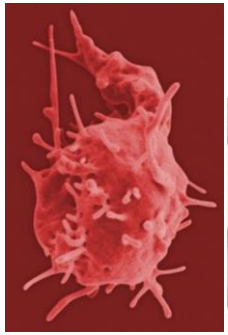
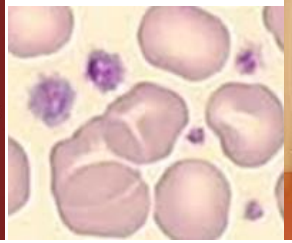
PHENOTYPAGE PLAQUETTAIRE
Intérêt, techniques et interprétation

Laure Croisille
Laboratoire HLA- ILP, EFS Ile de France
CRETEIL

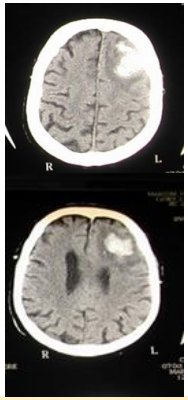
SFTS XXXIe Congrès -TOULOUSE - 29 Novembre au 1er Décembre 2023

Statut/ conflit d'intérêt : Absence de conflit d'intérêt

Alloimmunisation foeto-maternelle anti plaquettaire - FNAIT

Généralités

- **1/800 à 1/1000 naissances vivantes (?), cause la plus fréquente de thrombopénie sévère et d'HIC chez le nouveau-né à terme**
- **Thrombopénie découverte fortuitement → HIC**



- **Importance du laboratoire spécialisé pour faire l'exploration**
  - **guide la prise en charge spécifique du NN**
  - **définit la prise en charge des grossesses suivantes**

Méthodes d'exploration en Immunologie Plaquettaire

➢ **Pour la recherche d'anticorps anti-plaquette:**

- Anticorps anti-plaquette fixés

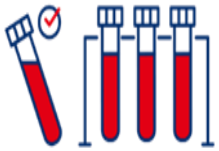
- Anticorps anti plaquette circulants

- **Immunofluorescence: PIFT indirect, CMF**
- **MAIPA (maison* ou ApDia*), ELISA* (Immucor), Luminex* (Immucor)**

➢ **Pour le typage plaquettaire (techniques « maison »* ou commerciales*)**

- **En Biologie Moléculaire (génotypage) :**
  - **PCR-SSP****
  - **PCR temps réel ****
  - **BioArray***
  - **Séquençage***
- **En sérologie (phénotypage) HPA-1, HPA-3, HPA-5, (et CD36) : via des sérums de sujets immunisés et des anticorps monoclonaux**
  - **Immunofluorescence (microscope, CMF)**
  - **MAIPA**

FNAIT : Diagnostique Biologique



MERE +++
Test direct
Ac sérique anti-HPA
Typage HPA

PERE
Typage HPA

NOUVEAU-NE
Typage HPA

Crossmatch
Sérum de la mère vs plaq du père

- **Il est recommandé d'avoir plusieurs techniques disponibles au laboratoire, que ce soit pour la recherche d'anticorps ou pour le typage plaquettaire**
- **Pour des raisons pratiques, la plupart des laboratoires réalise le génotypage plaquettaire, et pas de phénotypage plaquettaire, alors qu'il peut exister des discordances.**

➡ **Or ces résultats sont déterminants pour la prise en charge des grossesses ultérieures**

Exemples de discordances dans la littérature (1)

1/ Exemple d'allèle « silencieux »

2007 ➡

Severe fetomaternal alloimmune thrombocytopenia due to anti–human platelet antigen (HPA)–1a in a mother with a rare and silenced *ITGB3*0101* (GPIIIa) allele

G. A. Smith,[1] A. Rankin,[2] C. Riddle,[1] C. Cheetham–Wilkinson,[1] E. Ranasinghe,[1] W. H. Ouwehand[1,2] & N. A. Watkins[1,2]
[1]*Platelet Immunology Reference Laboratory, National Health Service Blood and Transplant, Cambridge, UK*
[2]*Department of Haematology, University of Cambridge, Cambridge, UK*

Vox Sanguinis (2007) **93**, 325–330

- **TNN sévère (8 G/L + pétéchies) et allo anti HPA-1a chez la mère**
- **Génotypage de la mère (PCR SSP* et PCR temps réel Taqman*): HPA-1a1b**
- **Phénotypage (CMF) : HPA-1a NEG**
- **Séquençage des 15 exons du gène ITGB3**
  - **confirme hétérozygotie HPA-1a1b**
  - **+ Insertion d'une Adénosine (1410) ➡ codon stop prématuré en position 471 ➡ perte du domaine TM de la GPIIIa/β3integrin**

Mauvaise idée = rechercher les anticorps maternels seulement si incompatibilité de groupe HPA en génotypage = Risque de passer à coté d'une AIMF

Exemples de discordances dans la littérature (2)

2/ Exemple d'allèle non amplifié par certaines techniques de BM

2010 →

New mutation in the β_3-integrin (GPIIIa) gene inducing HPA-1 genotyping discrepancies

Gerald Bertrand, PhD
e-mail: gbertrand@ints.fr
Cecile Kaplan, MD, PhD
Platelet Immunology Unit
INTS
Paris
Anne Kennel, MD
Pascale Perrier, MD
Histocompatibility Unit

Volume 50, July 2010 TRANSFUSION

<u>Contexte</u> : Discordance de typage HPA-1 maternel (TNN)

PCR-SSP «Maison » Labo 1 (antériorité)	PCR-SSP Kit Innotrain Labo 2	PCR-SSP « Maison » Labo 3	Phénot.	Séquençage Labo 3	
HPA-1a1b	HPA-1b1b	IND (trace de bande HPA-1a?)	HPA-1a POS	HPA-1a1b	+ mutation empêchant la fixation des primers anti sens de la PCR-SSP des labo 2 et labo 3

Exemples de discordances dans la littérature (3)

3/ Exemple d'allèle non amplifié par certaines techniques de BM

2013 →

HPA-5 typing discrepancy reveals an Ile503Leu substitution in platelet GPIa (α_2 integrin)

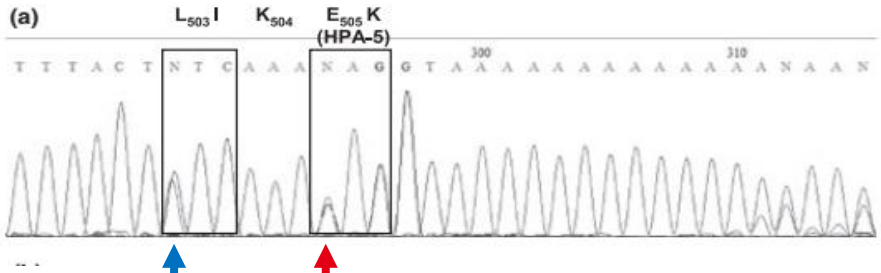
G. Bertrand, V. Jallu, T. Beranger, F. Bianchi, C. Casale, V. Dufour, C. Chenet, J. Quesne, C. Martageix & C. Kaplan
Platelet Immunology Unit, INTS, Paris, France

Vox Sanguinis (2013) 105, 73–76

<u>Contexte</u> : Discordance de typage HPA-5 maternel (TNN)

	Genotype			
	BeadChips	PCR -SSP	PCR -RFLP	Sequencing
Mother	HPA-5aa	HPA-5a (weak b)	HPA-5ab	HPA-5ab
Father	HPA-5aa	HPA-5aa	HPA-5aa	HPA-5aa
Newborn	HPA-5aa	HPA-5a (weak b)	HPA-5ab	HPA-5ab

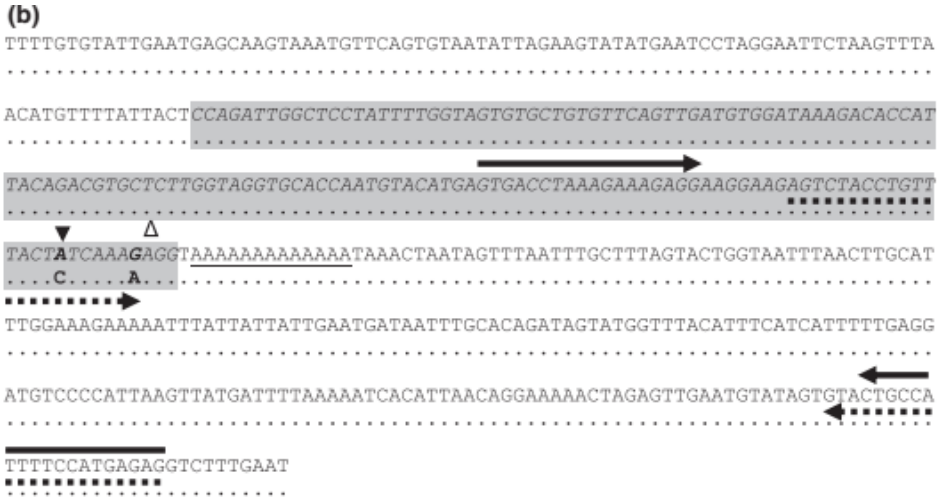
	Phenotype
	MAIPA
Mother	HPA-5b (+)
Father	HPA-5b (–)
Newborn	nd



Mutation 1594 A>C

Polymorphisme HPA-5 1600 G>A

Exon 13 du gène de la GPIa



D'après

G. Bertrand, V. Jallu, T. Beranger, F. Bianchi, C. Casale, V. Dufour, C. Chenet, J. Quesne, C. Martageix & C. Kaplan

Platelet Immunology Unit, INTS, Paris, France

Cas de discordances au laboratoire HLA-ILP de Créteil 2019-2023

1/ Allèle HPA-5b non amplifié et/ou non détecté (mutation 1594 A>C conduisant à la substitution Ile503Leu)

- **Au laboratoire de Créteil entre 2019 et 2023**
  - **4 dossiers de TNN (6 individus) en 5 ans**

Dossier	individu	PCR Taqman	PCR Bioarray	Phéno	Séquençage (EFS Rennes)	
TNN 1	Mère	HPA-5 IND	HPA-5aa	HPA-5b POS	HPA-5a5b	+ mutation 1594 A>C HTZ
TNN 2	Mère	HPA-5 IND	HPA-5aa	HPA-5b POS	HPA-5a5b	+ mutation 1594 A>C HTZ
TNN 3	Père	HPA-5 IND	HPA-5aa	NT	HPA-5a5b	+mutation 1594 A>C HTZ
	Enfant	HPA-5 IND	HPA-5aa	NT	HPA-5a5b	+mutation 1594 A>C HTZ
TNN 4	Mère	HPA-5 IND	HPA-5aa	HPA-5b POS	HPA-5a5b	+mutation 1594 A>C HTZ
	Enfant	HPA-5 IND	HPA-5aa	NT	HPA-5a5b	+ mutation 1594 A>C HTZ

Cas de discordances au laboratoire HLA-ILP de Créteil en 2023

1/ Allèle silencieux codant HPA-1a ?

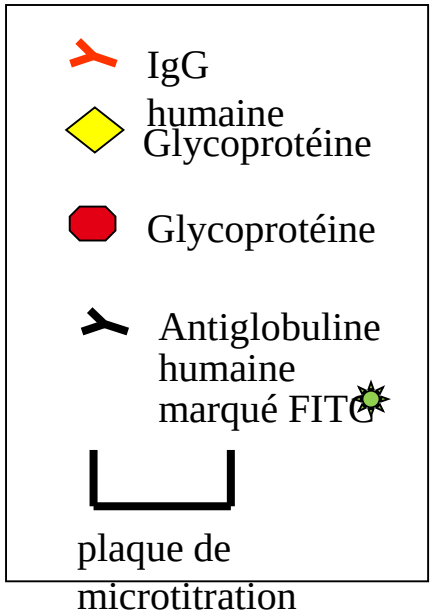
- **Femme 37 ans avec anti HPA-1a de découverte fortuite (exploration thrombopénie)**
- **Génotypage**
  - **Taqman : HPA-1a1b**
  - **Bioarray: HPA-1a1b**
- **Phénotypage HPA-1 non interprétable car auto anticorps anti GpIIbIIIa fixés**
- **Séquençage (CNRHP) : HPA-1a1b + Séquençage du gène ITGB3 en cours**

2/ Allèle silencieux codant HPA-5a ?

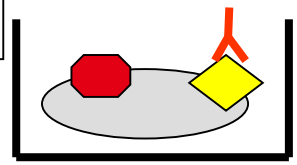
- **Femme 33 ans enceinte, découverte d'un anti HPA-5a**
- **Génotypage**
  - **Taqman : HPA-5a5b**
  - **Bioarray: HPA-5a5b**
- **Phénotypage: HPA-5a NEG**
- **Séquençage du gène de la GpIaIIa (CNRHP) : HPA-5a5b + mutation ponctuelle d'un site d'épissage avec perte du site accepteur**

INTERET DU PHENOTYPAGE (HPA-1, HPA-3 et HPA,5)

Phénotypage plaquettaire par Immunofluorescence

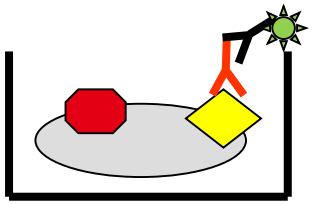


1



Incubation des plaquettes du patient à phénotyper + un sérum de patient immunisé connu (« qualifié réactif ») contenant des anticorps anti-HPA X d'intérêt

2



Ajout d'une antiglobuline humaine marquée au FITC

3

Lecture de la fluorescence au microscope

Témoins			HPA1-a (PIA1)			HPA3-a (Baka)			HPA5-a (Brb)			HPA5-b (Bra)		
T. Neg			Serum Mba (5µl)			Serum Pen (5µl)			Serum Rui 10µl			Serum Alv 5µl		
T. Pos			plasma X anti HPA-1a (10µl)			Serum Pen (10µ)			Serum Rui 25µl			Serum Bal 5µl		
T. auto												Serum Mar 5µl		

Technicien : **Date :**

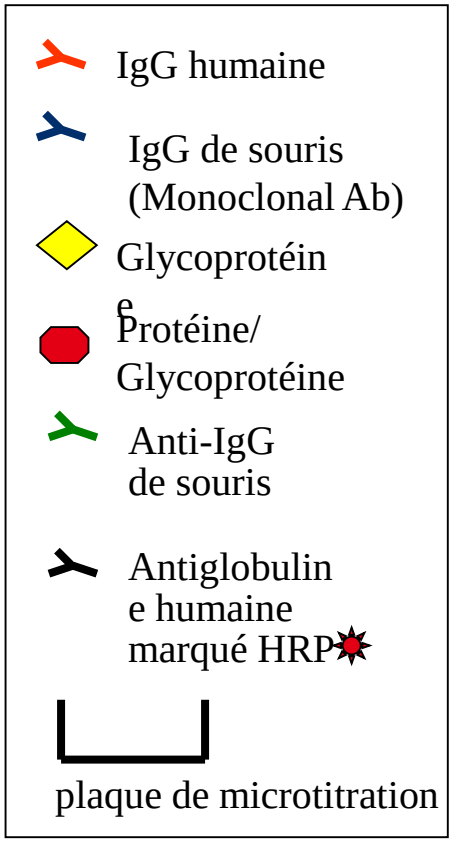
Saisie 1 :
Saisie 2 + VT :

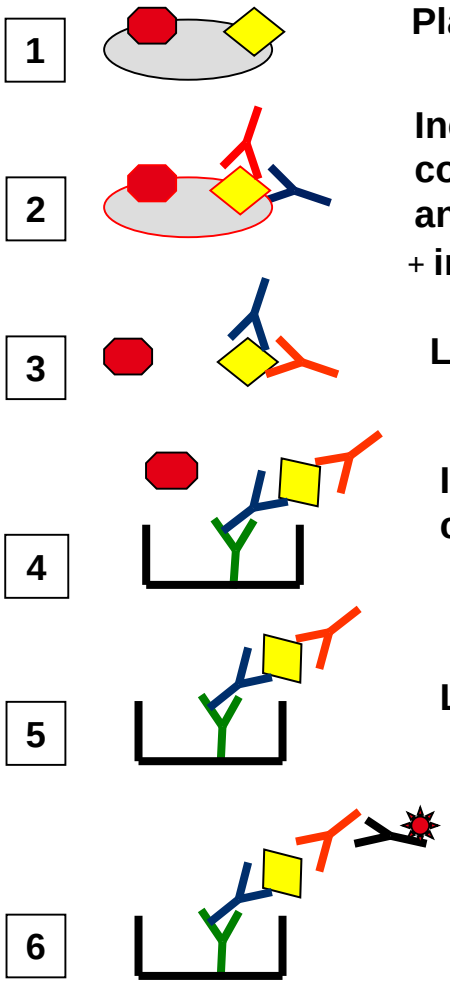
CONCLUSION :

HPA1a	HPA3a	HPA5a	HPA5b

cls.santé.fr

Phénotypage plaquettaire HPA-1, -3, -5 par technique MAIPA





Plaquettes du patient à phénotyper

Incubation avec un sérum connu contenant des anticorps polyclonaux anti-HPAX (« qualifié réactif »)
+ incubation avec anticorps monoclonal

Lavages -Lyse

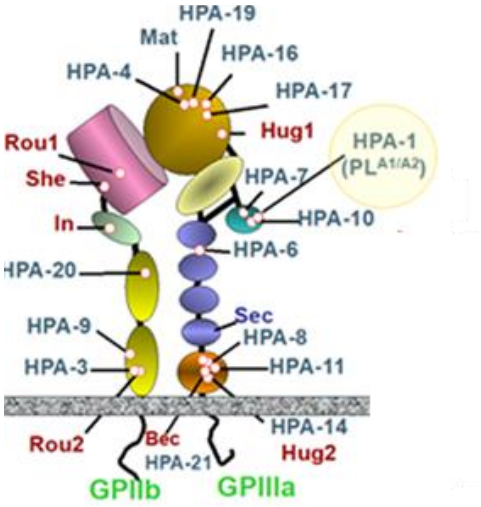
Immobilisation sur une plaque coatée avec Ig de chèvre anti-souris

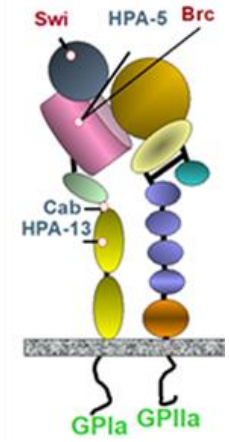
Lavages

Ajout de l'antiglobuline humaine HRP, révélation et lecture de DO au spectrophotomètre

Phénotypage plaquettaire HPA-1, -3, -5 par technique MAIPA

Témoins plaque		Phénotypage HPA-1a		Phénotypage HPA-1b		Phénotypage HPA-3a		Phénotypage HPA-5a		Phénotypage HPA-5b	
T. Neg		Plq patient+ sérum NEG + ACM anti IIbIIIa				Plq patient+ sérum NEG + ACM anti IIbIIIa		Plq patient+ sérum NEG + ACM anti IaIIa			
T. Pos IIbIIIa		Plq HPA-1a+ + sérum anti HPA-1a + ACM anti IIbIIIa		Plq HPA-1b+ + sérum anti HPA-1b + ACM anti IIbIIIa +		Plq HPA-3a+ + sérum anti HPA-3a + ACM anti IIbIIIa		Plq HPA-5a+ + serum anti HPA-5a + ACM anti IaIIa		Plq HPA-5b+ + sérum anti HPA-5b + ACM anti IaIIa	
T. Pos IaIIa		Plq patient+ sérum anti HPA-1a + ACM anti IIbIIIa		Plq patient+ sérum anti HPA-1b + ACM anti IIbIIIa		Plq patient + sérum anti HPA-3a + ACM anti IIbIIIa		Plq patient+ serum anti HPA-5a + ACM anti IaIIa		Plq patient + sérum anti HPA-5b + ACM anti IaIIa	





Phénotypage plaquettaire CD36 par technique IF + MAIPA

N° de prélèvement (étiquette)

PAR SÉROLOGIE IMMUNOFLUORESCENCE INDIRECTE/MAIPA – Phénotypage CD36

NOM : **PRENOM :** **Cellule n°** **Groupe ABO**

Date de naissance : ……. /……../…… **Sexe** **F** ☐ **M** ☐

Date de prélèvement : …….. **Date de réception :** ……

	Typage CD36 par IF Tech: …….. Date ……		
	Témoin positif de la série	Témoin négatif de cellules	Test
N° suspension	(plaquettes CD36+)	(plaquettes du patient)	(plaquettes du patient)
Anticorps marqué FITC	Anti CD36	IgG1 NR	Anti CD36
Résultat			
S1			
S2 + VT			

	Typage CD36 par MAIPA Tech : …….. Test n° …… Du ……			
	Témoin positif de plaque	Témoin négatif de cellules	Témoin positif de cellules	Test
Sérum	CQI Fer (anti CD36)	SAB	CQI anti HLA ApDia	CQI Fer (anti CD36)
Plaquettes (80 millions/puits)	Dépistage pool CD36+	Patient à tester	Patient à tester	Patient à tester
Anticorps monoclonal	Anti CD36 FA6-152, 10µL à 1/10	Anti CD36 FA6-152, 10µL à 1/10	anticorps anti-HLA kit ApDia	Anti CD36 FA6-152, 10µL à 1/10
DO				
Conclusion				

CONCLUSION :

CD36

Validation biologique :

CONCLUSIONS

- **Utilité de plusieurs techniques de typage plaquettaire disponibles**

- 2 techniques de biologie moléculaire dont les primers et/ou les sondes ne se fixent pas au même endroit
- Technique(s) de phénotypage (IF, CMF, MAIPA)

- **Les techniques de phénotypage**

- Techniques simples, mais nécessitent des sérum de patients immunisés anti HPA (ou CD36) (réactifs « maison » d'origine humaine) et des ACM de plusieurs clônes distincts
- Validées et accréditées, faire l'objet d'EEQ / EIL

- **Intéret du phénotypage** Contexte FNAIT ++ (mais aussi toute discordance entre Ac et typage)
  - Phénotypage HPA-1a (mère) en « urgence » si besoins transfusionnel du NN
  - Phénotypages HPA-1a, -3a, -5a;-5b systématiques
  - Phénotypage CD36 en fonction de l'ethnie

- **Llmites du phénotypage**

- Présence d'un auto anticorps fixé sur la GP d'intérêt (faux positifs)
- NN thrombopénique (taux de plaquettes insuffisant , éventuels Ac maternels fixés)

- **Devant les discordances ou ambiguités :**

- Envois d'échantillons à un laboratoire LBMR pour techniques de BM ou phéno complémentaires + discuter envoi pour séquençage (confirmation et/ou exploration)

DE VOTRE ATTENTION

CONTACTS

Laure CROISILLE
laure.croisille @efs.sante.fr
+ 33 (0)1 56 72 76 70

Emilie LETORIELLEC
Emilie.letoriellec@efs.sante.fr
+ 33 (0)1 56 72 76 75