

## LISTE DES ABREVIATIONS

Ac	Anticorps
ADAMTS13	A Desintegrin And Metalloprotease with ThromboSpondin type I motifs
ALAT	Alanine AminoTransférase
AMM	Autorisation de Mise sur le Marché
ASAT	Aspartate AminoTransférase
CH	Centre Hospitalier
CNR	Centre National de Référence
DMSO	Diméthylsulfoxyde
ECBU	Examen Cyto-Bactériologique des Urines
EDTA	Acide Ethylène Diamine Tétraacétique
EP	Echanges Plasmatiques
FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfer
HAS	Haute Autorité de Santé
HPM	Haut Poids Moléculaire
Ig	Immunoglobulines
IRM	Imagerie par Résonance Magnétique
INSERM	Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale
IV	Intra Veineux
LDH	Lactate Déshydrogénase
MAT	MicroAngiopathie Thrombotique
PHRC	Programme Hospitalier de Recherche Clinique
PTT	Purpura Thrombotique Thrombocytopénique
SHU	Syndrome Hémolytique et Urémique
TCA	Temps de Céphaline Activée
THPM	Très Haut Poids Moléculaire
TP	Taux de Prothrombine
TSP-1	Domaine Thrombospondine de type 1
UI	Unité Internationale
VIH	Virus de l'Immunodéficience Humaine
vWF	Facteur von Willebrand

# SOMMAIRE

## 1. INTRODUCTION

- 1.1 Définition de la MAT et du PTT
- 1.2 Historique
- 1.3 Epidémiologie du PTT
- 1.4 Mécanismes du PTT
  - 1.4.1 Le facteur von Willebrand
  - 1.4.2 Les plaquettes
  - 1.4.3 ADAMTS13
  - 1.4.4 Régulation d'ADAMTS13
  - 1.4.5 Classification du PTT
    - 1.4.5.1 Le PTT héréditaire
    - 1.4.5.2 Le PTT idiopathique
    - 1.4.5.3 Le PTT secondaire
  - 1.4.6 Indications du dosage d'ADAMTS13

## 2. PATIENTS ET METHODES

- 2.1 Patients
- 2.2 Méthodes de recueil des données
- 2.3 Méthodes de dosage d'ADAMTS13
  - 2.3.1 Méthode de prélèvement
  - 2.3.2 Technique de dosage
    - 2.3.2.1 Activité d'ADAMTS13
    - 2.3.2.2 Auto-anticorps anti-ADAMTS13
      - 2.3.2.2.1 Détection et titrage des IgG anti-ADAMTS13
      - 2.3.2.2.2 Recherche d'une activité inhibitrice circulante

## 3. RESULTATS

- 3.1 Epidémiologie
- 3.2 Présentation clinique
- 3.3 Présentation biologique
- 3.4 Traitements
  - 3.4.1 Les échanges plasmatiques
  - 3.4.2 Le Rituximab
  - 3.4.3 Les corticoïdes
  - 3.4.4 Le cyclophosphamide

- 3.4.5 Les autres thérapeutiques
- 3.5 Survie des patients
- 3.6 Etude de sous groupes

## 4. DISCUSSION

- 4.1 Epidémiologie
- 4.2 Les rechutes
- 4.3 La mortalité
- 4.4 Les signes cliniques
- 4.5 La biologie
- 4.6 Les traitements
  - 4.6.1 Les échanges plasmatiques
  - 4.6.2 Le Rituximab
  - 4.6.3 Les traitements immunosuppresseurs et la splénectomie
- 4.7 Comparaison avec le référentiel du CNR MAT
  - 4.7.1 Bilan à réaliser au diagnostic
  - 4.7.2 Indications de l'exploration biologique d'ADAMTS13
  - 4.7.3 Prise en charge thérapeutique
- 4.8 Etude de sous-groupes

## 5. CONCLUSION

## 6. BIBLIOGRAPHIE

## 7. ANNEXES

# **INTRODUCTION**

# 1. INTRODUCTION

## 1.1 Définition de la MAT et du PTT

La microangiopathie thrombotique (MAT) regroupe un ensemble de maladies et est définie par la présence dans la microcirculation sanguine (capillaires et artérioles) de lésions non spécifiques de souffrance endothéliale associées à des lésions spécifiques constituées de thrombi plaquettaires riches en facteur von Willebrand (vWF) mais pauvres en fibrine (1). Les MAT sont caractérisées par l'association d'une anémie hémolytique mécanique, d'une thrombopénie périphérique et de lésions thrombotiques des petits vaisseaux, capillaires et artérioles.

Il existe deux formes de MAT, le purpura thrombotique thrombocytopénique (PTT) et le syndrome hémolytique et urémique (SHU). SHU et PTT sont deux maladies distinctes dans leur physiopathologie et dans leur atteinte ; à forme rénale pour le SHU et neurologique pour le PTT. Dans le SHU, une dysrégulation de la voie alterne du complément prédispose au développement de la pathologie. Un agent inducteur toxique, viral ou autre favorise la lésion endothéliale et l'expression du facteur tissulaire, déclenchant les micro-thromboses à prédominance rénale.

Notre travail se concentre exclusivement sur le PTT. Son objectif est, après une revue physiopathologique du PTT, de comparer la prise en charge de 11 patients du centre hospitalier du Mans aux données de la littérature, aussi bien sur le plan clinique, biologique qu'au niveau de la prise en charge thérapeutique.

## 1.2 Historique

En 1924, la première description de PTT est faite par Moschowitz d'une jeune fille de 16 ans, présentant fièvre et troubles neurologiques, anémie et insuffisance rénale. L'issue est fatale en deux semaines et le diagnostic établi à l'autopsie : mise en évidence de thrombi avec dépôts hyalins au niveau des artérioles et des capillaires de la majorité des organes.

En 1936, Baehr décrit quatre cas similaires et avance l'hypothèse du rôle de l'agrégation des plaquettes dans la pathogénie de la maladie.

En 1947, Singer introduit le terme de purpura thrombotique thrombopénique.

En 1966, Amorosi définit la pentade diagnostic du PTT « anémie hémolytique mécanique avec schizocytose, thrombopénie, fièvre, signes neurologiques et insuffisance rénale »(2).

En 1982, Moake, souligne le rôle de l'accumulation de multimères de facteur von Willebrand (vWF) de haut poids moléculaire (HPM) dans le plasma des patients présentant un PTT récidivant (3).

En 1996, Furlan met en évidence le rôle de la métalloprotéase (4). Celle-ci clive le facteur von Willebrand.

En 1998, Furlan démontre que tous les patients atteints d'un PTT ont un déficit sévère de cette protéase. A partir d'une étude de 53 cas de MAT, 30 présentent un PTT avec un déficit modéré ou sévère en protéase du vWF et 23 cas de SHU ont une activité normale de la protéase (5).

En 2001, Zheng définit le terme ADAMTS13 pour A Disintegrin And Metalloprotease with ThromboSpondin type I motifs et décrit la structure et la fonction de celle-ci (6).

En 2005, Kokame met au point une technique de dosage de l'activité d'ADAMTS13 (7).

### **1.3 Epidémiologie du PTT**

Le PTT est une maladie rare dont l'incidence est de 4.5 par million d'individus par an (8). Il survient chez la femme dans 2/3 des cas (9,10) et le pic d'incidence est entre 35 et 45 ans (10).

Dans près de deux tiers des cas et plus particulièrement chez l'adulte, les contextes cliniques comme les infections, les maladies auto-immunes, les néoplasies, certains médicaments (interféron, clopidogrel) ou encore la grossesse (plus précisément le post partum) sont associés lors des diagnostics de PTT et potentiellement impliqués dans le déclenchement de la maladie. En dehors de ces circonstances cliniques, le PTT est défini comme idiopathique (11,12).

## **1.4 Mécanismes du PTT**

### **1.4.1 Le facteur von Willebrand**

Le facteur von Willebrand (vWF) est une glycoprotéine de structure polymère dont le poids moléculaire varie entre 500 kDa et plus de 10 000 kDa, représentant la protéine plasmatique soluble humaine de plus grande taille connue. La protéine la plus petite est le dimère fait de 2 sous-unités identiques contenant 2050 acides aminés. Le nombre maximum de sous-unités est estimé de 50 à 100. Le poids d'une sous-unité est d'environ 270 kDa. Le vWF plaquettaire est constitué uniquement de sous-unités de 225 kDa (13). Le degré de polymérisation dépend de la localisation anatomique du vWF : les multimères de très haut poids moléculaire sont présents dans les plaquettes et les cellules endothéliales, mais pas dans le plasma.

Le vWF est localisé dans le plasma, dans les corps de Weibel-Palade des cellules endothéliales, dans les granules alpha des mégacaryocytes et dans les plaquettes qui en dérivent, ainsi que dans la matrice sous-endothéliale de la paroi vasculaire.

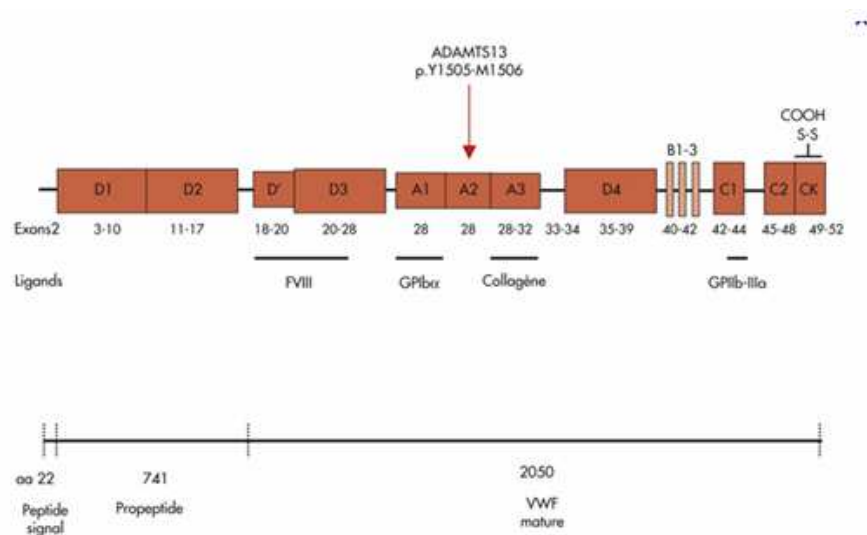
Le gène du vWF se situe sur le chromosome 12p13.2 codant pour une protéine de 2813 acides aminés comprenant un peptide signal de 22 acides aminés, un large propeptide de 741 acides aminés et une molécule de vWF mature constituée de 2050 acides aminés. Le gène du vWF est spécifique et son expression est limitée aux cellules endothéliales et aux mégacaryocytes.

Une des fonctions du vWF est de transporter le facteur VIII dans le plasma, le protégeant des dégradations enzymatiques. Les domaines D' et D3 du vWF sont les sites de liaison au FVIII (14,15).

La maladie de Willebrand, pathologie constitutionnelle de l'hémostase à potentialité hémorragique, est la conséquence d'un défaut génétique dans la concentration, la structure ou la fonction du facteur Willebrand. C'est la maladie constitutionnelle de l'hémostase la plus fréquente. La prévalence de la maladie de Willebrand varie de 0,1 à 1 % selon les études, mais le nombre de patients de tous types présentant une symptomatologie hémorragique faisant appel à un traitement spécifique a été estimé entre 1/50 000 et 1/8 500 (annexe 1).

On distingue trois grandes catégories de maladie de Willebrand :

- le type 1 est un déficit quantitatif partiel.
- le type 2 est un défaut qualitatif qui est subdivisé en quatre catégories.
- le type 3 est une absence complète de vWF.



**Figure 1** : Structure du facteur von Willebrand.

Le vWF est une glycoprotéine indispensable à l'hémostase primaire comme médiateur principal de l'adhésion des plaquettes au sous-endothélium altéré après une brèche vasculaire. Le vWF du sous endothélium se fixe sur la glycoprotéine Ib (GPIb) au sein du complexe GPIb-V-IX présent sur les plaquettes. La liaison du vWF à la GPIb permet de ralentir le mouvement des plaquettes à la surface de la lésion vasculaire et déclenche l'activation des plaquettes, et entre autres, de la glycoprotéine GPIIbIIIa. Une fois activée, elle permet à son tour la liaison irréversible du vWF aux plaquettes. L'agrégation aboutit à la formation d'un clou plaquettaire dit « thrombus blanc ».

Le vWF est synthétisé par les plaquettes et les cellules endothéliales à partir desquelles il est sécrété dans le plasma sous la forme de multimères de différentes tailles (les bas poids moléculaire, les poids moléculaire intermédiaires et les hauts poids moléculaire). Dans les compartiments cellulaires, il existe en plus des multimères de très hauts PM (THPM) du vWF qui ne sont pas retrouvés dans le plasma dans les conditions physiologiques.



La structure multimérique du vWF lui permet d'avoir un plus grand pouvoir adhésif vis-à-vis des plaquettes. En effet, les multimères de poids moléculaire supérieurs aux multimères de haut poids moléculaire (HPM) ont une plus forte capacité adhésive et sont les plus efficaces pour la formation du thrombus plaquettaire.

Pour réguler la formation du clou plaquettaire, la taille des multimères de vWF circulant dans le plasma est limitée grâce à l'action d'une métalloprotéase spécifique, ADAMTS13, qui clive les multimères de THPM présents dans les compartiments cellulaires en fragments de plus petite taille de moindre pouvoir adhésif.

### 1.4.2 Les plaquettes

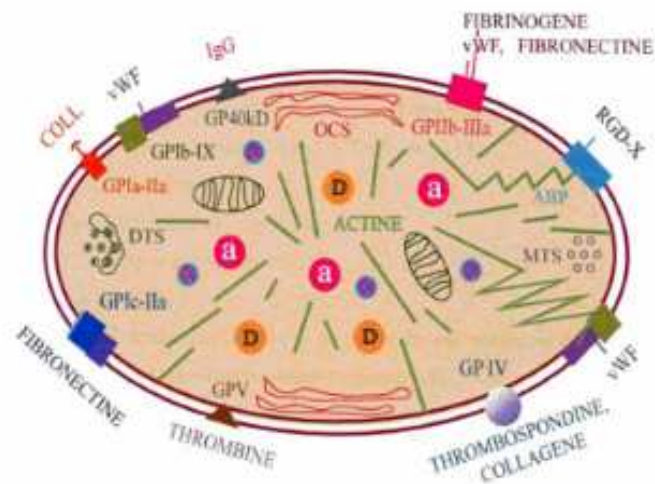
Les plaquettes sanguines sont des cellules anuclées discoïdes provenant de la fragmentation du cytoplasme des mégacaryocytes (2000 à 5000 plaquettes par mégacaryocytes) d'une durée de vie de 7 à 10 jours. Les plaquettes vieilles sont éliminées par les macrophages du système réticulo-histiocytaire de la moelle osseuse mais également de la rate et du foie. Elles possèdent un cytosquelette ainsi que des granules  $\alpha$  (alpha) et granules denses intracytoplasmiques ainsi que des récepteurs membranaires.

Leur fonction principale est leur implication dans l'hémostase primaire mais également dans la coagulation.

Parmi les glycoprotéines membranaires médiant l'adhésion des plaquettes à la matrice extra-cellulaire, les complexes Ib-IX-V et IIb-IIIa sont les représentants majeurs.

La GP I (CD42b) interagit avec la GP IX en formant un complexe qui fixe le vWF collé au sous endothélium, aboutissant à l'adhésion stable de la plaquette. Il existe environ 25000 complexes Ib-IX par plaquette. La GP Ib est connectée au cytosquelette : la formation du complexe Ib-IX-vWF active l'actin binding protein, ce qui débute la polymérisation de l'actine induisant l'activation de la plaquette.

Les GP IIb (CD41) et GP IIIa (CD61) forment le complexe majeur (CD41a) de la membrane plaquettaire (environ 50 000 à la surface de chaque plaquette). Membres de la famille des intégrines, elles vont pouvoir se lier au fibrinogène, mais aussi au vWF et à d'autres molécules (fibronectine, thrombospondine) formant un agrégat plaquettaire.



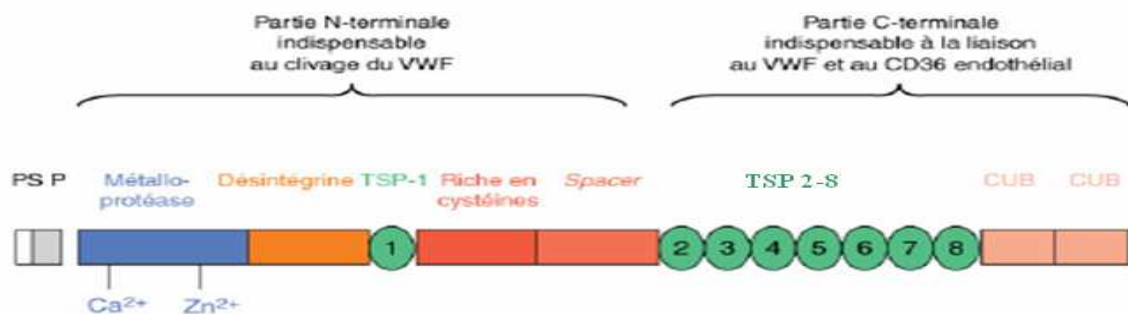
**Figure 2 :** Structure et récepteurs des plaquettes

### 1.4.3 ADAMTS13

En 1996, ADAMTS13 a été purifiée à partir du plasma humain (16,17).

En 2001, sa structure et son gène ont été identifiés (6,18). ADAMTS13 est une métalloprotéase de la famille ADAMTS (19), synthétisée par le foie et sécrétée dans le plasma.

Le gène codant ADAMTS13 (*ADAMTS13*) est localisé sur le chromosome 9q34 et s'étend sur 37 kb incluant 29 exons.



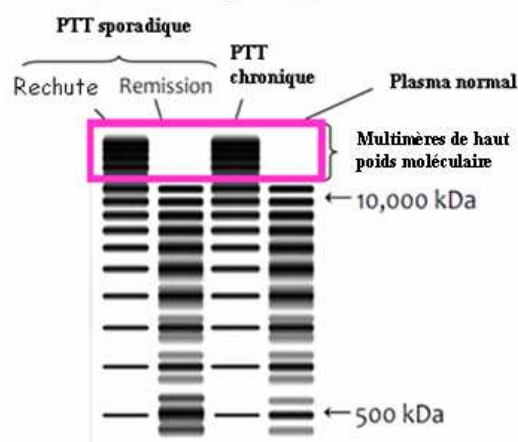
**Figure 3 :** Domaines structuraux et fonctionnels d'ADAMTS13.

La pré-pro-ADAMTS13 est une mono chaîne de 1 427 acides aminés (aa). Elle comprend un peptide signal (33 aa) et un propeptide (41 aa). Après clivage du propeptide, la forme mature d'ADAMTS13 comprend un domaine métalloprotéase, un domaine de type désintégrine, un domaine thrombospondine de type 1 (TSP-1), un domaine riche en cystéines

contenant une séquence RGDS potentiellement impliquée dans des interactions avec des intégrines, un domaine de type ADAMTS « *spacer* ». L'arrangement séquentiel spécifique de ces précédents domaines définit les protéines de la famille ADAMTS. Les membres de la famille ADAMTS comprennent une combinaison propre de domaines TSP-1 additionnels et d'autres motifs C-terminaux. Après son domaine *spacer*, ADAMTS13 contient sept autres domaines TSP-1 et deux domaines CUB. Ces deux types de domaines pourraient permettre à ADAMTS13 de se fixer *in vivo* aux cellules endothéliales (le CD36 endothélial est un récepteur candidat) ou aux plaquettes par son extrémité C-terminale, cet ancrage cellulaire pouvant alors être un prérequis à son interaction avec le vWF(20).

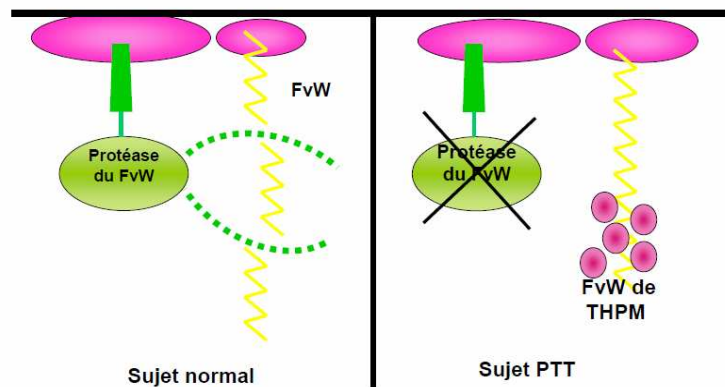
La fonction actuellement connue d'ADAMTS13 est de cliver spécifiquement le vWF. Le domaine métalloprotéase (site catalytique) et les domaines « riche en cystéines » et « *spacer* » d'ADAMTS13 sont indispensables à son activité enzymatique *in vitro* (21,22). La métalloprotéase ADAMTS 13 va cliver le vWF au niveau de la liaison Tyr1605-Met1606 du domaine A2.

*In vitro*, ADAMTS13 en conditions statiques, n'a pas la capacité de se lier au vWF. Un traitement du substrat préalable par des contraintes de cisaillement élevées ou par des agents dénaturants (l'urée ou l'hydrochlorure de guanidine) est nécessaire à la liaison. Ces conditions provoquent une modification de conformation du site de liaison du vWF à ADAMTS13 nécessaire à la liaison du substrat à son enzyme *in vitro*. Son activité enzymatique est potentialisée par les cations divalents (en particulier le Ca<sup>2+</sup>) et par un pH optimal compris entre 8 et 9 ; elle est bloquée en présence d'EDTA.



**Figure 4** : Blots de la migration des multimères de vWF dans différentes conditions cliniques.

In vivo, la liaison entre le vWF et ADAMTS13 est forte, en condition hémodynamique. Plusieurs études dirigées par Bernardo, Tao et Zhang confirment le rôle prédominant et coopératif des domaines TSP-1 2-8 et CUB dans la reconnaissance du substrat. Les domaines TSP-1 et CUB permettraient à ADAMTS13 de se fixer in vivo aux cellules endothéliales grâce au CD36 endothélial ou aux plaquettes par son extrémité C-terminale, cet ancrage cellulaire pouvant alors être un prérequis à son interaction avec le vWF (23–25).



**Figure 5** : Rôle de la protéase du vWF.

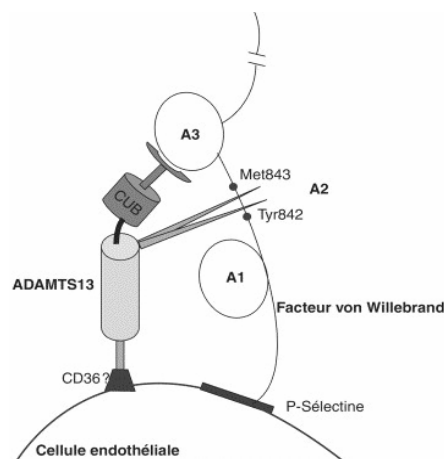
In vivo, en conditions de flux, les domaines A1, A2 et A3 du vWF se lient à ADAMTS13, mais seul le domaine A2 semble contenir des petites séquences (pont peptidique Tyr1605-Met1606 du domaine A2) plus spécifiquement impliquées dans cette liaison. Tous les domaines d'ADAMTS13 sont capables de se lier indépendamment au vWF, mais il existe un phénomène de synergie entre certains domaines d'ADAMTS13 permettant une liaison de haute affinité.

ADAMTS13 est synthétisée dans les cellules stellaires périsinusoïdales (ou cellules de Ito présentes entre les hépatocytes et les cellules endothéliales) du foie, les cellules endothéliales et les cellules de la lignée mégacaryocytaire. Elle est sécrétée dans le plasma sous forme d'une enzyme active.

Sa concentration plasmatique est de l'ordre de 1 µg/ml. Sa demi-vie dans le plasma, comprise entre 2 et 3 jours, est inhabituellement longue pour une protéase (26) ce qui suggère

l'existence, en plus de sa forme soluble plasmatique, d'une forme liée à un récepteur cellulaire et/ou à un transporteur plasmatique qui n'est pas encore identifié.

Des variations ethniques ont été décrites, les sujets noirs ont des taux d'ADAMTS13 plus bas et cela serait dû à leur taux de vWF physiologiquement plus élevé (27). Il existe d'autres variations physiologiques d'ADAMTS13. Aux âges extrêmes de la vie (nouveau-nés et sujets âgés) l'activité d'ADAMTS13 est plus basse de 10-20% par rapport à la population générale. Au cours de la grossesse celle-ci diminue progressivement à partir de 12 semaines d'aménorrhées pour atteindre au terme, des taux inférieurs de 15-20% par rapport à son taux de base.



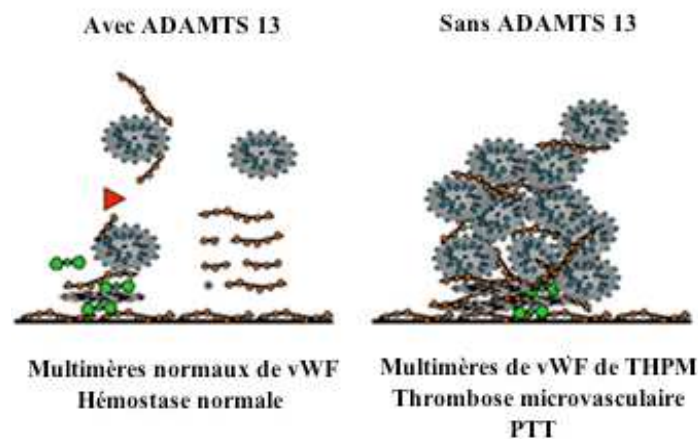
**Figure 6** : Action d'ADAMTS 13 sur le vWF.

#### 1.4.4 Régulation d'ADAMTS13

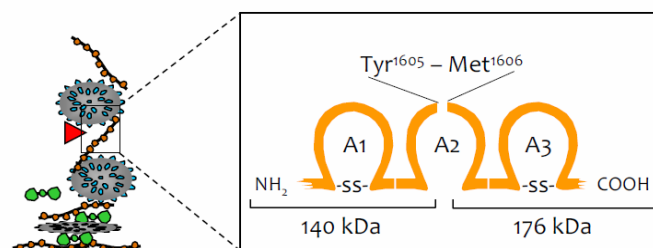
La régulation de l'activité d'ADAMTS13 sur le vWF fait intervenir les propriétés intrinsèques du vWF et les facteurs plasmatiques extérieurs. In vivo, seul le dépliement du vWF induit par les forces de cisaillement élevées du flux sanguin dans les microvaisseaux permet l'exposition du pont peptidique Tyr1605-Met1606 et le rend donc accessible à ADAMTS13. Cet accès est modulé d'une part par la liaison du vWF à des ligands : la P-sélectine intervient dans la fixation du vWF à la surface des cellules endothéliales à la phase initiale de sa sécrétion dans le plasma et d'autre part par la glycoprotéine Ib plaquettaire qui permet la liaison du vWF aux plaquettes au sein du clou plaquettaire formé pour réparer une brèche vasculaire. La liaison du vWF à ces deux ligands faciliterait l'accès du vWF à ADAMTS 13.

Le rôle d'ADAMTS13 dans la régulation de la taille des multimères du vWF est prédominant dès son étape de sécrétion par les cellules endothéliales permettant une limitation immédiate de la taille des multimères avant la mise en circulation du vWF dans le plasma. Cette métalloprotéase permettra aussi la résorption du clou plaquettaire une fois la brèche vasculaire réparée.

Certains facteurs plasmatiques sont capables de modifier l'activité d'ADAMTS13 vis-à-vis du vWF, telle l'hémolyse et certaines cytokines inflammatoires, notamment l'interleukine 6 qui inhibe l'activité protéolytique d'ADAMTS13 par des mécanismes encore inconnus. Il est connu que la thrombine, le facteur Xa, l'élastase leucocytaire et la plasmine sont capables de cliver ADAMTS13 et donc de l'inactiver par dégradation (20).



**Figure 7 :** Conséquence d'un déficit de d'ADAMTS 13. En l'absence d'ADAMTS13, les THPM ne sont pas scindés.



**Figure 8 :** Représentation du domaine de clivage du facteur vWF par ADAMTS 13.

Les hypothèses actuelles du PTT acquis idiopathique sont les suivantes :

- La survenue d'un facteur déclenchant responsable d'une activation endothéliale.
- La présence d'anticorps anti-ADAMTS13, entraîne un déficit en ADAMTS13 et les multimères de vWF ne sont pas dégradés.
- La libération et l'accumulation anormales dans le plasma de multimères de très haut poids moléculaire du VWF.
- Les plaquettes adhèrent aux multimères de vWF de HPM hyper adhésifs responsables de la formation spontanée de thrombi plaquettaires ayant pour conséquence une obstruction des microvaisseaux.
- Ces thrombi entraînent les signes cliniques secondaires aux ischémies d'organe et les signes biologiques (thrombopénie de consommation, anémie hémolytique mécanique due au passage des globules rouges dans des microvaisseaux partiellement occlus).

## **1.4.5 Classification du PTT**

### **1.4.5.1 Le PTT héréditaire**

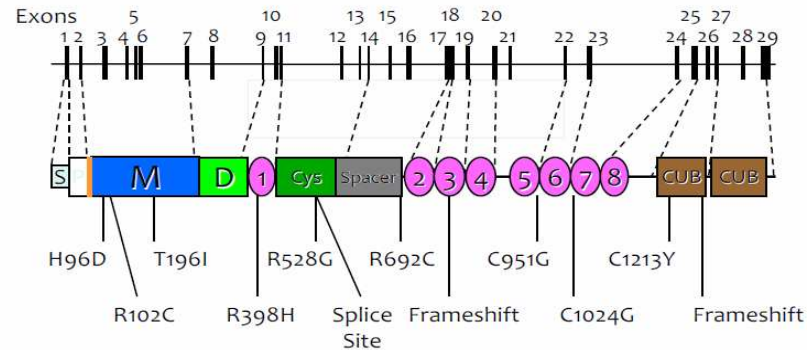
Le PTT héréditaire est dû à une mutation de gène d'ADAMTS13. Une centaine de mutations différentes d'ADAMTS13 sont recensées à ce jour (28). Cette pathologie a une répartition mondiale ubiquitaire cependant il existe peu de mutations communes d'ADAMTS13 entre les différents pays du monde, certaines mutations étant intimement liées à certaines zones géographiques (29).

Les mutations d'ADAMTS13 ont une transmission autosomique récessive, les patients étant le plus souvent hétérozygotes composites ou plus rarement homozygotes (en particulier lorsqu'il existe une consanguinité familiale). Ces mutations sont réparties sur toute la longueur du gène. Il s'agit de mutations faux-sens (substitutions) dans 70 % des cas et de mutations de terminaison (codons stop, anomalies du site d'épissage, insertions, délétions partielles) dans 30 % des cas.

Cette maladie nommée syndrome d'Upshaw-Schulman, est une maladie orpheline gravissime en l'absence de traitement immédiat. Symptomatique dans la moitié des cas dès la naissance, l'évolution est marquée par une alternance de poussées aiguës récurrentes et de rémission complète avec des épisodes de thrombopénie et d'hémolyse chroniques. Dans ce syndrome, il existe un déficit fonctionnel sévère en ADAMTS13 avec un taux plasmatique inférieur à 5 %

Le phénotype clinique est néanmoins hétérogène, allant de rares formes frustes

limitées à une thrombopénie fluctuante jusqu'à des formes gravissimes marquées par des séquelles rénales et neurologiques sévères.



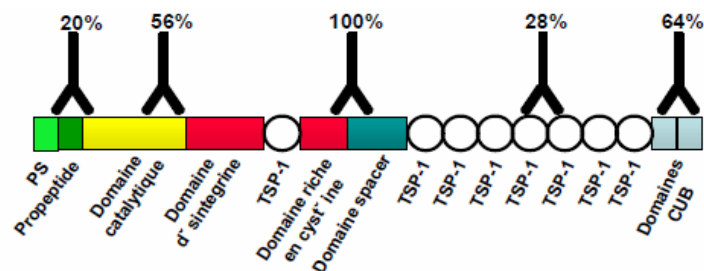
**Figure 9** : Modélisation des mutations du gène ADAMTS13 dans le PTT héréditaire.

### 1.4.5.2 Le PTT idiopathique

Le PTT auto-immun ou idiopathique est dû à des anticorps anti-ADAMTS 13 dirigés contre certains domaines d'ADAMTS13.

Dans 70% des cas, les auto-anticorps anti-ADAMTS13 sont des inhibiteurs circulants (30,31) qui inhibent directement l'activité catalytique d'ADAMTS13.

Une cartographie de ces auto-anticorps avec une fonction inhibitrice démontre que dans 100% des cas, leurs épitopes sont situés au niveau des domaines riches en cystéine et du domaine spacer d'ADAMTS13 (32,33) indispensables à l'activité catalytique (22,34). Ces auto-anticorps interagissent à une fréquence variable avec d'autres domaines d'ADAMTS13.



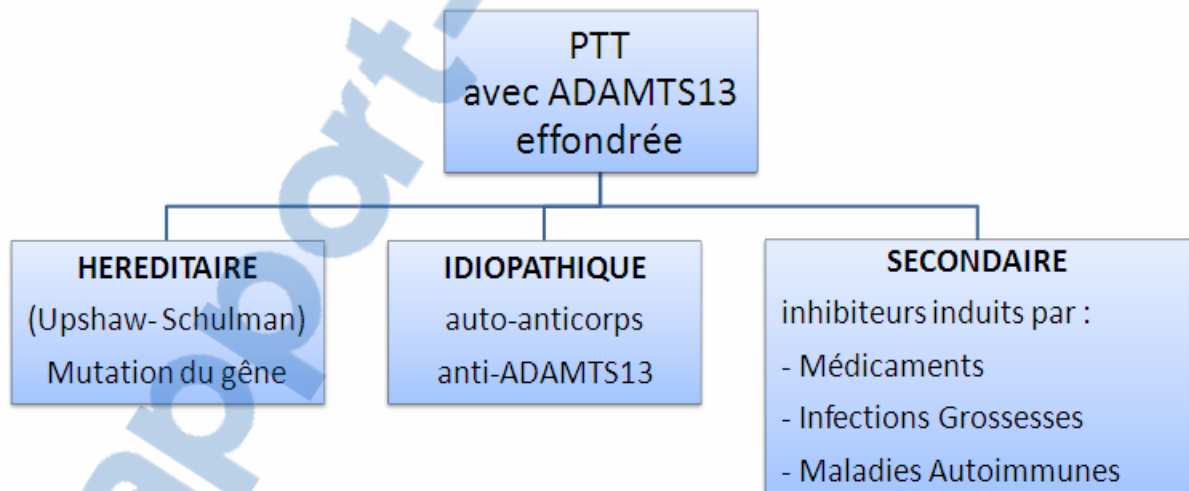
**Figure 10** : Modélisation du PTT auto-immun, fréquence des épitopes des auto-Ac anti-ADAMTS13 inhibiteurs retrouvés dans le PTT.



Dans 30% des cas, les auto-anticorps anti-ADAMTS13 sont non inhibiteurs (35) . Ces Ac ne sont pas détectables fonctionnellement avec des tests de mélange de plasmas puisqu'ils n'inhibent pas l'activité catalytique d'ADAMTS13. Leur mécanisme d'action précis demeure hypothétique même si une opsonisation d'ADAMTS13 induisant une diminution de sa demi-vie dans le plasma est probable par formation de complexes immuns éliminés par le système réticulo-endothélial (36).

### 1.4.5.3 Le PTT secondaire

Le PTT secondaire a des origines plurifactorielles. Certaines pathologies ou thérapeutiques comme la transplantation (37) ou l'allogreffe de moelle (38) peuvent se compliquer de PTT. Tout comme certaines infections (VIH), les néoplasies, les maladies autoimmunes (polyarthrite rhumatoïde, lupus érythémateux systémique, syndrome de Gougerot-Sjögren...), les prises médicamenteuses (cyclosporine A, antiagrégants plaquettaires, quinine..), la grossesse et le post partum sont décrits également comme pouvant être des étiologies de PTT secondaire.



**Figure 11** : Classification des PTT avec ADAMTS 13 effondrée.

### 1.4.6 Indications du dosage d'ADAMTS13

Devant une suspicion clinique de MAT, au diagnostic, il existe une hiérarchie des tests ADAMTS13 qui doit être respectée (29). En première intention, c'est la mesure de l'activité d'ADAMTS13 qui est recommandée et en seconde intention, et uniquement si l'activité d'ADAMTS13 est inférieure à 10 %, la recherche d'auto-anticorps anti-ADAMTS13 par titrage des IgG. En cas de positivité des IgG l'hypothèse d'un PTT acquis auto-immun est hautement probable.

Le dosage de l'activité permet de différencier le PTT du SHU. En 2001, Veyradier publia une étude regroupant 111 cas de MAT affirmant que le déficit en ADAMTS 13 a une sensibilité de 89% et une spécificité de 91% pour classer la MAT en PTT (39).

En cas de négativité des IgG et dans l'état actuel de nos connaissances, l'hypothèse d'un PTT acquis auto-immun ne peut être totalement écartée (autoanticorps de nature non IgG, inhibiteur différent d'une immunoglobuline, opsonisation de tous les autoanticorps sur ADAMTS13 et clairance des complexes immuns formés) et l'hypothèse d'un PTT héréditaire par mutation du gène d'ADAMTS13 doit être envisagée.

En raison de la complexité du séquençage du gène d'ADAMTS13 (séquençage systématique de la totalité des 29 exons du gène et de toutes les jonctions exon-intron), l'exploration génétique d'ADAMTS13 n'est réalisée que si l'activité d'ADAMTS13 persiste inférieure à 10 % en rémission clinique, en l'absence d'auto-anticorps détectable.

# PATIENTS ET METHODES

## 2. PATIENTS ET METHODES

Cette étude rétrospective a pour objectif de comparer la prise en charge d'une pathologie difficile à diagnostiquer et à traiter avec les recommandations en cours qui est le référentiel des microangiopathies thrombotiques réalisé par le centre national de référence des MAT.

### 2.1 Patients

Les patients ont été inclus de manière rétrospective au Centre Hospitalier du Mans entre janvier 2006 et novembre 2012.

La revue des analyses rétrospectives de patients des registres Nord-Américains (12) et l'expérience de plusieurs pays européens (40,41) ont permis de constater que la pentade « anémie hémolytique mécanique avec schizocytose, thrombopénie, fièvre, signes neurologiques et insuffisance rénale » définissant le PTT classique est inconstante et que son expression peut se limiter à la bicytopénie hématologique.

Dans notre étude, ces constatations ont été prises en compte et les critères d'inclusions diagnostiques biologiques ont été limités à l'anémie associée à la thrombopénie.

Les critères d'inclusions étaient les suivants :

- Les patients devaient être hospitalisés entre 2006 et 2012 au CH du Mans.
- Les patients devaient tous avoir une thrombopénie périphérique inférieure à 150 G/L et une anémie avec un taux d'hémoglobine inférieur à 11 g/dL.
- Les patients devaient tous avoir bénéficié d'un dosage de l'activité d'ADAMTS13 avec une activité effondrée inférieure à 10%.

48 patients ont bénéficié d'un dosage de l'activité ADAMTS13 entre janvier 2006 et novembre 2012 au CH du Mans. 11 patients sur 48 avaient une activité effondrée inférieure à 10%, ce sont ces patients qui ont été inclus dans l'étude.

## **2.2 Méthodes de recueil des données**

L'ensemble des dossiers des patients ayant bénéficié d'un dosage de l'activité d'ADAMTS13 sont étudiés afin de recueillir les informations suivantes :

- Données épidémiologiques : date de naissance, âge au diagnostic, origine ethnique.
- Données cliniques : signes neurologiques, rénaux, digestifs, cutanés, généraux.
- Données biologiques au diagnostic : hémoglobine, plaquettes, schizocytes, haptoglobine, créatinine, urée, TP, TCA, fibrinogène, groupe sanguin.
- Données thérapeutiques : échanges plasmatiques, corticoïdes, anti CD20 (Rituximab), autres immunosuppresseurs (cyclophosphamide, vincristine..).
- Données d'évolutivité : les rechutes, la rémission, le décès.

Toutes ces données ont d'une part été comparées à la littérature, et d'autre part au référentiel du CNR MAT. Puis nous avons étudié l'ensemble des données dans un tableau dynamique Excel® dans le but d'obtenir des facteurs prédictifs de l'évolution des PTT et ou d'isoler des sous-groupes de patients.

## **2.3 Méthodes de dosage d'ADAMTS13**

### **2.3.1 Méthode de prélèvement**

Il est réalisé uniquement à partir de plasma citraté (tube citraté trisodique 3.8 molaire) ou de sérum. Les tubes doivent être centrifugés à 2 000-2 500 g pendant 20 minutes dans un délai maximal de 4 heures après le prélèvement sanguin veineux dans une centrifugeuse thermostatée.

L'analyse étant effectuée au laboratoire du Pr Veyradier à l'hôpital Antoine Bécclère à Clamart, le plasma citraté ou le sérum était décanté, réparti en plusieurs aliquots et immédiatement congelés à -20 °C ou -80 °C jusqu'à l'envoi des tubes par acheminement conservant la congélation des prélèvements avec les renseignements cliniques adéquats selon les préconisations du centre spécialisé (annexe 2).

Les limites au dosage sont les suivantes :

- Prélèvement sur tubes contenant de l'EDTA car il inactive totalement l'activité.
- Prélèvement hémolysé rendant le dosage d'activité impossible à réaliser.

## 2.3.2 Technique de dosage

### 2.3.2.1 Activité ADAMTS13

Plusieurs méthodes de mesure de l'activité d'ADAMTS13 ont été développées. Elles sont relativement bien standardisées et leur objectif principal est d'avoir une sensibilité suffisante pour la détection des déficits enzymatiques sévères (taux inférieur à 10 %).

Toutes ces méthodes sont basées sur la dégradation d'un substrat exogène par ADAMTS13 du plasma à tester. Le substrat est soit du vWF natif (molécule entière) purifié à partir de plasma humain ou vWF recombinant, soit se compose de courts peptides synthétiques de vWF qui est un substrat minimal pour ADAMTS13 composé d'une séquence de quelques acides aminés incluant le site de clivage par la métalloprotéase.

Les produits de dégradation du vWF sont mesurés soit par électrophorèse, soit par des techniques de dosages immunologiques (réaction antigène-anticorps).

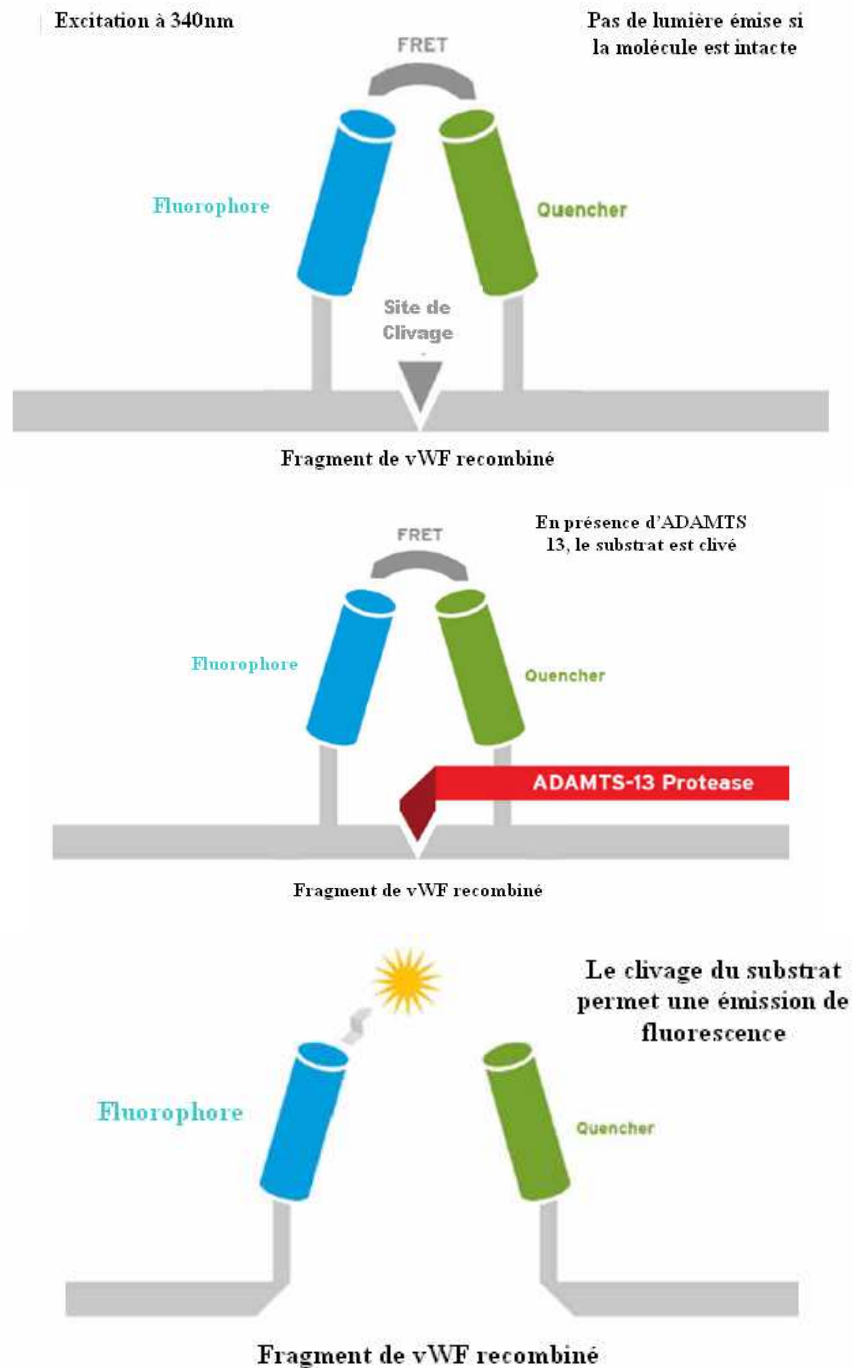
Ces techniques présentent les limites suivantes:

- Les tests sont réalisés en conditions statiques et ne reflètent pas les conditions de flux nécessaires *in vivo* pour l'exposition du vWF dans une conformation optimale à son clivage par ADAMTS13. Ils nécessitent donc l'utilisation d'agents dénaturants (urée-guanidine) pour promouvoir la susceptibilité du vWF au clivage par ADAMTS13.
- Selon le type de substrat utilisé, le temps d'hydrolyse peut varier de quelques heures pour les courts peptides à plusieurs jours pour les molécules entières.

La technique utilisée par le laboratoire INSERM du Pr Veyradier est le FRET-vWF73, peptide court de seulement 73 acides aminés, développé grâce aux travaux de Kokame (7).

Le principe du FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) est le transfert d'énergie entre deux molécules fluorescentes. Le peptide de synthèse de vWF contient un fluorophore de part et d'autre du site de clivage qui émet une fluorescence à 440-450 nm après excitation à 340-350 nm et un absorbeur d'énergie (« quencher ») qui éteint la fluorescence du fluorophore lorsque les 2 molécules sont liées. L'ADAMTS 13 contenu dans le plasma du patient clive le peptide de vWF recombinant libérant 2 molécules. Une fois clivé, le fluorophore ne subira plus l'effet de l'absorbeur d'énergie. La fluorescence détectée par fluorimétrie à 440-450 nm sera donc directement proportionnelle à l'activité de la protéase ADAMTS-13 initialement présente dans l'échantillon.

Les normes de l'activité d'ADAMTS13 se situent entre 50 % et 150 % exprimées par rapport à un mélange de plasmas dont les valeurs sont admises comme normales. Ce pool est réalisé de 30 plasmas de sujets considéré avec une activité égale à 100%.



**Figure 12 :** Principe de dosage de l'activité ADAMTS 13.

La préparation des réactifs consiste pour :

- Le pool : pool de plasma préalablement testé comme un patient, son activité ADAMTS13 doit être à 100% avec un coefficient de variation de 5%. Il sert de témoin normal.
- Le témoin négatif : c'est un patient connu comme déficitaire (<5%) qui sera utilisé comme le témoin malade.
- Le Péfabloc : reconstitution de 1 gramme dans 167mL d'eau distillée, et aliquoté par 200 µl et congelé à -40°C. Il permet d'inhiber toutes les autres métalloprotéases et ainsi de s'affranchir de toutes les réactions parasites.
- La solution tampon : constituée de Bis-Tris (solution tampon commercialisée), de chlorure de calcium et de Tween-20 (détergent).  
La solution finale doit être à un PH à 6.
- Le FRETs-vWF73® : est à reconstituer avec du DMSO (diméthylsulfoxyde) qui est composé d'un solvant polaire organique et d'eau distillée.

La préparation des échantillons consiste en :

- Un traitement par Péfabloc : décongeler les plasmas des patients, un tube de pool à activité 100% et un contrôle négatif. Prélever 95 µl de chaque échantillon auquel on ajoute 5 µl de Péfabloc. Laisser incuber à température ambiante 10 minutes.
- A la préparation de la gamme d'étalonnage en tube à hémolyse : faire la gamme en série :
  - ✓ Pour 100% : 270µl de Tampon Bis-Tris + 30µl de Pool traité au Péfabloc
  - ✓ Pour 75% : 285µl de Tampon Bis-Tris + 15µl de Pool Pur (traité au Péfabloc)
  - ✓ Pour 50% : 150µl de Tampon Bis-Tris + 150µl de la préparation à 100%
  - ✓ Pour 25% : 150µl de Tampon Bis-Tris + 150µl de la préparation à 50%
  - ✓ Pour 12.5% : 150µl de Tampon Bis-Tris + 150µl de la préparation à 25%
  - ✓ Pour 6.25% : 150µl de Tampon Bis-Tris + 150µl de la préparation à 12.5%
- Pour les échantillons : ils sont testés à deux concentrations différentes :
  - ✓ Les échantillons et témoins à 10µl /puits : mélange de 135µl de Tampon Bis-Tris avec 15 µl d'échantillon soit une dilution au 1/10<sup>ème</sup>.
  - ✓ Les échantillons à 5µl /puits : mélange de 285µl de Tampon Bis-Tris avec 15µl d'échantillon soit une dilution au 1/20<sup>ème</sup>.

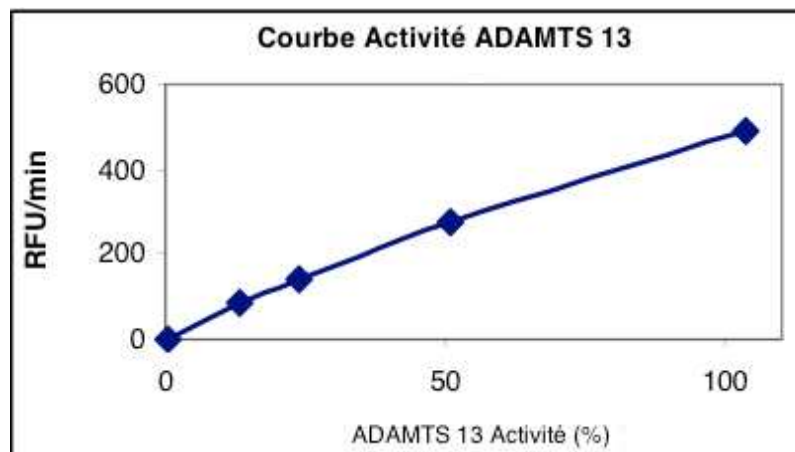


- ✓ Les échantillons à 2.5µl /puits : en cas d'autofluorescence de l'échantillon une dilution supplémentaire est nécessaire avec un mélange de 150µl de Tampon Bis-Tris avec 150µl de la dilution 5µl /puits

Le dosage est réalisé sur des microplaques 96 puits de type NUNC, dans lesquels sont déposés 50µl de chaque dilution selon le plan de plaque : gamme étalonnage, témoin positif, témoin négatif, 2 dilutions des échantillons auxquelles sont ajoutés 50 µl de la dilution au 1/70ème de FRETs-vWF73 dans chaque puits.

Le fluorimètre va effectuer des mesures toutes les 5 minutes pendant 1 heure. L'interprétation pour les valeurs basses (inférieures à 10%) sera réalisée à 60 minutes, à 30 minutes pour les valeurs à 100% et à 15 minutes pour les valeurs supérieures à 100%.

Le résultat final sera donné par la moyenne des résultats des 2 dilutions. La validation biologique est faite sur la courbe de calibration et les témoins.



**Figure 13** : Technique de FRET, dosage d'activité d'ADAMTS 13.

### 2.3.2.2 Auto-anticorps anti-ADAMTS13

Chez les patients atteints de PTT, la réponse auto-immune dirigée contre ADAMTS13 est polyclonale. Deux types d'auto-Ac anti-ADAMTS13 ont été décrits: des Ac « neutralisants » (ou inhibiteurs) qui agissent par inhibition directe du site catalytique d'ADAMTS13, et des Ac « non neutralisants » qui agissent en se complexant à ADAMTS13 et accélèrent ainsi sa clairance. Ces deux mécanismes coexistent très souvent chez les patients atteints de PTT. Les auto-Ac anti-ADAMTS13 peuvent donc être mesurés soit par des méthodes immunologiques soit par des tests fonctionnels.

### 2.3.2.2.1 Détection et titrage des IgG anti-ADAMTS13

La détection et le titrage sont réalisés par méthode ELISA (Enzym Linked ImmunoSorbent Assay) classique. Les microplaques de titration sont coatées par de l'ADAMTS13 recombinante de type sauvage auxquelles sont ajoutées 2 dilutions indépendantes de plasma contenant potentiellement des IgG anti ADAMTS13. La réaction est révélée par un antisérum anti IgG humain couplée à la peroxydase. L'étalonnage est réalisé à l'aide d'un calibrateur fourni par le fabricant et contenant des titres d'IgG variables permettant la validation.

Le kit de détection et de titrage des IgG anti-ADAMTS13 utilisé par le service du Pr Veyradier est le kit TECHNOZYM® distribué par CRYOPEP en France.

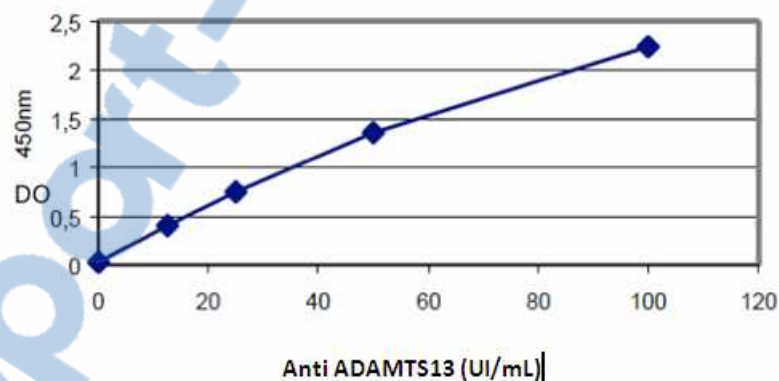
La préparation des réactifs, des contrôles et des échantillons consistent pour :

- Le tampon de lavage : à diluer les 80 ml de tampon dans 920 ml d'eau distillée. Effectuer une homogénéisation soigneuse. Effectuer un amorçage du système et un rinçage des tubulures.
- Les calibrateurs et les contrôles lyophilisés : à reconstituer avec 500 µl d'eau distillée puis attendre 15 minutes avant d'homogénéiser.
- Le tampon d'incubation est prêt à l'emploi.
- Les échantillons : à prélever 5 µl d'échantillon (sérum ou plasma) et diluer dans 500 µl de tampon d'incubation.
- La solution conjuguée (à préparer extemporanément car instable) :
  - ✓ Pour une barrette de 8 puits : 20 µl de conjugué avec 1 ml de tampon d'incubation
  - ✓ Pour une plaque de 96 puits : 240 µl de conjugué avec 12 ml de tampon d'incubation.
- Le substrat est un chromogène TMB (tétraméthylbenzidine) prêt à l'emploi.
- La solution d'arrêt est de l'acide sulfurique 1,9 mol/L prête à l'emploi.

Le mode opératoire consiste :

- Plan de plaque suivant : calibrateurs, contrôles et échantillons à tester.
- Dépôt de 100 µl des calibrateurs, contrôles et échantillons
- Incubation des échantillons : couvrir avec un film adhésif et incuber à température ambiante 1 heure.

- Lavage : faire 3 lavages de 200  $\mu$ l avec le tampon de lavage dilué. Eliminer par tapotement de la plaque l'excédent sur un papier absorbant. Préparer le conjugué pendant le lavage.
- Conjugué : mettre 100  $\mu$ l dans chacun des puits avec une pipette multicanaux. Couvrir avec un film adhésif et incuber 1 heure à température ambiante.
- Lavage : faire 3 lavages de 200  $\mu$ l avec le tampon de lavage dilué. Eliminer par tapotement de la plaque l'excédent sur un papier absorbant.
- Substrat : mettre 100  $\mu$ l de la solution de substrat dans chacun des puits avec une pipette multicanaux. Couvrir avec un film adhésif et laisser incuber a température ambiante pendant 10 minutes.
- Solution d'arrêt : mettre 100  $\mu$ l de solution d'arrêt dans chacun des puits avec une pipette multicanaux.
- Mesure : effectuer la mesure dans les 10 minutes, avec le spectrophotomètre (Dynex®) à la densité optique de 450/620 nm.
- Validation : sur le coefficient de courbe et la valeur des témoins.



**Figure 14** : Exemple de courbe de référence entre la concentration d'anti ADAMTS13 (en UI/mL) et l'absorbance (en nm).

La détection des IgG anti-ADAMTS13 plasmatiques est indépendante de leur caractère fonctionnel : ainsi, les IgG neutralisantes et les IgG non neutralisantes sont toutes deux mesurées par ce test ELISA.

Pour le kit employé dans notre étude le TECHNOZYM® la limite de positivité est de 25 UI/mL.

### **2.3.2.2 Recherche d'une activité inhibitrice circulante**

Actuellement cette technique n'est quasiment plus réalisée car sa durée est de 4 jours. Il s'agit d'une technique complémentaire au dosage de l'activité par vWF Full Length (vWF natif molécule entière) qui n'est faite que dans de rares cas et en raison de sa faible utilisation elle n'est pas développée dans notre travail. Les indications de la technique Full Length restent chez les patients pédiatriques afin de réaliser un contrôle systématique et en cas de discordance avec la présentation clinique ou de problème analytique (autofluorescence par exemple) pour les patients adultes.

La recherche d'activité inhibitrice circulante n'est plus réalisée en raison des résultats du PHRC sur ADAMTS13 qui a démontré qu'un taux d'IgG anti ADAMTS 13 supérieur à 30UI est toujours accompagné d'une activité inhibitrice et que si il n'existe pas d'activité inhibitrice des anticorps la diminution d'ADAMTS 13 est liée aux complexes immuns circulants.

Les anticorps anti ADAMTS13 neutralisants (ou inhibiteurs) sont recherchés par des tests fonctionnels mesurant l'activité résiduelle d'ADAMTS13 d'un mélange de plasma témoin et de plasma testé préchauffé à 56 °C pendant 30 minutes afin de dissocier d'éventuels complexes immuns. Cette recherche d'AIC anti ADAMTS13 est semi-quantitative, peu sensible, et il n'existe pas de consensus quant à l'expression des résultats.

# RESULTATS

## 3. RESULTATS

### 3.1 Epidémiologie

Dans cette étude 11 patients ont été inclus à partir des 48 dossiers de patients ayant bénéficié d'un dosage d'activité ADAMTS 13 au Centre Hospitalier du Mans entre 2006 et 2012. Il y avait 82% femmes et 18% hommes, leur origine ethnique était à 82% caucasienne et à 18% afro-antillaise. La moyenne d'âge au diagnostic est de 48 ans avec des âges extrêmes allant de 24 ans à 87 ans (annexe 3).

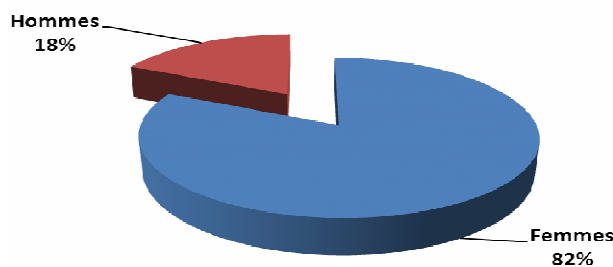


Figure 15 : Répartition hommes-femmes des patients inclus.

### 3.2 Présentation clinique

Bien que la présentation clinique, en accord avec les données de la littérature soit hétérogène il se dégage six catégories principales.

Les signes neurologiques sont ceux que l'on retrouve le plus fréquemment dans près de la moitié des cas (45% soit 5 patients). Ils peuvent être modérés avec des céphalées, une confusion mentale, ou plus sévères et s'exprimer avec des signes focaux et de comitialité ou par un coma.

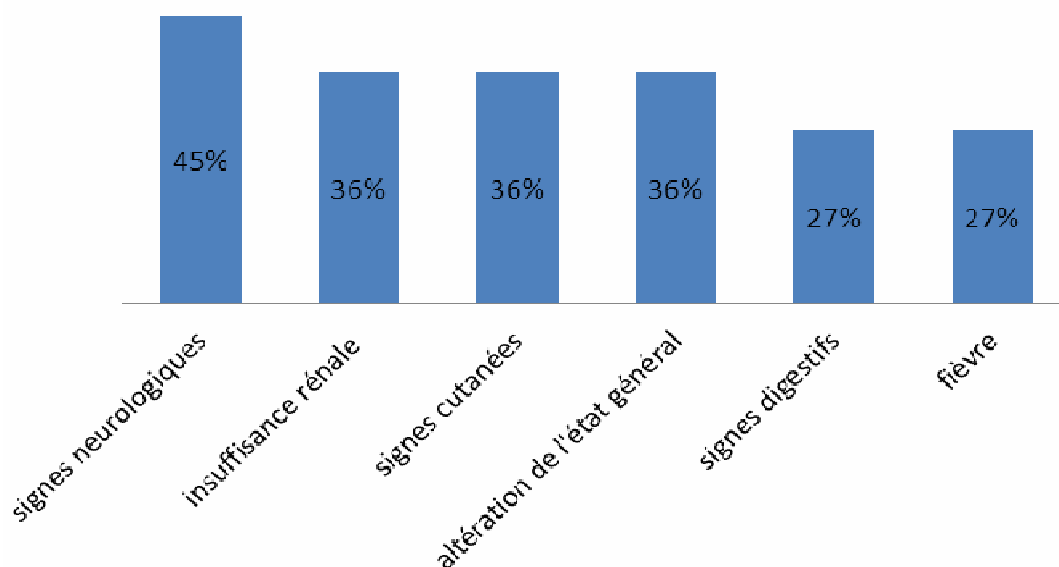
Les signes rénaux sont présents (36% soit 4 patients) mais ne sont pas au premier plan dans la maladie. On retient des signes modérés exprimés par une protéinurie et/ou une insuffisance rénale et des signes sévères comme la défaillance rénale aigue avec anurie.

Les signes cutanés comme le purpura et les ecchymoses sont retrouvés dans 36% (soit 4 patients) et sont associés à la présence d'une thrombopénie profonde.

Les autres signes cliniques sont marqués par les signes d'altération de l'état général (36% soit 4 patients), l'hyperthermie (27% soit 3 patients) et l'atteinte digestive (27% soit 3 patients), généralement conséquence des micro-embols mésentériques exprimés par des douleurs abdominales, des nausées, des vomissements et des diarrhées.

Un terrain d'auto-immunité est noté chez 27% des patients (3/11) inclus à type de lupus, de maladie de Crohn ou de syndrome clinique et biologique des anti-phospholipides.

Les signes cliniques des 11 patients sont répertoriés dans un tableau en annexe 4.



**Figure 16** : Présentation des différents signes cliniques observés.

### 3.3 Présentation biologique

Les patients présentaient une anémie et une thrombopénie avec respectivement une moyenne de 8,4 g/dL d'hémoglobine et de 48 G/L de plaquettes.

Le caractère hémolytique de l'anémie était avéré dans 54% (haptoglobine inférieure à 0,10g/L et taux de LDH supérieur à 250 UI/L, soit 6 patients) et l'origine mécanique de l'anémie, confirmée par la schizocytose (nombre de schizocytes pour 100 hématies, exprimé en pourcentage), présente dans 82% des cas (9/11).

Le dysfonctionnement de la filtration rénale était présent chez 7 patients (63%) avec une moyenne générale de la créatinine à 143  $\mu\text{mol/L}$  et de l'urée à 14  $\mu\text{mol/L}$  pour des normes supérieures respectives à 120  $\mu\text{mol/L}$  et 7,5  $\mu\text{mol/L}$ .

Le bilan d'hémostase ne montrait pas de perturbation majeure avec une moyenne de TP à 87% et une moyenne de TCA allongé à 37 secondes pour un témoin à 30 secondes.

Une cytololyse hépatique était présente chez une patiente seulement avec des ASAT à 2996UI/L et des ALAT à 411UI/L. Les dix autres patients avaient un bilan hépatique normal ou inférieur à 2 fois la normale.

La répartition des groupes sanguins des 11 patients était : 45% de groupe sanguin O, 36% de groupe A, 9% de groupe B et 9% de groupe AB.

Compte tenu des critères d'inclusion, l'ensemble des patients avait une activité ADAMTS13 effondrée (< 10 %). La présence des anticorps IgG anti-ADAMTS 13 est de 63% avec une valeur seuil de positivité à 25UI.

Les données biologiques des 11 patients sont repertoriées dans un tableau en annexe 5.

Analyses	Moyenne	Valeurs extrêmes
Hémoglobine (g/dL)	8,4	[6,8-9,8]
Plaquettes (G/L)	48	[6-126]
Créatinine (µmol/L)	142	[44-507]
Urée (µmol/L)	14	[1,7-39,8]
LDH (UI/L)	1161	[4,25-4632]
TP (%)	86	[50-116]
TCA (secondes)	36	[30-46]
ALAT (UI/L)	72	[15-411]
ASAT (UI/L)	335	[14-2996]

**Tableau I** : Moyennes et valeurs extrêmes des principaux paramètres biologiques pour les 11 patients de l'étude.

Patients	Activité anti ADAMTS 13	IgG anti ADAMTS 13 (N<25)
1	<5%	30 UI
2	<5%	29 UI
3	<5%	148 UI
4	<5%	5 UI
5	10%	20 UI
6	<5%	24 UI
7	<5%	>100 UI
8	<5%	35 UI
9	<5%	40 UI
10	<5%	13 UI
11	<5%	>100 UI

**Tableau II** : Présentation de l'activité ADAMTS13 et du taux IgG anti-ADAMTS13 pour les 11 patients de l'étude.



## 3.4 Traitements

### 3.4.1 Les échanges plasmatiques

Tous les patients inclus dans l'étude ont bénéficié d'échanges plasmatiques (EP), toujours considérés comme le traitement de référence avec un niveau fort de preuve 1.

Les EP consistent dans un premier temps en l'aphérèse. La technique est basée sur la séparation globules rouges – plasma par circulation extra-corporelle avec épuration des anticorps. Les composants à prélever sont séparés par centrifugation ou par filtration et extraits, tandis que les composants non prélevés sont réinjectés au patient. Le circuit extracorporel impose une anticoagulation. La technique par filtration est réalisée au CH du Mans avec la mise en place de 2 cathéters centraux généralement jugulaire et fémoral.

Classiquement, il est recommandé d'épurer une masse plasmatique et demie. Le calcul de cette masse plasmatique est réalisé en appliquant la formule :

$$\text{Poids} \times 70 \text{ mL} \times (1 - \text{hématocrite})$$

Dans un deuxième temps, il est nécessaire sur le plan hémodynamique de compenser un EP. Le consensus est de le faire pour moitié avec de l'albumine à 4 % et pour moitié avec un hydroxyéthylamidon (HEA).

Dans la pathologie du PTT, le produit de substitution doit être du plasma frais congelé (PFC) seul à la posologie de 60mL/kg ou de 40 mL/kg associé à 20 mL/kg d'albumine 4%.

De manière protocolaire, ces EP étaient réalisés tous les jours jusqu'à ce que le taux de plaquettes soit supérieur à 150G/L, puis étaient espacées et arrêtés progressivement tout en surveillant les paramètres d'hémolyse.

Les données de dialyse s'accordent à évaluer à 3, le nombre de plasmaphèreses nécessaires pour diminuer la charge corporelle totale de 70% des IgG. Pour un patient dit « bon répondeur » le taux d'élimination des immunoglobulines par EP est estimé à 95% en 5 jours (10).

Patients	Nombres d'EP lors 1 ère épisode
1	21
2	14
3	11
4	2
5	7
6	5
7	30
8	32
9	10
10	8
11	5
Moyenne	13,2

**Tableau III** : Nombre d'EP par patient lors du premier épisode de PTT.

### **3.4.2 Le Rituximab**

Le traitement par Rituximab a concerné 45% des patients (5/11). En cas de non-réponse aux échanges plasmatiques 5 jours après l'initiation, ce traitement était mis en place associé aux EP.

Le Rituximab est un anticorps monoclonal humanisé dirigé contre l'antigène CD20 des lymphocytes B (42) qui s'administre par voie intraveineuse (IV) à raison de 375mg/m<sup>2</sup> de surface corporelle par perfusion à J1, J4, J8 et J15 de la décision thérapeutique. L'administration de Rituximab permet une déplétion sélective des lymphocytes B en 2 à 3 jours, pour une durée de 6 à 9 mois. La normalisation du taux de lymphocytes B survient en moyenne 12 mois après la dernière perfusion.

Le Rituximab est actuellement très largement utilisé chez des patients atteints de différentes hémopathies lymphoïdes B malignes, mais également au cours d'un grand nombre de maladies autoimmunes. Cependant à la date de réalisation de cette synthèse le Rituximab n'a pas encore l'autorisation de mise sur le marché (AMM) français dans l'indication du PTT et est utilisé dans le PTT dans le cadre d'une situation temporairement acceptable selon la Haute Autorité de Santé (HAS).

### **3.4.3 Les corticoïdes**

Dans notre travail, 4 patients avaient bénéficié d'une corticothérapie à la dose de 1mg/kg/j. Le traitement durait 3 semaines avec décroissance progressive.

La place de la corticothérapie par voie générale associée aux EP est discutée mais possède un niveau de preuve intermédiaire de 2.

Le mécanisme auto-immun et l'efficacité prouvée des corticoïdes à forte dose dans 56% des PTT incitent à proposer une corticothérapie, pour une durée de 3 semaines, avec décroissance progressive, en l'absence de contre-indication telle qu'un sepsis non contrôlé.

Certaines équipes n'utilisent la corticothérapie qu'en cas d'échec des échanges plasmatiques seuls.

### **3.4.4 Le cyclophosphamide**

Le cyclophosphamide avait été introduit chez 18% des patients dans notre travail. Le schéma d'administration était de 6 bolus de 600mg/m<sup>2</sup> avec 2 bolus dans les 15 premiers jours puis tous les mois.

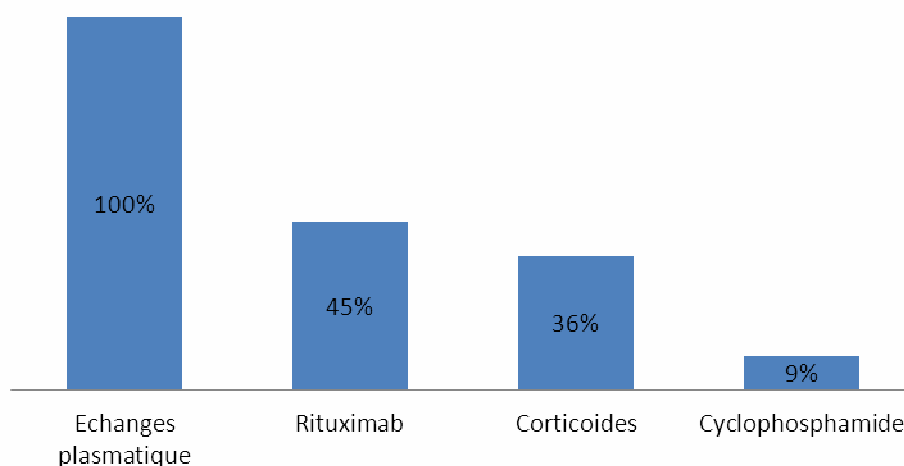
Ce traitement fait partie de la famille des agents alkylants, est une option thérapeutique des PTT réfractaires au traitement de référence. C'est une molécule anticancéreuse utilisée dans le traitement des néoplasies dont le cancer du sein et fait partie des chimiothérapies utilisées en hématologie.

Le niveau de preuve du cyclophosphamide de 4 est faible dans l'indication du PTT.

### 3.4.5 Les autres thérapeutiques

Les immunoglobulines polyvalentes par voie intraveineuse, la vincristine, les antiagrégants plaquettaires ou encore la splénectomie peuvent faire partie de l'ascension thérapeutique des PTT avec des niveaux de preuves d'efficacité faible de 3 à 4.

Dans notre étude aucun des patients n'a eu recours à ces possibilités thérapeutiques.



**Figure 17** : Présentation des différentes thérapeutiques dont ont bénéficié les patients de l'étude.

### 3.5 Evolution clinique des patients

Dans notre étude, il était observé après traitement 18% de rechutes à 6 mois, 27% de décès et 55% de rémission sans rechute.

Les critères de réponse complète sont définis par l'absence de signes neurologiques associés à un taux de plaquettes supérieur à 150G/L pendant 2 jours.

Les critères de rémission durable sont définis par l'absence de signes neurologiques associés à un taux de plaquettes supérieur à 150G/L pendant 30 jours.

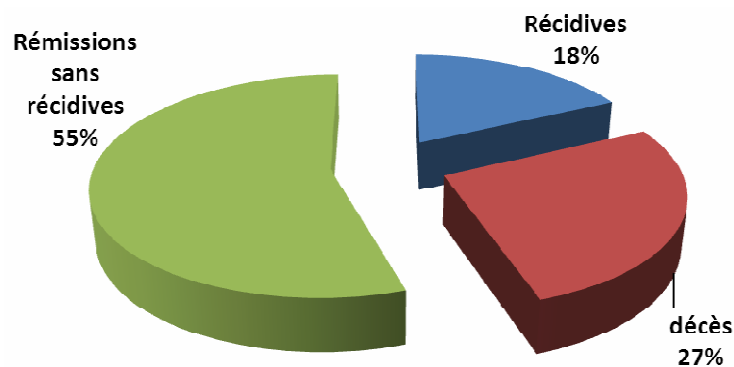
Les rechutes constatées (2/11) sont toutes chez des patients avec un terrain auto-immun présent avant le PTT.

Le nombre de rechutes varie entre 3 et 7 et tous les patients ont bénéficié dans ce cadre d'un traitement par Rituximab.

Les décès surviennent dans la phase aigüe de la maladie et aucune récurrence n'a entraîné de décès.

La réponse sub optimale est définie soit par le PTT réfractaire soit par la réévolutivité précoce.

Le PTT réfractaire est admis lorsqu'il y a absence du doublement des plaquettes et qu'une augmentation des LDH à J4 est constatée. La réévolutivité précoce est suspectée lorsqu'il existe une aggravation neurologique et/ou de la thrombopénie (>100G/L pendant 2 jours et/ou chute des plaquettes de plus d'un tiers du maximum atteint).



**Figure 18** : Répartition des décès, des rechutes et des remissions sans rechutes des patients de l'étude.

### 3.6 Recherche de sous groupes

Nous avons voulu, avec les données recueillies chez nos 11 patients, essayer de mettre en évidence un lien entre un traitement particulier ou avec des critères biologiques particuliers et le succès ou l'échec thérapeutique. Les données ont été exploitées par tableau croisé dynamique Excel® pour comparer les critères biologiques, thérapeutiques et les résultats entre eux.

Les critères « anémie », « thrombopénie », « activité ADAMTS13 effondrée », « taux de LDH augmenté » et « échanges plasmatiques » n'ont pas été intégrés car l'ensemble des patients partageait ces mêmes critères.

On remarque que la totalité des patients décédés avait une insuffisance rénale et un taux d'haptoglobine supérieur à 0,10g/L. Aucun d'entre eux n'a bénéficié de Rituximab alors qu'ils ont tous eu une corticothérapie. Le décès survient lors du premier accès de PTT et non lors de rechutes et les patients ont plus de 70 ans.

La quasi-totalité des patients en rémission avait des anticorps anti-ADAMTS 13 positifs lors du diagnostic, ils avaient tous un taux haptoglobine inférieur à 0,10g/L et un peu plus de la moitié ont bénéficié d'un traitement par Rituximab.

Les mêmes analyses n'ont pas pu être réalisées avec les rechutes du fait du nombre insuffisant de celles-ci (2/11).

Le fait d'avoir des signes neurologiques ne prédisposait pas le fait d'avoir une biologie, une thérapeutique ou une évolutivité particulière.

Il n'est pas observé de décès chez les patients qui ont bénéficié de Rituximab.

# **DISCUSSION**

## 4 DISCUSSION

### 4.1 Epidémiologie

La population de notre étude était constituée majoritairement de femmes à 82% avec une moyenne d'âge de 48 ans (tout sexe confondu) révélant 2 pics d'incidence. Le premier pic entre 25 et 40 ans était exclusivement féminin avec des PTT auto-immuns dans la majorité des cas. Le deuxième entre 60 et 85 ans, exclusivement masculin, n'était constitué que de PTT secondaires. L'hypothèse la plus probable serait que le PTT auto-immun soit préférentiellement une pathologie du sujet jeune alors que les PTT secondaires se rencontreraient chez une population plus âgée présentant des comorbidités.

Dans notre étude, 27% de nos patients présentaient un terrain d'auto-immunité associé ce qui est retrouvé dans une publication de Coppo et Veyradier (43) qui avaient mis en évidence, chez leurs sujets, la présence de signes cliniques évocateurs d'une auto-immunité dans un tiers des cas. La clinique est confirmée dans les deux tiers des cas par la mise en évidence d'auto-anticorps notamment par les anticorps antinucléaires (43). Les pathologies auto-immunes représentent un facteur de risque de développer un PTT (44).

Sur le plan ethnique, une autre particularité de notre travail est la présence de 18% de patients d'origine afro-antillaise, ce qui confirme l'épidémiologie retrouvée dans une étude multicentrique menée en France en 2004 (44). Le risque de présenter un PTT s'accroît avec l'origine afro-antillaise et le sexe féminin.

La population sarthoise étant de 576 000 individus, notre étude sur 6 ans est en accord avec les données de la littérature sur l'incidence de la maladie avec 3,5 cas par millions d'individus par an pour une incidence globale de 4,5 cas par millions d'individus. Il est permis d'évoquer que l'incidence du PTT en Sarthe est identique à celle décrite.

### 4.2 Les rechutes

La rechute est définie par la réapparition des signes neurologiques et/ou de la thrombopénie (inférieure à 100G/L pendant au moins 2 jours) après 30 jours d'une réponse complète.

Dans notre étude, le taux de rechute était en accord avec la littérature. En effet la récurrence d'un épisode a été observée dans 1/3 des cas des PTT idiopathiques (45). Elles surviennent le plus souvent dans la première année suivant l'épisode initial, avec une forte probabilité pour les malades de présenter un épisode plus grave que le premier, ce qui n'a pas été le cas dans notre série (12,46).

Dans la série présentée de 11 patients, composée de 9 femmes et 2 hommes, l'ensemble des rechutes étaient chez les femmes exclusivement.

Les rechutes engendrent une nouvelle hospitalisation avec de nouveau un traitement, avec ses effets secondaires et ses conséquences.

Il paraît important de pouvoir identifier les patients à risques de récurrences afin de mettre en place un suivi rapproché dans le but de prévenir l'épisode de rechute.

Plusieurs études dans la littérature avaient pour objectif principal, la recherche de facteurs de risques de récurrences. A ce jour, aucun facteur épidémiologique ou clinique ne ressort franchement de ces études. Certaines suspectent l'âge jeune, ou le sexe masculin cependant décrit sur des séries avec peu de cas, non confirmés sur des études de plus grande importance (47,48).

Actuellement, le risque de récurrences est apprécié par des paramètres biologiques. Effectivement, les dernières données de la littérature s'accordent à penser qu'un titre élevé d'anticorps anti ADAMTS13 lors de la première poussée, ainsi que la persistance d'une activité ADAMTS13 diminuée lors de la rémission pourraient être prédictifs de rechutes. Cependant aucun seuil (cut off) d'anticorps anti ADAMTS13 ou de taux d'activité ADAMTS13 ne ressort de ces études. C'est davantage la variabilité relative des valeurs (titre-taux) qui a une significativité (36,49,50).

### **4.3 La mortalité**

La mortalité globale dans notre étude comprenant PTT idiopathiques et secondaires est de 27%. Ce chiffre est assez bien corrélé avec la littérature. En effet, en 1991 Rock faisait notion de 20 % (10) et Scully en 2010 de 10% (51). Des études plus récentes, font notion d'une mortalité comprise entre 0 et 10%. On note ainsi une diminution des décès due au PTT avec les prises en charge actuelles. Pour mémoire une étude d'Amorosi regroupant 271 cas de PTT en 1966 évoquait une mortalité de 90% (2).

Parmi les résultats évoqués, l'ensemble des décès constatés sont chez des patients âgés de 70 ans et plus, avec un PTT secondaire et pour un cas dans les suites d'une infection de



cathéter lors des échanges plasmatiques. Kremer Hovinga dans une étude montre que 65% des décès sont en rapport avec le PTT ou les complications des EP (47). Cette analyse a été confortée par une étude en 2006, confirmant ces données et retrouvant 2.4% de décès liés à la technique. Les complications classiques des cathéters veineux sont les infections, les hémorragies et les thromboses.

Dans l'étude rétrospective effectuée, la mortalité des PTT idiopathiques est nulle confirmant le pronostic sombre des PTT secondaires.

Dans les facteurs de risques de mortalité sont décrits notamment le retard diagnostique, le retard d'initiation des EP ou encore une absence de réponse aux EP (10,44,47).

Au niveau des facteurs prédictifs de mortalité sont rapportés les différents éléments suivants, l'âge croissant, en particulier après 60 ans, de graves symptômes neurologiques à la présentation, et un taux de LDH élevé et persistant après deux échanges plasmatiques (45). Ces critères étaient présents chez 2 patients décédés dans notre étude, confirmant la pertinence de ces facteurs prédictifs.

#### **4.4 Les signes cliniques**

Les signes neurologiques observés chez les patients de l'étude étaient présents dans 45% des cas. Ces résultats sont discordants avec les données de la littérature qui placent les signes neurologiques comme principaux symptômes, observés plutôt dans 70% des cas (46). Les signes présents étaient très polymorphes allant de céphalées simples à l'aphasie ou troubles moteurs.

Les signes rénaux et digestifs sont aussi moins notés, décrits respectivement dans 50% (51) et 40% (36,48-50,52) dans la littérature alors que notre étude en révélait respectivement 36% et 27%.

La fièvre, retrouvée à 27 % dans notre étude, est inconstante et varie entre 45% et 86% suivant les études. En effet elle peut être absente si le diagnostic est posé précocement ou être liée à un processus infectieux observé dans le déclenchement du PTT. La fièvre est en aucun cas un signe spécifique du PTT.

Des atteintes cardiaques sont décrites et sont à rechercher lors d'une suspicion de PTT comme l'infarctus du myocarde, des troubles de la repolarisation ou encore une élévation de la troponine. Il existe encore trop peu de données dans la littérature et ces troubles sont sûrement sous-estimés (52,53), alors qu'ils constituent un facteur de mauvais pronostic. Dans

notre étude, une patiente a présenté des douleurs thoraciques avec un sus décalage ST mimant un infarctus du myocarde inférieur pouvant être attribué au PTT (54).

La symptomatologie des PTT apparait très polymorphe, dépendant de la localisation des micro-embols des thrombi plaquettaires dans la microcirculation. Dans notre étude, des infarctus spléniques et des zones d'infarcissement du pôle inférieur d'un rein ont été mis en évidence chez un patient.

#### **4.5 La biologie**

Les anémies étaient moins sévères que dans la littérature avec une moyenne de 8,4g/dL dans notre étude contre 6,8g/dL (51). De même la moyenne des thrombopénies étaient de 48G/L dans notre recueil contre 13G/L (51).

Il n'était pas retrouvé systématiquement le caractère hémolytique et mécanique de l'anémie observés seulement dans respectivement 54% et 82%. Par ailleurs, l'insuffisance rénale n'était objectivée que dans 63% des cas. Ces critères font partie de la description classique du PTT avec la pentade « anémie hémolytique mécanique avec schizocytose, thrombopénie, fièvre, signes neurologiques et insuffisance rénale ». Ceci conforte nos critères d'inclusion, en ne prenant en compte que l'anémie et la thrombopénie et il est permis d'évoquer qu'il n'a pas été exclu de PTT à tort.

Les anticorps anti-ADAMTS13 étaient présents (avec un seuil de positivité à 25UI) dans 64% des cas dans notre étude alors que les publications sont assez unanimes pour une présence de 90% des anticorps lorsque l'activité ADAMTS13 est effondrée (50,52). Cependant les comparaisons sont difficiles d'une étude à l'autre du fait de la multiplicité et de l'évolutivité des techniques de détection des anticorps et des différents seuils de positivité liés à celles-ci.

Il existe une association récurrente entre les IgA et les IgG anti-ADAMTS13. Il est mis en évidence également une meilleure sensibilité des IgM et des IgG anti-ADAMTS13 par rapport à l'activité inhibitrice. Les IgG anti-ADAMTS13 étant prédictifs de la rechute ce sont les seuls isotopes dosés (36).

Les patients avec une activité ADAMTS13 inférieure ou supérieure à 5% ne diffèrent pas en terme de présentation clinique, de la mortalité ou de taux de rechute (45).

Dans notre étude, il est retrouvé une répartition des groupes sanguins compatibles avec la population générale alors que l'on aurait pu penser que les individus de groupe O, ayant un pourcentage de facteur von Willebrand moindre par rapport à la population générale, seraient plus épargnés par le PTT.

Récemment il a été mis en évidence un facteur de susceptibilité de développer un PTT idiopathique chez les Caucasiens associé à l'antigène HLA qui serait le HLA-DRB1\*11. Des travaux sont toutefois encore nécessaires pour affirmer le lien de cause à effet (55).

## **4.6 Les traitements**

La prise en charge et le traitement du PTT, ont évolué avec les différentes avancées de la compréhension de la physiopathologie de la maladie. Ainsi en 1957, la splénectomie était recommandée (54), puis la corticothérapie par prednisone en 1959 (56,57) mais aussi l'ex-sanguinotransfusion la même année (58). En 1977, l'apport de plasma est proposé (59). En 1982, c'est la vincristine (60), puis les échanges plasmatiques en 1991 (10). Depuis 2001, le Rituximab a été évalué avec un excellent taux de réponse (61,62).

### **4.6.1 Les échanges plasmatiques**

Les échanges plasmatiques, traitement de niveau de preuve 1, ont transformé le pronostic de la maladie.

Le plasma transfusé est généralement du plasma viro-inactivé traité par solvant détergent ou du plasma frais congelé sécurisé par quarantaine (issu d'aphérèse ou de sang total). Selon les recommandations du CNR MAT le PFC traité par bleu de méthylène n'a pas été évalué. Son utilisation au CH du Mans a été liée à des difficultés d'approvisionnement en plasma et aucun effet secondaire notamment allergique n'a été déclaré. Le plasma « cryo-déplété » c'est à dire dépourvu de sa fraction cryoprécipitée (particulièrement riche en multimères de HPM de vWF) non utilisé en France, n'a pas fait la preuve de sa supériorité en terme de réponse au traitement avec une mortalité équivalente (63).

L'un des facteurs d'efficacité des EP est l'apport de PFC transfusé contenant de l'ADAMTS13. La courte demi-vie de l'ADAMTS13 de 2 jours est un élément qui détermine le rythme des EP même si ceux-ci sont efficaces en l'absence de déficit sévère (64) et parfois même sans correction du déficit (65).

D'autre part il est évoqué le fait que les EP participent à une épuration partielle des anticorps anti-ADAMTS13 qu'ils aient ou non une activité inhibitrice (66).

Les EP sont plus efficaces que les perfusions de plasma car ils permettent d'apporter une quantité importante d'ADAMTS13 exogène en réduisant les risques de surcharge volémique (5,67,68).

Le nombre médian d'échanges plasmatiques nécessaires à la rémission du patient était de 13.2 EP. La littérature montre que ce nombre varie suivant les études entre 6 et 19 échanges plasmatiques (47,50).

Les EP ne sont pas dénués de risques, mis à part les complications des cathéters citées plus haut, la perfusion de plasma homologue peut donner lieu à des réactions allo-immunes, et la circulation extra corporelle peut amener des variations tensionnelles ou une hypocalcémie (69).

#### **4.6.2 Le Rituximab**

Depuis 2002, l'anticorps monoclonal anti-CD20 (Rituximab), a été proposé avec succès dans les cas de PTT acquis réfractaires (34,70–72).

Le CD 20 est une bonne cible thérapeutique car il est présent sur les lymphocytes B mais absent sur les cellules souches hématopoïétiques et la grande majorité des plasmocytes, ce qui permet de maintenir un taux d'immunoglobulines relativement stable et d'éviter potentiellement certaines infections.

Le Rituximab est habituellement bien toléré, et les effets secondaires sont des phénomènes de réaction immunoallergique avec un syndrome pseudo-grippal (fièvre, frissons, céphalées), des réactions d'hypersensibilité (urticaire, rash, prurit, céphalées, nausées, bronchospasme et défaillance cardio-circulatoire (à type d'hypotension artérielle) d'évolution tout à fait favorable sous traitement symptomatique. A noter, l'administration systématique d'un bolus de solumédrol avant le Rituximab pour prévenir le relargage cytokinique.

Par ailleurs, il ne semble pas être responsable d'une fréquence accrue d'épisodes infectieux, bien que la survenue d'une hypogammaglobulinémie modérée soit décrite. Le fait que le PTT idiopathique de l'adulte représente une maladie autoimmune a incité à évaluer l'intérêt thérapeutique du Rituximab dans cette indication, en particulier dans les PTT caractérisés par des rechutes à répétition (46,72,73).

La tolérance du Rituximab est bonne chez les patients. Son administration permet de réduire la durée de traitement chez les patients répondeurs lents, et de prévenir les rechutes précoces sur une période de un à deux ans, mais il n'est pas décrit de prévention de rechutes au-delà de 2 ans (71). Il permet une remontée plus importante de l'activité d'ADAMTS13 à 3, 6 et 9 mois, alors qu'elle était comparable à celle des patients non traités par Rituximab à 12 mois.

Lors de l'ASH de 2012, les résultats des études encore non publiées de SABRINA et SAWYER ont démontré la non-infériorité de l'injection de Rituximab sous cutanée dans les leucémies lymphoïdes chroniques et les lymphomes par rapport à la forme IV avec cependant plus d'effets secondaire de grade 1 et 2 (réactions locales cutanées, douleurs musculaires). Cette injection qui a l'avantage de réduire le temps d'hospitalisation pourrait dans l'avenir être indiquée dans la prise en charge des PTT.

L'utilisation du Rituximab a été aussi évaluée dans l'intérêt d'un traitement prophylactique des récurrences. Le fait d'avoir un suivi rapproché des patients en rémission permet par le dosage de l'activité ADAMTS13 de détecter précocement les rechutes avant tout signe clinique. Plusieurs études plaident pour un traitement de ces récurrences biologiques par le Rituximab avec comme effet une réascension de l'activité ADAMTS13 évitant l'apparition de signes cliniques. C'est l'attitude adoptée par le CH du Mans qui a traité certaines rechutes biologiques chez une patiente par Rituximab.

### **4.6.3 Les traitements immunosuppresseurs et la splénectomie**

Le recours à des traitements immunosuppresseurs peut être recommandé dans l'ascension thérapeutique requise dans les formes à rechutes (74). En effet les EP sont le traitement de première ligne, le Rituximab est le traitement de seconde ligne en cas d'échec des EP et les thérapeutiques de 3<sup>ème</sup> ligne sont constitués notamment par les corticoïdes et la splénectomie, lorsque Rituximab ne donne pas de résultats satisfaisants.

Avant 2004 et la commercialisation du Rituximab, les PTT réfractaires bénéficiaient d'un traitement par vincristine sans qu'il n'existe vraiment d'étude sur le bénéfice de ce traitement (75). A dater de 2004, le Rituximab à J5 a été utilisé, avec un délai d'action d'environ 12 jours.

L'intérêt de la corticothérapie seule n'a pas été beaucoup évaluée, quelques données s'accordent à penser qu'elle aurait une efficacité dans 30% des cas (76). Elle n'a pas été utilisée dans l'étude présentée.

L'efficacité de la splénectomie n'est pas constante (77). La physiopathologie limitant la production d'anticorps anti-ADAMTS13 s'explique par analogie aux pathologies auto-immunes par la suppression des cellules phagocytaires spléniques impliquées dans la phagocytose de l'ADAMTS13 opsonisé et la suppression des cellules B mémoires autoréactives mais aussi hypothétiquement par la mise en circulation d'un plus grand nombre de plaquettes habituellement dans la rate (78).

Dans les années 1950, la splénectomie était recommandée associée aux corticoïdes avec des taux de réponse voisins de 50 % (79) confirmé dans les années 2000 (80). La splénectomie est toujours présente dans l'ascension thérapeutique et notamment lors de l'échec des EP mais beaucoup moins depuis l'avènement du Rituximab.

De plus, la splénectomie est souvent accompagnée à distance par la recrudescence d'infections opportunistes (5).

Dans notre étude, il n'y a pas eu de recours à la splénectomie dans le cadre du traitement de PTT.

Le cyclophosphamide a une action immunosuppressive (lymphoablative) et immunomodulatrice par suppression des cellules B auto-réactives limitant la production d'anticorps anti-ADAMTS13. Cependant il existe peu de cas décrits dans la littérature dans l'indication du PTT. Une étude récente menée en relation avec le CNR MAT, a testé l'efficacité du cyclophosphamide lors de PTT réfractaire aux EP et au traitement de deuxième ligne (vincristine ou Rituximab). Il en ressort une normalisation des plaquettes chez tous les patients avec arrêt ou diminution progressive des EP, un taux de survie de 91% à plus de 3 ans et seulement une récurrence sur 9 cas. Le décès rapide avant 10 jours après le diagnostic de ces PTT réfractaires imposent une mise en place rapide du traitement par cyclophosphamide et la nécessité d'une identification rapide de ces patients. Cette étude compare cette stratégie avec la splénectomie et en conclut une évolution favorable dans les 2 cas avec des complications acceptables (81).

## 4.7 Comparaison avec le référentiel du CNR MAT

### 4.7.1 Bilan à réaliser au diagnostic

Le bilan lors de la découverte d'un PTT est bien codifié par le référentiel du CNR. Il comprend :

- Un ionogramme sanguin complet avec créatininémie et estimation du débit de filtration glomérulaire, un ionogramme urinaire avec créatininurie, un dosage de la protéinurie des 24 heures, une étude du sédiment urinaire et un bilan hépatique.
- Un myélogramme s'il existe un doute sur le caractère périphérique de la thrombopénie. Il est en particulier réalisé chez patients ayant, ou chez lesquels on suspecte, une pathologie associée (infection par le VIH, pathologie maligne).
- Un bilan d'hémostase (TP, TCA, fibrinogène, D-dimères).
- La recherche d'un foyer infectieux : hémocultures, analyse bactériologique des selles, ECBU, radiographie pulmonaire et autres prélèvements orientés par la clinique
- La sérologie VIH est systématique car une MAT peut révéler l'infection.
- Un dosage des béta-HCG plasmatiques est systématique chez les patientes en âge de procréer.
- La recherche d'anticorps antinucléaires car ils sont souvent associés à un déficit acquis en ADAMTS13 et permettent de suggérer fortement le diagnostic de PTT acquis. La recherche d'anticorps anti-ADN natif et une exploration du complément (C3, C4, CH50) et d'anticorps antiphospholipides permettent de rechercher un syndrome lupique ou des antiphospholipides.
- Une imagerie par IRM est réalisée en cas d'atteinte cérébrale.
- Un électrocardiogramme et un dosage de la troponine Ic pour ne pas méconnaître une atteinte cardiaque.

Pour l'ensemble de nos patients, les bilans sus-cités avaient été réalisés permettant une prise en charge rapide et optimale. Ces examens ont pu déceler une atteinte cardiaque chez une patiente, un PTT auto-immun dans un contexte gravidique ainsi que des marqueurs d'auto-immunité chez 3 patients.

Il est donc important d'être systématique dans la prise en charge du PTT afin de ne pas méconnaître l'atteinte d'un organe.

### **4.7.2 Indications de l'exploration biologique d'ADAMTS13**

Les indications du dosage de l'activité ADAMTS13 sont :

- Au diagnostic, devant un syndrome de MAT.
- Après obtention de la rémission clinique et hématologique pour le suivi et la recherche de rechute.

Au CH du Mans de 2006 à 2012, 48 patients ont bénéficié d'une exploration biologique d'ADAMTS13. Dans 25% des cas, le résultat de l'activité confirmait le diagnostic de PTT. On peut en déduire qu'il y a une prescription pertinente et non abusive de l'exploration biologique d'ADAMTS13 au CH du Mans.

Chaque patient dont le diagnostic de PTT a été confirmé, a eu après sa rémission clinique un suivi rapproché avec une exploration biologique d'ADAMTS13 permettant de détecter précocement chez 2 patientes une rechute biologique. Le suivi rapproché conformément aux données prédictives d'ADAMTS13 a permis de leur faire bénéficier d'un traitement par Rituximab, permettant une amélioration biologique avant l'apparition de signes cliniques.

### **4.7.3 Prise en charge thérapeutique**

Le CNR MAT détaille les différentes possibilités thérapeutiques dans son référentiel. Il rappelle que le PTT doit être traité en urgence et de préférence en unité de soins intensifs jusqu'à ce que le taux de plaquettes soit supérieur à 50G/L en raison de la fréquence des souffrances viscérales à la phase aigüe et de l'évolution potentiellement grave de celles-ci. L'ensemble des cas rapportés au CH Le Mans a été pris en charge dans l'unité de réanimation médico-chirurgicale pour une surveillance continue. Puis dans un deuxième temps lorsque la cinétique des plaquettes et la clinique étaient satisfaisantes la poursuite du traitement était effectuée dans le service de Néphrologie.

Le CNR MAT reconnaît les échanges plasmatiques comme seul traitement efficace en s'appuyant sur la littérature précédemment citée. Ainsi il préconise le même protocole de réalisation des EP, le même rythme des EP, la même substitution, la même surveillance et la même décroissance. Au Centre Hospitalier du Mans, l'ensemble des patients ont bénéficié d'EP avec ces mêmes recommandations.

Les traitements associés, comme les antiagrégants plaquettaires ou la vincristine en première intention, n'ont jamais fait preuve de leur efficacité et ne sont pas recommandés. La corticothérapie associée aux EP reste le seul traitement ayant eu des résultats convaincants et



sa prescription est laissée à l'appréciation du clinicien. Dans notre travail, 4 patients ont seulement bénéficié de corticoïdes.

Lors de PTT réfractaires et de réévolutivité précoce, le CNR MAT propose que le traitement initial soit renforcé par des thérapeutiques immunomodulatrices et notamment par le Rituximab qui permettrait d'obtenir une réponse clinique et hématologique dans la grande majorité des cas. Ce fut le cas dans notre étude, plusieurs patients ont bénéficié du traitement par Rituximab avec succès en traitement de première intention (5/11) et lors de rechute (1/11). Le CNR MAT développe aussi les échanges plasmatiques intensifs (bi-quotidiens) et les immunoglobulines polyvalentes par voie intraveineuse qui sont des alternatives non réalisées au CH du Mans. Le cyclophosphamide utilisée pour 2 de nos patients a été souligné dans le référentiel comme proposition thérapeutique seule chez les patients réfractaires en particulier quand il existe des signes de souffrance viscérale.

L'utilisation de cyclophosphamide en deuxième ligne pour les 2 patients de notre étude s'explique pour la présence d'une hépatite B active non traitée contre indiquant le Rituximab pour un et un antécédent de vascularite à pANCA (Anticorps anticytoplasme des polynucléaires de type périnucléaire) pour l'autre.

Le CNR MAT dans le cadre de rechutes, recommande fortement le Rituximab, traitement dont ont bénéficié avec succès les 2 patients de notre travail ayant présenté des rechutes. Le référentiel détaille entre autres, la splénectomie et le manque de preuve de la ciclosporine. Ces deux thérapeutiques n'ont jamais été introduites au CH du Mans.

#### **4.8 Recherche de sous-groupes**

Les données résultant de notre étude ont été analysées par tableau croisé et dynamique. L'analyse souligne comme facteurs prédictifs de mortalité, l'insuffisance rénale, l'haptoglobine supérieure à 0,10g/L (ce qui ne devrait pas être le cas dans les PTT classiques) et l'âge avancé supérieur à 70 ans.

Les signes cliniques tels que neurologiques, digestifs, cutanés, l'altération de l'état général et la fièvre n'ont pas permis d'isoler de sous-groupes.

L'âge a déjà été évoqué dans plusieurs publications comme facteur prédictif de mortalité et il est retrouvé dans notre étude.

L'insuffisance rénale est soulignée dans un score réalisé par l'équipe du CNR MAT permettant de détecter les facteurs prédictifs de graves déficits en ADAMTS13 mais n'est pas retrouvé dans les autres publications comme prédictifs de mortalité (82).

Le taux de LDH élevé comme facteur prédictif de mortalité présent dans certaines publications n'est pas retrouvé pas dans cette étude. Nous avons réalisé la moyenne des taux de LDH au diagnostic chez les personnes décédés qui était de 650 UI/mL et ce dosage était très nettement inférieur à la moyenne des taux de LDH des sujets en rémission qui est de 1000 UI/mL.

Les signes neurologiques graves à la présentation sont aussi souvent cités comme facteurs prédictifs. Dans notre série de cas, les patients ayant les signes neurologiques les plus sévères ne sont pas décédés.

Notre travail comporte des biais qui méritent d'être soulignés. Cette étude est rétrospective et la collecte des données a été réalisée sur les dossiers des patients dans une pathologie où les évolutions de prise en charge thérapeutique ont été notables sur 7 ans.

De plus un recensement de données de onze patients est faible pour pouvoir être significatif bien que l'incidence calculée corresponde aux données de la littérature et souligne la difficulté des études dans le cadre du PTT qui est une pathologie rare.

# CONCLUSION

## 5 CONCLUSION

Le PTT est une pathologie rare au pronostic sombre en l'absence de traitement. Les avancées réalisées au fur et à mesure des années sur la compréhension de la physiopathologie de la maladie ont permis une prise en charge diagnostique et thérapeutique de plus en plus adaptée permettant de réduire la mortalité à un taux inférieur à 10%.

La présentation clinique et biologique des patients de notre étude est similaire à la littérature, révélant une pathologie très hétérogène lors de son diagnostic pouvant se résumer à une bicytopenie ou à une hyperthermie. Des taux semblables à la littérature de mortalité et de rechute dans notre série de cas confirme l'histoire naturelle de la maladie et la prise en charge adaptée et conforme aux recommandations.

Le CNR MAT a établi un référentiel regroupant les conduites à tenir ce qui a permis une harmonisation des pratiques dans le diagnostic, l'indication du dosage d'ADAMTS13 et la prise en charge thérapeutique au niveau national. Notre étude a révélé que ces pratiques sont bien respectées au Centre Hospitalier du Mans.

Les facteurs prédictifs de mortalité retrouvés dans cette étude sont l'insuffisance rénale, l'âge avancé (supérieur à 70 ans) et un taux d'haptoglobine supérieur à 0.10 g/L. Compte tenu de notre faible échantillonnage et de notre recueil rétrospectif, ces informations mériteraient d'être confirmées sur une plus grande population dans le cadre d'une nouvelle étude.

D'un point de vue thérapeutique, les échanges plasmatiques restent actuellement le traitement de référence du PTT. L'introduction du Rituximab, nouveau traitement immunomodulateur, permet une prise en charge efficace du PTT, de diminuer le taux de récurrence et de les traiter précocement en effectuant un suivi biologique. Sous l'égide du CNR MAT, une étude de phase II « PTT ritux 2 » prospective, multicentrique a pour objectif de démontrer que l'administration concomitante du Rituximab dès le premier EP diminuerait leur nombre total .

# **BIBLIOGRAPHIE**

## 6 BIBLIOGRAPHIE

1. Asada Y, Sumiyoshi A, Hayashi T, Suzumiya J, Kaketani K. Immunohistochemistry of vascular lesion in thrombotic thrombocytopenic purpura, with special reference to factor VIII related antigen. *Thromb Res.* 1985 Jun 1;38(5):469–79.
2. Amorosi E, Witmann J. Report of 16 cases and literature review. *Medicine (Baltimore).* 1966;45:139-149.
3. Moake JL, Rudy CK, Troll JH, Weinstein MJ, Colannino NM, Azocar J, et al. Unusually large plasma factor VIII: von Willebrand factor multimers in chronic relapsing thrombotic thrombocytopenic purpura. *N Engl J Med.* 1982 Dec 2;307(23):1432–5.
4. Furlan M, Robles R, Solenthaler M, Lämmle B. Acquired deficiency of von Willebrand factor-cleaving protease in a patient with thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood.* 1998 Apr 15;91(8):2839–46.
5. Furlan M, Robles R, Galbusera M, Remuzzi G, Kyrle PA, Brenner B, et al. von Willebrand factor-cleaving protease in thrombotic thrombocytopenic purpura and the hemolytic-uremic syndrome. *N Engl J Med.* 1998 Nov 26;339(22):1578–84.
6. Zheng X, Chung D, Takayama TK, Majerus EM, Sadler JE, Fujikawa K. Structure of von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS13), a metalloprotease involved in thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Biol Chem.* 2001 Nov 2;276(44):41059–63.
7. Kokame K, Nobe Y, Kokubo Y, Okayama A, Miyata T. FRETTS-VWF73, a first fluorogenic substrate for ADAMTS13 assay. *Br J Haematol.* 2005 Apr;129(1):93–100.
8. George JN, Vesely SK, Terrell DR. The Oklahoma Thrombotic Thrombocytopenic Purpura-Hemolytic Uremic Syndrome (TTP-HUS) Registry: a community perspective of patients with clinically diagnosed TTP-HUS. *Semin Hematol.* 2004 Jan;41(1):60–7.
9. Terrell DR, Williams LA, Vesely SK, Lämmle B, Hovinga JAK, George JN. The incidence of thrombotic thrombocytopenic purpura-hemolytic uremic syndrome: all patients, idiopathic patients, and patients with severe ADAMTS-13 deficiency. *J Thromb Haemost Jth.* 2005 Jul;3(7):1432–6.
10. Rock GA, Shumak KH, Buskard NA, Blanchette VS, Kelton JG, Nair RC, et al. Comparison of plasma exchange with plasma infusion in the treatment of thrombotic thrombocytopenic purpura. Canadian Apheresis Study Group. *N Engl J Med.* 1991 Aug 8;325(6):393–7.
11. Rock G, Porta C, Bobbio-Pallavicini E. Thrombotic thrombocytopenic purpura treatment in year 2000. *Haematologica.* 2000 Apr;85(4):410–9.
12. Sadler JE, Moake JL, Miyata T, George JN. Recent advances in thrombotic thrombocytopenic purpura. *Hematol Educ Program Am Soc Hematol Am Soc Hematol Educ Program.* 2004;407–23.

13. Dent JA, Galbusera M, Ruggeri ZM. Heterogeneity of plasma von Willebrand factor multimers resulting from proteolysis of the constituent subunit. *J Clin Invest.* 1991 Sep;88(3):774–82.
14. Rodeghiero F. von Willebrand disease: still an intriguing disorder in the era of molecular medicine. *Haemoph Off J World Fed Hemoph.* 2002 May;8(3):292–300.
15. Ruggeri ZM, Ware J. von Willebrand factor. *Faseb J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* 1993 Feb 1;7(2):308–16.
16. Furlan M, Robles R, Lämmle B. Partial purification and characterization of a protease from human plasma cleaving von Willebrand factor to fragments produced by in vivo proteolysis. *Blood.* 1996 May 15;87(10):4223–34.
17. Tsai HM. Physiologic cleavage of von Willebrand factor by a plasma protease is dependent on its conformation and requires calcium ion. *Blood.* 1996 May 15;87(10):4235–44.
18. Fujikawa K, Suzuki H, McMullen B, Chung D. Purification of human von Willebrand factor-cleaving protease and its identification as a new member of the metalloproteinase family. *Blood.* 2001 Sep 15;98(6):1662–6.
19. Soejima K, Mimura N, Hirashima M, Maeda H, Hamamoto T, Nakagaki T, et al. A novel human metalloprotease synthesized in the liver and secreted into the blood: possibly, the von Willebrand factor-cleaving protease? *J Biochem (Tokyo).* 2001 Oct;130(4):475–80.
20. Veyradier A, Wolf M, Stepanian A, Coppo P. ADAMTS 13 : La protéase spécifique de clivage du facteur von Willebrand. *Emc Elsevier Masson Sas Paris Biol Médicale* 90-20-0003-2011.
21. Zheng X, Nishio K, Majerus EM, Sadler JE. Cleavage of von Willebrand factor requires the spacer domain of the metalloprotease ADAMTS13. *J Biol Chem.* 2003 Aug 8;278(32):30136–41.
22. Soejima K, Matsumoto M, Kokame K, Yagi H, Ishizashi H, Maeda H, et al. ADAMTS-13 cysteine-rich/spacer domains are functionally essential for von Willebrand factor cleavage. *Blood.* 2003 Nov 1;102(9):3232–7.
23. Dong J, Moake JL, Bernardo A, Fujikawa K, Ball C, Nolasco L, et al. ADAMTS-13 metalloprotease interacts with the endothelial cell-derived ultra-large von Willebrand factor. *J Biol Chem.* 2003 Aug 8;278(32):29633–9.
24. Tao Z, Wang Y, Choi H, Bernardo A, Nishio K, Sadler JE, et al. Cleavage of ultralarge multimers of von Willebrand factor by C-terminal-truncated mutants of ADAMTS-13 under flow. *Blood.* 2005 Jul 1;106(1):141–3.
25. Zhang P, Pan W, Rux AH, Sachais BS, Zheng XL. The cooperative activity between the carboxyl-terminal TSP1 repeats and the CUB domains of ADAMTS13 is crucial for recognition of von Willebrand factor under flow. *Blood.* 2007 Sep 15;110(6):1887–94.
26. Furlan M, Robles R, Morselli B, Sandoz P, Lämmle B. Recovery and half-life of von Willebrand factor-cleaving protease after plasma therapy in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura. *Thromb Haemost.* 1999 Jan;81(1):8–13.

27. Sadler JE. Von Willebrand factor, ADAMTS13, and thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood*. 2008 Jul 1;112(1):11–8.
28. Lotta LA, Garagiola I, Palla R, Cairo A, Peyvandi F. ADAMTS13 mutations and polymorphisms in congenital thrombotic thrombocytopenic purpura. *Hum Mutat*. 2010 Jan;31(1):11–9.
29. Zheng XL, Sadler JE. Pathogenesis of thrombotic microangiopathies. *Annu Rev Pathol*. 2008;3:249–77.
30. Studt J-D, Böhm M, Budde U, Girma J-P, Varadi K, Lämmle B. Measurement of von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS-13) activity in plasma: a multicenter comparison of different assay methods. *J Thromb Haemost Jth*. 2003 Sep;1(9):1882–7.
31. Rock G, Clark WF, Anderson D, Benny B, Sutton D, Leblond P, et al. ADAMTS-13 may not predict disease or outcome in patients with Thrombotic Thrombocytopenic Purpura. *Thromb Res*. 2013 Apr;131(4):308–12.
32. Klaus C, Plaimauer B, Studt J-D, Dorner F, Lämmle B, Mannucci PM, et al. Epitope mapping of ADAMTS13 autoantibodies in acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood*. 2004 Jun 15;103(12):4514–9.
33. Luken BM, Turenhout EAM, Hulstein JJJ, Van Mourik JA, Fijnheer R, Voorberg J. The spacer domain of ADAMTS13 contains a major binding site for antibodies in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura. *Thromb Haemost*. 2005 Feb;93(2):267–74.
34. Zheng X, Pallera AM, Goodnough LT, Sadler JE, Blinder MA. Remission of chronic thrombotic thrombocytopenic purpura after treatment with cyclophosphamide and rituximab. *Ann Intern Med*. 2003 Jan 21;138(2):105–8.
35. Scheiflinger F, Knöbl P, Trattner B, Plaimauer B, Mohr G, Dockal M, et al. Nonneutralizing IgM and IgG antibodies to von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS-13) in a patient with thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood*. 2003 Nov 1;102(9):3241–3.
36. Ferrari S, Scheiflinger F, Rieger M, Mudde G, Wolf M, Coppo P, et al. Prognostic value of anti-ADAMTS 13 antibody features (Ig isotype, titer, and inhibitory effect) in a cohort of 35 adult French patients undergoing a first episode of thrombotic microangiopathy with undetectable ADAMTS 13 activity. *Blood*. 2007 Apr 1;109(7):2815–22.
37. Roy V, Rizvi MA, Vesely SK, George JN. Thrombotic thrombocytopenic purpura-like syndromes following bone marrow transplantation: an analysis of associated conditions and clinical outcomes. *Bone Marrow Transplant*. 2001 Mar;27(6):641–6.
38. Chemnitz J, Fuchs M, Blau W, Hartmann P, Wickenhauser C, Scheid C, et al. Fatal thrombotic thrombocytopenic purpura as a rare complication following allogeneic stem cell transplantation. *Ann Hematol*. 2000 Sep;79(9):527–9.
39. Veyradier A, Obert B, Houllier A, Meyer D, Girma JP. Specific von Willebrand factor-cleaving protease in thrombotic microangiopathies: a study of 111 cases. *Blood*. 2001 Sep 15;98(6):1765–72.



40. Veyradier A, Meyer D. Thrombotic thrombocytopenic purpura and its diagnosis. *J Thromb Haemost Jth.* 2005 Nov;3(11):2420–7.
41. Furlan M, Lämmle B. Aetiology and pathogenesis of thrombotic thrombocytopenic purpura and haemolytic uraemic syndrome: the role of von Willebrand factor-cleaving protease. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2001 Jun;14(2):437–54.
42. Johnson PW, Glennie MJ. Rituximab: mechanisms and applications. *Br J Cancer.* 2001 Nov 30;85(11):1619–23.
43. Coppo P, Veyradier A, Monge M, Réseau d'Etude des Microangiopathies Thrombotiques. [Acquired idiopathic thrombotic thrombocytopenic purpura: arguments for an autoimmune disease]. *Presse Médicale Paris Fr* 1983. 2006 Dec;35(12 Pt 2):1876–86.
44. Coppo P, Bengoufa D, Veyradier A, Wolf M, Bussel A, Millot GA, et al. Severe ADAMTS13 deficiency in adult idiopathic thrombotic microangiopathies defines a subset of patients characterized by various autoimmune manifestations, lower platelet count, and mild renal involvement. *Medicine (Baltimore).* 2004 Jul;83(4):233–44.
45. Chaturvedi S, Carcioppolo D, Zhang L, McCrae KR. Management and outcomes for patients with TTP: analysis of 100 cases at a single institution. *Am J Hematol.* 2013 Apr 20;
46. Scully M, Cohen H, Cavenagh J, Benjamin S, Starke R, Killick S, et al. Remission in acute refractory and relapsing thrombotic thrombocytopenic purpura following rituximab is associated with a reduction in IgG antibodies to ADAMTS-13. *Br J Haematol.* 2007 Feb;136(3):451–61.
47. Kremer Hovinga JA, Vesely SK, Terrell DR, Lämmle B, George JN. Survival and relapse in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood.* 2010 Feb 25;115(8):1500–1511; quiz 1662.
48. Jin M, Casper TC, Cataland SR, Kennedy MS, Lin S, Li YJ, et al. Relationship between ADAMTS13 activity in clinical remission and the risk of TTP relapse. *Br J Haematol.* 2008 May;141(5):651–8.
49. Franchini M, Mannucci PM. Advantages and limits of ADAMTS13 testing in thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood Transfus Trasfus Sangue.* 2008 Jul;6(3):127–35.
50. Coppo P, Wolf M, Veyradier A, Bussel A, Malot S, Millot GA, et al. Prognostic value of inhibitory anti-ADAMTS13 antibodies in adult-acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol.* 2006 Jan;132(1):66–74.
51. Scully M. Inhibitory anti-ADAMTS 13 antibodies: measurement and clinical application. *Blood Rev.* 2010 Jan;24(1):11–6.
52. Patschan D, Witzke O, Dühsen U, Erbel R, Philipp T, Herget-Rosenthal S. Acute myocardial infarction in thrombotic microangiopathies—clinical characteristics, risk factors and outcome. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc.* 2006 Jun;21(6):1549–54.
53. Puyade M, Badin J, Quéron B, Christiaens L, Varroud-Vial N, Pierre F, et al. [Thrombotic thrombocytopenic purpura: Do not ignore cardiac involvement.]. *Rev Med Interne Fondée Par Soc Natl Française Med Interne.* 2013 May 24;

54. Mariotte E, Blet A, Galicier L, Darmon M, Parquet N, Lengline E, et al. Unresponsive thrombotic thrombocytopenic purpura in critically ill adults. *Intensive Care Med.* 2013 Apr 3;
55. Coppo P, Busson M, Veyradier A, Wynckel A, Poullin P, Azoulay E, et al. HLA-DRB1\*11: a strong risk factor for acquired severe ADAMTS13 deficiency-related idiopathic thrombotic thrombocytopenic purpura in Caucasians. *J Thromb Haemost Jth.* 2010 Apr;8(4):856–9.
56. Bell WR, Braine HG, Ness PM, Kickler TS. Improved Survival in Thrombotic Thrombocytopenic Purpura–Hemolytic Uremic Syndrome. *N Engl J Med.* 1991;325(6):398–403.
57. Brook J, Konwaler BE. Thrombotic Thrombocytopenic Purpura--Association with Metastatic Gastric Carcinoma and a Possible Auto-Immune Disorder. *Calif Med.* 1965 Mar;102(3):222–7.
58. Kitchens CS, Konkle BA, Kessler CM. SPEC - Consultative Hemostasis and Thrombosis E - Book 12 Month Subscription. Elsevier Health Sciences; 2013.
59. Aster RH. TTP: new clues to the etiology of an enigmatic disease. *N Engl J Med.* 1977 Dec 22;297(25):1400–1.
60. Gutterman LA ST. Treatment of thrombotic thrombocytopenic purpura with vincristine. *JAMA.* 1982 Mar 12;247(10):1433–6.
61. Fakhouri F, Vernant J-P, Veyradier A, Wolf M, Kaplanski G, Binaut R, et al. Efficiency of curative and prophylactic treatment with rituximab in ADAMTS13-deficient thrombotic thrombocytopenic purpura: a study of 11 cases. *Blood.* 2005 Sep 15;106(6):1932–7.
62. McCrae KR, Bussel JB, Mannucci PM, Remuzzi G, Cines DB. Platelets: an update on diagnosis and management of thrombocytopenic disorders. *Hematol Educ Program Am Soc Hematol Am Soc Hematol Educ Program.* 2001;282–305.
63. Zeigler ZR, Shaddock RK, Gryn JF, Rintels PB, George JN, Besa EC, et al. Cryoprecipitate poor plasma does not improve early response in primary adult thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP). *J Clin Apheresis.* 2001;16(1):19–22.
64. Böhm M, Betz C, Miesbach W, Krause M, von Auer C, Geiger H, et al. The course of ADAMTS-13 activity and inhibitor titre in the treatment of thrombotic thrombocytopenic purpura with plasma exchange and vincristine. *Br J Haematol.* 2005 Jun;129(5):644–52.
65. Vesely SK, George JN, Lämmle B, Studt J-D, Alberio L, El-Harake MA, et al. ADAMTS13 activity in thrombotic thrombocytopenic purpura-hemolytic uremic syndrome: relation to presenting features and clinical outcomes in a prospective cohort of 142 patients. *Blood.* 2003 Jul 1;102(1):60–8.
66. Zheng XL, Kaufman RM, Goodnough LT, Sadler JE. Effect of plasma exchange on plasma ADAMTS13 metalloprotease activity, inhibitor level, and clinical outcome in patients with idiopathic and nonidiopathic thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood.* 2004 Jun 1;103(11):4043–9.

67. Coppo P, Bussel A, Charrier S, Adrie C, Galicier L, Boulanger E, et al. High-dose plasma infusion versus plasma exchange as early treatment of thrombotic thrombocytopenic purpura/hemolytic-uremic syndrome. *Medicine (Baltimore)*. 2003 Jan;82(1):27–38.
68. Tsai HM, Lian EC. Antibodies to von Willebrand factor-cleaving protease in acute thrombotic thrombocytopenic purpura. *N Engl J Med*. 1998 Nov 26;339(22):1585–94.
69. Howard MA, Williams LA, Terrell DR, Duvall D, Vesely SK, George JN. Complications of plasma exchange in patients treated for clinically suspected thrombotic thrombocytopenic purpura-hemolytic uremic syndrome. *Transfusion (Paris)*. 2006 Jan;46(1):154–6.
70. Gutterman LA, Kloster B, Tsai H-M. Rituximab therapy for refractory thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood Cells Mol Dis*. 2002 Jun;28(3):385–91.
71. Chemnitz J, Draube A, Scheid C, Staib P, Schulz A, Diehl V, et al. Successful treatment of severe thrombotic thrombocytopenic purpura with the monoclonal antibody rituximab. *Am J Hematol*. 2002 Oct;71(2):105–8.
72. Yomtovian R, Niklinski W, Silver B, Sarode R, Tsai H-M. Rituximab for chronic recurring thrombotic thrombocytopenic purpura: a case report and review of the literature. *Br J Haematol*. 2004 Mar;124(6):787–95.
73. Reddy PS, Deauna-Limayo D, Cook JD, Ganguly SS, Blecke C, Bodensteiner DC, et al. Rituximab in the treatment of relapsed thrombotic thrombocytopenic purpura. *Ann Hematol*. 2005 Apr;84(4):232–5.
74. Coppo P, Veyradier A, Durey M-A, Fremeaux-Bacchi V, Scrobohaci M-L, Amesland F, et al. [Pathophysiology of thrombotic microangiopathies: current understanding]. *Ann Médecine Interne*. 2002 May;153(3):153–66.
75. Ziman A, Mitri M, Klapper E, Pepkowitz SH, Goldfinger D. Combination vincristine and plasma exchange as initial therapy in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura: one institution's experience and review of the literature. *Transfusion (Paris)*. 2005 Jan;45(1):41–9.
76. Bell WR, Braine HG, Ness PM, Kickler TS. Improved survival in thrombotic thrombocytopenic purpura-hemolytic uremic syndrome. Clinical experience in 108 patients. *N Engl J Med*. 1991 Aug 8;325(6):398–403.
77. Kremer Hovinga JA, Studt J-D, Demarmels Biasiutti F, Solenthaler M, Alberio L, Zwicky C, et al. Splenectomy in relapsing and plasma-refractory acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *Haematologica*. 2004 Mar;89(3):320–4.
78. Crary SE, Buchanan GR. Vascular complications after splenectomy for hematologic disorders. *Blood*. 2009 Oct 1;114(14):2861–8.
79. Bernard RP, Bauman AW, Schwartz SI. Splenectomy for thrombotic thrombocytopenic purpura. *Ann Surg*. 1969 Apr;169(4):616–24.
80. Aqui NA, Stein SH, Konkle BA, Abrams CS, Strobl FJ. Role of splenectomy in patients with refractory or relapsed thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Clin Apheresis*. 2003;18(2):51–4.

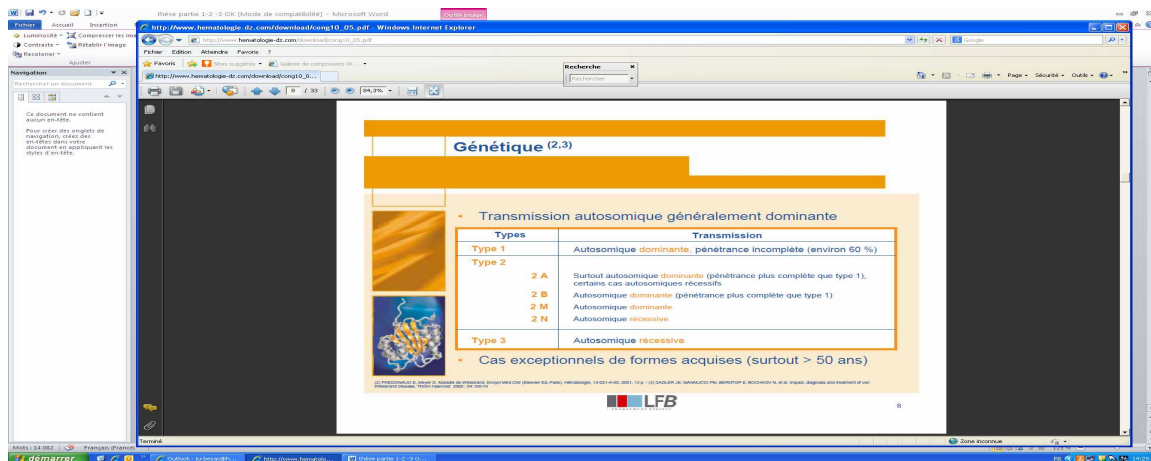
81. Beloncle F, Buffet M, Coindre J-P, Munoz-Bongrand N, Malot S, Pène F, et al. Splenectomy nd/or cyclophosphamide as salvage therapies in thrombotic thrombocytopenic purpura: the French TMA Reference Center experience. *Transfusion (Paris)*. 2012 Nov;52(11):2436–44.
82. Coppo P, Schwarzingler M, Buffet M, Wynckel A, Clabault K, Presne C, et al. Predictive features of severe acquired ADAMTS13 deficiency in idiopathic thrombotic microangiopathies: the French TMA reference center experience. *Plos One*. 2010;5(4):e10208.

# ANNEXES

# 7 ANNEXES

## 7.1 Annexe 1: Présentation des différents types et sous types de maladie de Willebrand et mode de transmission.

Type/Sous-types	Description
1	Déficit <b>quantitatif</b> partiel en VWF
2	Déficit <b>qualitatif</b> en VWF (variants moléculaires)
2 A	Diminution de l'affinité du VWF pour les plaquettes, associée à l'absence des multimères de haut poids moléculaire
2 B	Augmentation de l'affinité du VWF pour les plaquettes
2 M	Diminution de l'affinité du VWF pour les plaquettes non liée à une anomalie des multimères du VWF
2 N	Diminution de l'affinité du VWF pour le FVIII
3	Déficit <b>quantitatif total</b> en VWF



## 7.2 Annexe 2 : Feuille d'envoi ADAMTS13

**ETUDE D'ADAMTS13, protéase spécifique de clivage du facteur  
Willebrand, DANS LES MICROANGIOPATHIES  
THROMBOTIQUES DE L'ADULTE  
RECHERCHE CLINIQUE**

Professeur Agnès VEYRADIÈRE - Docteur Martine WOLF  
Service d'Hématologie Biologique, Hôpital Antoine Bécclère  
157 rue de la Porte de Trivaux, 92140 CLAMART  
Tél : 01 45 37 43 05 / Fax : 01 46 32 40 55  
[agnes.veyradier@abc.aphp.fr](mailto:agnes.veyradier@abc.aphp.fr) / [martine.wolf@abc.aphp.fr](mailto:martine.wolf@abc.aphp.fr)

**FICHE DE RENSEIGNEMENTS CLINIQUES  
A JOINDRE AUX PRELEVEMENTS**

**Date de la demande :**

**Patient :**

- Nom :
- Prénom :
- Date de naissance :
- Sexe :
- Groupe sanguin (ABO) :

**Médecin demandeur :**

- Nom :
- Service :
- Hôpital :
- Adresse :
- Tél / Fax :
- E-mail :

**Pathologie suspectée :**

**Episodes de MAT antérieures :**

**Pathologies associées :**

**Contexte clinique correspondant à une phase aiguë :**

- Fièvre :
- Signes neurologiques :
- Signes abdominaux :

## Paramètres biologiques :

Rémission	Phase aiguë
- Insuffisance rénale : ..... .....	Non Si oui, préciser : • Urée ..... • Créatinine .....
- -Anémie hémolytique :	Oui Si oui, préciser : • Hémoglobine (g/dL) ..... ..... • Schizocytes (%) ..... ..... • LDH ..... ..... • Haptoglobine ..... .....
- Thrombopénie :	Oui Si oui, préciser : • Plaquettes (G/L) ..... .....
- Hémostase : ..... .....	• TP ..... ..... • TCA ..... ..... • Fib .....

## Traitement :

--



### 7.3 Annexe 3 : Présentation des données épidémiologiques, des traitements et de l'évolution des 11 patients inclus.

	DONNEES EPIDEMIOLOGIQUES			TRAITEMENT		EVOLUTION
	Sexe	Age au diagnostic	Année d'hospitalisation	Thérapeutiques	Nombre d'EP	
<b>Patient 1</b>	Féminin	41	2006	EP + Rituximab	21	Rechutes (7) puis rémission
<b>Patient 2</b>	Féminin	36	2007	EP + Rituximab	14	Rémission
<b>Patient 3</b>	Féminin	24	2008	EP + Rituximab	11	Rémission
<b>Patient 4</b>	Féminin	24	2008	EP	2	Rémission
<b>Patient 5</b>	Féminin	87	2008	EP + corticoïdes	7	Décès
<b>Patient 6</b>	Féminin	73	2009	EP + corticoïdes	5	Décès
<b>Patient 7</b>	Féminin	39	2006	EP + corticoïdes	30	Rechutes (3) puis rémission
<b>Patient 8</b>	Féminin	40	2010	EP + Endoxan	32	Rémission
<b>Patient 9</b>	Féminin	34	2012	EP + Rituximab	10	Rémission
<b>Patient 10</b>	Masculin	73	2008	EP + corticoïdes + Endoxan	8	Décès
<b>Patient 11</b>	Masculin	58	2012	EP + Rituximab	5	Rémission

### 7.3 Annexe 4 : Présentation des signes cliniques pour les 11 patients de l'étude.

	SIGNES CLINIQUES					
	Signes neurologiques	Insuffisance rénale	Signes digestifs	Signes cutanés	Altération de l'état général	Hyperthermie
<b>Patient 1</b>	Amaurose transitoire œil droit, paralysie faciale droite, hémianopsie latéral homonyme gauche	Oligo-anurie	Absence	Ecchymoses multiples	Absence	Absence
<b>Patient 2</b>	Absence	Absence	Absence	Absence	Présence	Hyperthermie
<b>Patient 3</b>	Signes de comitialité	Absence	Absence	Absence	Présence	Hyperthermie
<b>Patient 4</b>	Absence	Absence	Douleurs abdominales et diarrhées	Absence	Absence	Absence
<b>Patient 5</b>	Absence	Oligo-anurie	Absence	Absence	Absence	Absence
<b>Patient 6</b>	Absence	Oligo-anurie	Absence	Purpura	Absence	Absence
<b>Patient 7</b>	Céphalées	Absence	Absence	Purpura	Présence	Absence
<b>Patient 8</b>	Confusion mentale	Absence	Nausées-vomissements	Ecchymoses	Présence	Absence
<b>Patient 9</b>	Absence	Absence	Douleurs abdominales	Absence	Absence	Absence
<b>Patient 10</b>	Céphalées	Oligo-anurie	Absence	Absence	Présence	Absence
<b>Patient 11</b>	Absence	Absence	Absence	Purpura	Absence	Hyperthermie

### 7.3 Annexe 5 : Présentation des données biologiques pour les 11 patients de l'étude :

Hémoglobine en g/dL, plaquettes en G/L, créatinine en  $\mu\text{mol/L}$ , urée en  $\mu\text{mol/L}$ , LDH en UI/L, haptoglobine en UI/L, TP en %, TCA en secondes, ALAT en UI/L, ASAT en UI/L, IgG anti ADAMTS 13 en UI. (NR : Non Réalisé)

	BILAN BIOLOGIQUE AU DIAGNOSTIC												ADAMTS 13		
	Hémoglobine	plaquettes	schizocytes	créatinine	urée	LDH	haptoglobine	TP	TCA	fibinogène	ALAT	ASAT	groupe sanguin	activité	IgG anti ADAMTS 13
Patient 1	8,3	18	3-5%	108	21	4,25	0,83	102	41	NR	19	25	A+	<5%	30
Patient 2	8,6	93	1-3%	44	1,7	>1500	<0,10	61	46	4,54	411	2996	AB+	<5%	29
Patient 3	6,8	11	5-10%	92	4,6	1300	<0,10	95	30	3,08	NR	NR	O+	<5%	148
Patient 4	9,8	126	Absence	79	5,6	371	<0.10	50	52	4,07	27	20	A-	<5%	5
Patient 5	7,9	114	3-5%	507	39,8	1141	0,94	90	35	6,17	45	29	A+	10%	NR
Patient 6	8,9	68	1-3%	116	13	534	0,46	116	30	3,42	70	36	O+	<5%	24
Patient 7	7,5	12	Absence	126	25	1472	<0,10	87	40	4,62	22	24	O+	<5%	>100
Patient 8	8,4	6	5-10%	120	16,7	4632	<0,10	87	28	3,11	20	111	O+	<5%	35
Patient 9	9,3	27	3-5%	82	7,5	1239	<0,10	97	29	5,06	33	52	A+	<5%	40
Patient 10	8,2	32	1-3%	223	13,6	300	0,71	85	38	3,08	15	14	O+	<5%	13
Patient 11	8,7	23	3-5%	71	9,5	624	<0,10	82	35	5,25	66	49	B+	<5%	>100
Moyenne	8,4	48	82 % de cas positifs	143	14	1162	0,58	87	37	4,24	73	336			

## LISTE DES FIGURES

- Figure 1** Structure du facteur von Willebrand.
- Figure 2** Structure et récepteurs des plaquettes.
- Figure 3** Domaines structuraux et fonctionnels d'ADAMTS13.
- Figure 4** Blots de la migration des multimères de vWF.
- Figure 5** Rôle de la protéase du vWF.
- Figure 6** Action d'ADAMTS 13 sur le vWF.
- Figure 7** Conséquence d'un déficit d'ADAMTS 13.
- Figure 8** Représentation du domaine de clivage du facteur vWF par ADAMTS 13.
- Figure 9** Modélisation des mutations du gène ADAMTS 13 dans le PTT héréditaire.
- Figure 10** Modélisation du PTT auto-immun.
- Figure 11** Classification des PTT avec ADAMTS 13 effondrée.
- Figure 12** Principe de dosage de l'activité ADAMTS 13.
- Figure 13** Technique de FRET, dosage d'activité d'ADAMTS 13.
- Figure 14** Exemple de courbe de référence de dosage anti ADAMTS13.
- Figure 15** Répartition hommes-femmes des patients inclus.
- Figure 16** Présentation des différents signes cliniques observés.
- Figure 17** Présentation des différentes thérapeutiques.
- Figure 18** Répartition des décès, des rechutes et des rémissions sans rechutes.

## LISTE DES TABLEAUX

- Tableau I** Moyennes et valeurs extrêmes des principaux paramètres biologiques.
- Tableau II** Présentation de l'activité ADAMTS13 et du taux IgG anti-ADAMTS13.
- Tableau III** Nombre d'EP par patient lors du premier épisode de PTT.

# TABLE DES MATIERES

<b>1. INTRODUCTION.....</b>	<b>8</b>
<b>1.1 Définition de la MAT et du PTT.....</b>	<b>8</b>
<b>1.2 Historique.....</b>	<b>8</b>
<b>1.3 Epidémiologie du PTT.....</b>	<b>9</b>
<b>1.4 Mécanismes du PTT.....</b>	<b>10</b>
<b>1.4.1 Le facteur von Willebrand.....</b>	<b>10</b>
<b>1.4.2 Les plaquettes.....</b>	<b>12</b>
<b>1.4.3 ADAMTS13.....</b>	<b>13</b>
<b>1.4.4 Régulation d'ADAMTS13.....</b>	<b>16</b>
<b>1.4.5 Classification du PTT.....</b>	<b>18</b>
<b>1.4.6 Indications du dosage d'ADAMTS13.....</b>	<b>20</b>
<b>2. PATIENTS ET METHODES.....</b>	<b>23</b>
<b>2.1 Patients.....</b>	<b>23</b>
<b>2.2 Méthodes de recueil des données.....</b>	<b>24</b>
<b>2.3 Méthodes de dosage d'ADAMTS13.....</b>	<b>24</b>
<b>2.3.1 Méthode de prélèvement.....</b>	<b>24</b>
<b>2.3.2 Technique de dosage.....</b>	<b>25</b>
<b>3. RESULTATS.....</b>	<b>33</b>
<b>3.1 Epidémiologie.....</b>	<b>33</b>
<b>3.2 Présentation Clinique.....</b>	<b>33</b>
<b>3.3 Présentation biologique.....</b>	<b>34</b>
<b>3.4 Traitements.....</b>	<b>36</b>
<b>3.4.1 Les échanges plasmatiques.....</b>	<b>36</b>
<b>3.4.2 Le Rituximab.....</b>	<b>37</b>
<b>3.4.3 Les corticoïdes.....</b>	<b>37</b>
<b>3.4.4 Le cyclophosphamide.....</b>	<b>37</b>
<b>3.4.5 Les autres thérapeutiques.....</b>	<b>38</b>

3.5	Evolution clinique des patients.....	38
3.6	Recherche de sous groupes .....	39
<b>4.</b>	<b>DISCUSSION.....</b>	<b>42</b>
4.1	Epidémiologie.....	42
4.2	Les rechutes.....	42
4.3	La mortalité.....	43
4.4	Les signes cliniques.....	44
4.5	La biologie .....	45
4.6	Les traitements .....	46
4.6.1	Les échanges plasmatiques .....	46
4.6.2	Le Rituximab .....	47
4.6.3	Les traitements immunosuppresseurs et la splénectomie .....	48
4.7	Comparaison avec le référentiel du CNR MAT .....	50
4.7.1	Bilan à réaliser au diagnostic.....	50
4.7.2	Indications de l'exploration biologique d'ADAMTS13 .....	51
4.7.3	Prise en charge thérapeutique .....	51
4.8	Recherche de sous groupes .....	52
<b>5.</b>	<b>CONCLUSION.....</b>	<b>55</b>
<b>6.</b>	<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>57</b>
<b>7.</b>	<b>ANNEXES.....</b>	<b>65</b>
7.1	Annexe 1 : Présentation des différents types et sous type de maladie de Willebrand et mode de transmission.....	65
7.2	Annexe 2 : Feuille d'envoi ADAMTS13 .....	66
7.3	Annexe 3 : Présentation des données épidémiologiques, des traitements et de l'évolution des 11 patients inclus.....	68
7.4	Annexe 4 : Présentation des signes cliniques pour les 11 patients de l'étude.....	69
7.5	Annexes 5 : Présentation des données biologiques pour les 11 patients de l'étude.....	70
	<b>LISTE DES FIGURES.....</b>	<b>71</b>
	<b>LISTE DES TABLEAUX .....</b>	<b>72</b>