la courbe ROC et donc la précision des seuils, justifiant également la faible sensibilité obtenue. En revanche, pour la méthode indirecte le nombre de patient (n=34) a permis une meilleure stabilité de la courbe ROC et ainsi une identification plus précise des seuils. La meilleure sensibilité obtenue pour les IgM (70,5%) par rapport à celle d'IgG (50%) peut s'expliquer par le profil immunitaire des enfants, d'autant plus qu'il a été déjà démontré que le PTI infantile est principalement médié par les IgM[13](32,35% des patients ont exprimé uniquement des IgM (**Tableau 1**).

Cette étude est une poursuite aux travaux réalisés par Pr.Zouiten en 2021 à Constantine, dont la population d'étude a inclus (n=204) témoins (n=162 sains et n=42 thrombopéniques) et (n=102) patients PTI à moyenne d'âge de 30 ans sur un autre cytomètre et par d'autres réactifs. La méthode directe a montré une sensibilité de 84,3% et une spécificité de 95,5%. Quant à la méthode indirecte elle présentait une sensibilité de 81,8% et une spécificité de 84%. Les différences observées des valeurs seuils, sensibilités et spécificités obtenues par notre étude et celles obtenues dans l'étude de référence peuvent s'expliquer par plusieurs facteurs méthodologiques. D'abord, la taille des populations étudiées diffère considérablement, influençant le traçage

des courbes ROC et par la suite les choix des valeurs seuil. De plus, notre population d'étude était exclusivement pédiatrique, dans laquelle a été précédemment noté que le PTI aiguë, est principalement médié par les IgM, contrairement au PTI chronique de l'adulte, cette particularité immunologique peut également influencer les résultats. Par ailleurs, notre étude a apporté certaines améliorations au protocole initial. En effet, il a été simplifié par réduction du nombre de lavage et afin d'éviter la perte cellulaire sans altérer le marquage. En outre on a opté à un marquage multiparamétrique dans un seul tube en utilisant des anticorps couplés aux fluorochromes différents, simplifiant donc la manipulation et permettant un gain de temps et limitant les erreurs potentielles liés à l'utilisation de plusieurs tubes. Les résultats obtenus démontrent que la technique de CMF optimisée pour l'évaluation des taux des PAIg a une sensibilité et une spécificité excellente et devrait faciliter le diagnostic des thrombocytopénies immunitaire et permettre le suivi des patients pour déterminer la rémission immunitaire.

Conclusion : Le purpura thrombopénique immunologique est un désordre impliquant des auto-anticorps anti-plaquettes, entraînant leur destruction. Afin de faciliter la détermination de ces auto-anticorps, un dépistage par cytométrie de flux a été développé, c'est une technique sensible, simple, rapide et peu coûteuse. L'application de la CMF optimisée a montré une sensibilité et une spécificité globalement satisfaisantes, avec une concordance des résultats aux données de la littérature et ceux de l'étude de référence, malgré certaines différences liées aux populations étudiées et aux cytomètres utilisés ; prouvant un potentiel réel vers une harmonisation de la technique entre les laboratoires.

Références :

- Zouiten R, BRAHIMI M. Recherche des anticorps antiplaquettes par cytométrie en flux chez les patients présentant une thrombopénie immunologique [Internet]. université de constantine3 salah boubnider; 2023.
- Deshayes S, Godeau B. Thrombopénies. EMC - Traité de Médecine Akos 2018;13(2):1-11 [Article 4-0080]. CrossRef Listing Deleted DOIs [Internet]. 2000 [cité 28 juin 2025];
- González-López TJ, Newland A, Provan D. Current Concepts in the Diagnosis and Management of Adult Primary Immune Thrombocytopenia: Our Personal View. *Medicina (Mex)*. 21 avr 2023;59(4):815. 5.
- Neunert C, et al. **American Society of Hematology 2019 guidelines for immune thrombocytopenia.** *Blood Adv*. 2019;3(23):3829-3866.
- Provan D, et al. **Updated international consensus report on the investigation and management of primary immune thrombocytopenia.** *Blood Adv*. 2019;3(22):3780-3817.
- Teraz-Orosz A, Cooper N, Crawley JTB, Salles-Crawley II. Detection of anti-platelet antibodies in immune thrombocytopenia by flow cytometry. *Br J Haematol*. mars 2019;184(5):844-7. 12.
- Nielsen OH, Tuckuviene R, Nielsen KR, Rosthøj S. Flow cytometric measurement of platelet-associated immunoglobulin in children with newly diagnosed Immune Thrombocytopenia. *Eur J Haematol*. avr 2016;96(4):397-403. 15.
- Curtis BR, McFarland JG. Detection and identification of platelet antibodies and antigens in the clinical laboratory. *Immunohematology*. 2009;25(3):125-35. 17.
- Romero-Guzmán LT, López-Karpovitch X, Paredes R, Barrales-Benitez O, Piedras J. Detection of platelet-associated immunoglobulins by flow cytometry for the diagnosis of immune thrombocytopenia: a prospective study and critical review. *Haematologica*. juin 2000;85(6):627-31. 8.
- Kelton JG, Vrbensky JR, Arnold DM. How do we diagnose immune thrombocytopenia in 2018, *Hematol Am Soc Hematol Educ Program*. 30 nov 2018;2018(1):561-7. 9.
- Huh HJ, Park CJ, Kim SW, Han SH, Jang S, Chi HS. Flow cytometric detection of platelet-associated immunoglobulin in patients with immune thrombocytopenic purpura and nonimmune thrombocytopenia. *Ann Clin Lab Sci*. 2009;39(3):283-8 22.
- Tomer A. Autoimmune thrombocytopenia: determination of platelet-specific autoantibodies by flow cytometry. *Pediatr Blood Cancer*. 15 oct 2006;47(5 Suppl):697-700. 23.
- Tomer A. Autoimmune thrombocytopenia: determination of platelet-specific autoantibodies by flow cytometry. *Pediatr Blood Cancer*. 15 oct 2006;47(5 Suppl):697-700. 23.