

1 INTRODUCTION

Les plaquettes sont des éléments figurés du sang qui sont impliquées dans la réparation des lésions vasculaires. Les mécanismes d'agrégation des plaquettes entre elles et d'adhésion avec la paroi vasculaire sont médiés via les glycoprotéines présentes à la surface des plaquettes.

Une perte d'expression ou un défaut fonctionnel d'un des complexes glycoprotéiques majeurs, GpIIb/IIIa ou GpIb/IX/V, peut conduire à des syndromes hémorragiques sévères :

- Thrombasthénie de Glanzmann, désordre pouvant affecter l'expression de la GpIIb/IIIa, dont la gravité est fonction du niveau d'expression de cette glycoprotéine ⁽²⁾,
- Syndrome de Bernard-Soulier concernant un défaut quantitatif ou qualitatif du complexe GpIb/IX/V ⁽¹⁾⁽⁴⁾⁽⁷⁾.

L'expression de la **GMP140** (P-sélectine, PADGEM) traduit quant à elle l'état d'activation plaquettaire. En effet, peu exprimée par les plaquettes quiescentes, elle est sécrétée suite à une activation. Le niveau d'expression de cette glycoprotéine, après activation in vitro, est un bon indicateur de la réactivité plaquettaire. Lors de certaines déficiences des granules α plaquettaires, l'expression de la GMP140 suite à une activation est réduite.

La trousse **PLT Gp/Receptors** permet de quantifier précisément les glycoprotéines GpIIb, GpIb α et GMP140 à la surface des plaquettes, à l'état natif et après une activation au TRAP (Thrombin Receptor Agonist Peptide).

Cette trousse rend donc possible la détection de thrombopathies constitutives dues à des défauts quantitatifs des Gp ou des défauts de réactivité plaquettaire.

2 PRINCIPE

L'échantillon est dilué en présence ou non de TRAP. Il est ensuite immunomarcqué à l'aide d'anticorps monoclonaux (AcM) de souris, dirigés contre les GpIIb, GpIb α et GMP140 humaines, ainsi qu'avec un contrôle isotypique négatif.

L'intensité moyenne de fluorescence (MFI) est mesurée par cytométrie de flux, après ajout d'un réactif de révélation aux tubes tests et calibrant. Grâce à ce calibrant, la MFI est convertie en nombre absolu de molécules d'AcM fixé par plaquette (ABC). Les résultats sont notés sous la forme de sABC, après soustraction de la valeur du contrôle isotypique négatif. Les anticorps étant utilisés à concentration saturante, les sABC sont considérés comme équivalents au nombre de glycoprotéines exprimées par plaquettes.

3 REACTIFS FOURNIS

- **Réactif 1** : 1 flacon de 15 mL de diluant, 10 fois concentré.
- **Réactif 2a** : 1 flacon de 200 μ L de contrôle isotypique négatif de type IgG.
- **Réactif 2b** : 1 flacon de 200 μ L d'AcM anti GMP140 (CD62P).
- **Réactif 2c** : 1 flacon de 200 μ L d'AcM anti GpIIb (CD41).
- **Réactif 2d** : 1 flacon de 200 μ L d'AcM anti GpIb (CD42b).
- **Réactif 3** : 1 flacon de 200 μ L de suspension de billes calibrées, recouvertes de quantités croissantes et définies d'IgG. Le nombre de déterminants portés par chaque population de bille est indiqué sur le papillon de calibration inséré dans la trousse. Ces valeurs peuvent varier de lot à lot.
- **Réactif 4** : 1 flacon de 0,9 mL de réactif de révélation, anticorps polyclonal anti IgG de souris couplé au FITC.
- **Réactif 5** : 1 flacon de TRAP, lyophilisé (60 nmoles / flacon).

4 MATERIEL AUXILIAIRE NECESSAIRE NON FOURNI

- Agitateur type Vortex.
- Chronomètre.
- Cytomètre.
- Tubes à hémolyse pour cytomètre.
- Pipettes ajustables à embouts jetables (20 μ L à 1 mL).
- Pipettes (2 à 25 mL).
- Eau distillée, eau déionisée ou eau pour préparation injectable.

5 RECONSTITUTION ET CONSERVATION DES REACTIFS

Conservés à 2-8 °C sous leur état d'origine, les réactifs sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée sur le coffret *.

• Réactif 1 **

Stabilité après ouverture : 2 mois à 2-8°C en dehors de toute contamination.

Préparer une dilution au 1/10 en eau distillée.

Préparer le volume nécessaire pour la série à tester.

Stabilité après dilution : 15 jours à 2-8°C.

• Réactifs 2a, 2b, 2c, 2d et 4

Prêts à l'emploi.

Stabilité après ouverture : 2 mois à 2-8°C en dehors de toute contamination.

• Réactif 3

Prêt à l'emploi.

Avant chaque utilisation agiter énergiquement par vortex pendant 5 secondes.

Stabilité après ouverture : 2 mois à 2-8 °C en dehors de toute contamination.

• Réactif 5

Ouvrir délicatement le flacon.

Reconstituer par 500 μ L de réactif 1 dilué.

Stabilité après reconstitution : 1 mois à 2-8°C.

Notes :

* Ne pas congeler la trousse.

** La présence d'une cristallisation n'altère en rien la qualité du réactif. Incuber préalablement, si nécessaire, à 37°C jusqu'à totale dissolution des cristaux.

6 PRECAUTIONS

- Respecter les bonnes pratiques de laboratoire.
- L'élimination des déchets sera effectuée conformément à la réglementation locale en vigueur.
- Considérer le sang comme potentiellement infectieux.
- Tous les réactifs contiennent de l'azide de sodium comme conservateur et doivent être éliminés avec précaution. Lors de l'élimination de ces solutions à l'évier, les mélanger à de grandes quantités d'eau afin d'éviter la formation d'azides métalliques qui, à forte concentration, peuvent provoquer des explosions.

7 RECUEIL ET TRAITEMENT DE L'ECHANTILLON

• Prélèvement :

- Utiliser des tubes à prélèvement en plastique non-mouillable.
- Les plaquettes devant conserver toute leur intégrité, il est impératif d'éviter tout risque d'activation durant le prélèvement (agitation, choc thermique).
- Anticoagulant : **citrate de sodium 0,109 M ou 0,129 M** (1 volume de citrate pour 9 volumes de sang).

• Traitement de l'échantillon :

- Le sang doit être conservé à température ambiante avant le test (18-25°C).
- **Laisser stabiliser l'échantillon 1 heure après le prélèvement**, avant la réalisation du test. L'échantillon peut alors être traité dans les **5 heures** qui suivent.
- Ne pas congeler l'échantillon.

8 PROCEDURE

Note : pour chacun des réactifs, le volume utilisé étant faible (20 μ L), il est impératif de délivrer celui-ci au fond des tubes.

Tous les réactifs doivent être maintenus à température ambiante pendant la réalisation du protocole.

8.1 Préparation des tubes

Sur un portoir, disposer 11 tubes en plastique numérotés T1 à T11.

- Dans le tube T1, pipeter **50 μ L** du réactif 1 dilué.
- Dans le tube T2, pipeter **50 μ L** du réactif 5 reconstitué.
- Dans les tubes T3 et T7, pipeter **20 μ L** du réactif 2a.
- Dans les tubes T4 et T8, pipeter **20 μ L** du réactif 2b.
- Dans les tubes T5 et T9, pipeter **20 μ L** du réactif 2c.
- Dans les tubes T6 et T10, pipeter **20 μ L** du réactif 2d.
- Dans le tube T11, pipeter **40 μ L** du réactif 3 après **remise en suspension par vortex**.

8.2 Activation plaquettaire

Dans chacun des tubes T1 et T2 :

- Pipeter **50 µL** de sang total.
- Homogénéiser pendant 1 à 2 secondes à l'aide d'un agitateur de type Vortex.
- Incuber **5 minutes** à température ambiante.
- Ajouter **500 µL** de réactif 1 dilué.
- Homogénéiser pendant 1 à 2 secondes à l'aide d'un agitateur de type Vortex.

8.3 Immuno-marquage des échantillons

Dans chacun des tubes T3 à T6 :

- Distribuer **20 µL** de l'échantillon dilué issu du tube T1.
- Homogénéiser pendant 1 à 2 secondes à l'aide d'un agitateur de type Vortex.

Dans chacun des tubes T7 à T10 :

- Distribuer **20 µL** de l'échantillon activé issu du tube T2.
- Homogénéiser pendant 1 à 2 secondes à l'aide d'un agitateur de type Vortex.
- Incuber les tubes T3 à T10 pendant **10 minutes** à température ambiante.

8.4 Révélation

Dans chacun des tubes T3 à T11 :

- Distribuer **20 µL** de réactif 4.
- Homogénéiser pendant 1 à 2 secondes à l'aide d'un agitateur de type Vortex
- Incuber pendant **10 minutes** à température ambiante.
- Ajouter **2 mL** de réactif 1 dilué dans chaque tube.
- Homogénéiser pendant 1 à 2 secondes à l'aide d'un agitateur de type Vortex et **placer immédiatement les tubes à 2-8°C jusqu'à l'analyse cytométrique.**

Ainsi traités, les échantillons peuvent être conservés pendant **4 heures** à 2-8°C avant l'analyse cytométrique.

8.5 Lecture cytométrique

Pour effectuer la lecture cytométrique, se reporter au protocole d'utilisation de l'appareil fourni par le fabricant.

La moyenne géométrique (Mn (x) ou GeoMean selon le cytomètre) est le paramètre statistique à relever pour la mesure de la fluorescence.

Notes : les logiciels Expo™ 32, CXP et RXP qui équipent les appareils Beckman Coulter, doivent être paramétrés sur OFF pour la fonction Baseline Offset.

Avant l'analyse, homogénéiser les tubes à l'aide d'un agitateur de type vortex.

• Analyse de la gamme de calibration : tube T11 (Figs. 1)

Construire un cytogramme FS LOG x SS LOG. Positionner un seuil discriminant en FS Log pour éliminer les éventuels contaminants (bruit de fond de l'appareil). Dessiner une fenêtre d'analyse "CAL" autour de la population de singlets de billes (Fig. 1a).

Créer un histogramme FL1 LOG, conditionné par la fenêtre d'analyse "CAL".

Relever la MFI pour chacun des 3 pics de fluorescence (Fig. 1b : curseurs A, B et C) correspondant aux 3 populations de billes de calibration.

Analyser au moins 8 000 billes dans la fenêtre "CAL".

Pour des conditions d'analyses optimales, le pic de la 3ème bille (C) doit être positionné en FL1, au début de la 4ème décade. Pour y parvenir, ajuster le voltage du photomultiplicateur (PMT) FL1.

Le curseur A doit prendre en compte le premier canal.

Fig. 1a : Cytogramme des billes de calibration

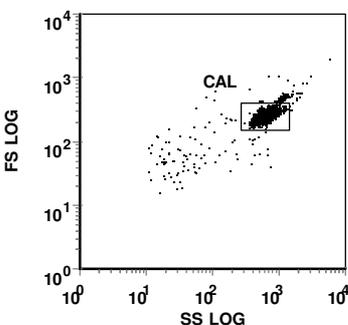
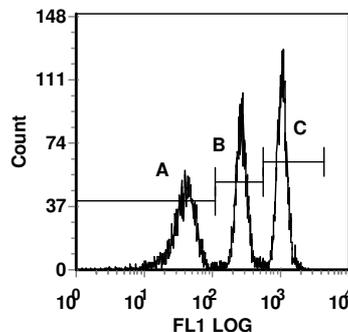


Fig. 1b : Positionnement des curseurs



• Analyse des échantillons : tubes T3 à T10 (Figs. 2)

Sans modifier le réglage de PMT FL1, analyser les tubes T3 à T10.

Sur le cytogramme FS LOG x SS LOG, isoler la population plaquettaire de l'échantillon des autres cellules sanguines par une fenêtre d'analyse "PLT" (Fig. 2a). Vérifier que le seuil de détection choisi précédemment laisse apparaître la totalité du nuage de plaquettes. **Analyser au moins 3 000 événements dans la fenêtre "PLT".**

Sur l'histogramme de fluorescence conditionné par la fenêtre "PLT", relever la MFI pour chaque échantillon analysé (Figs. 2b et 2c).

Une analyse correcte doit contenir **au moins 50% de cellules positives** dans la fenêtre "PLT" (Fig. 2c).

Pour les marqueurs faiblement exprimés (contrôle isotypique négatif, GMP140 état basal), la MFI est relevée pour l'ensemble des plaquettes analysées (Fig. 2b). Le curseur doit alors impérativement prendre en compte le premier canal.

Fig. 2a : Positionnement de la fenêtre

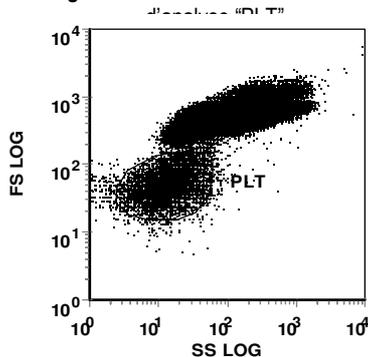
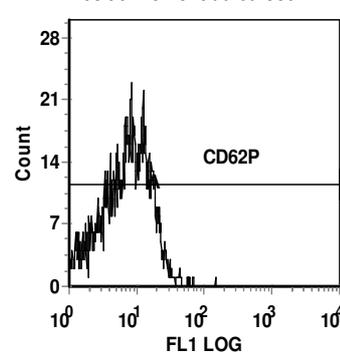
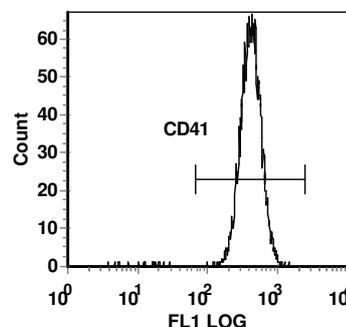


Fig. 2b : Immuno-marquage CD62P
Positionnement du curseur



Dans le cas d'antigènes fortement exprimés (GMP140 état activé, GpIb et GpIbα), seule la MFI du pic positif doit être prise en considération (Fig. 2c).

Fig. 2c : Immuno-marquage CD41 : Positionnement du curseur



8.6 Analyse des résultats

Traitement graphique ou informatique.

Porter en abscisse le LOG₁₀ des MFI des 3 billes de calibration (tube T11) et en ordonnée le LOG₁₀ du nombre de molécules correspondant, valeur indiquée sur le papillon de calibration.

Tracer la droite de calibration optimale, du type LOG₁₀(ABC) = a x LOG₁₀(MFI) + b.

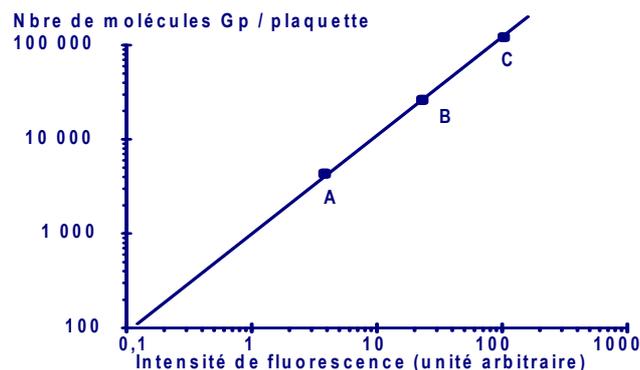
Reporter le LOG₁₀ des MFI des tubes T3 à T10 sur la droite de calibration et en déduire le nombre de molécules correspondantes (ABC : Antibody Binding Capacity).

Les valeurs quantitatives spécifiques (sABC : specific Antibody Binding Capacity) des anticorps sont obtenues après soustraction de la valeur ABC obtenue pour le contrôle isotypique négatif.

Exemple :

sABC_{CD41} = ABC_{CD41} (tube T5) – ABC_{contrôle isotypique négatif} (tube T3).

Exemple de courbe de calibration (pour un appareil Beckman-Coulter type Epics XL) :



9 INTERPRETATION DU TEST

Les valeurs quantitatives spécifiques sont calculées et comparées aux valeurs normales. **Il est recommandé à chaque laboratoire d'établir ses propres valeurs normales à partir d'une population locale de donneurs normaux, d'âge similaire aux échantillons testés.**

Valeurs établies à partir de 40 échantillons prélevés sur adultes normaux.

	Etat basal	Activation TRAP
GMP 140 (CD62P)	< 1 000	≥ 1 000
GpIIb (CD41)	51 000 +/- 14 000	85 000 +/- 27 000
GpIbα (CD42b)	38 000 +/- 11 000	19 000 +/- 10 000

Résultats exprimés en sABC.

Ces valeurs ne sont pas applicables pour des individus âgés de 0 à 18 ans.

En effet, les glycoprotéines plaquettaires sont exprimées différemment chez les enfants, et cette expression évolue tout au long de la croissance⁽⁵⁾.

Exemple de valeurs obtenues sur des échantillons diagnostiqués Glanzmann

(2) (sABC) :

		Etat basal	Activation TRAP
Homozygote 1	GMP 140 (CD62P)	< 1 000	6 000
	GpIIb (CD41)	1 300	2 000
	GpIb (CD42b)	41 000	32 000
Hétérozygote 2	GMP 140	< 1 000	11 600
	GpIIb	28 000	51 000
	GpIb	40 000	33 000
Hétérozygote 3	GMP 140	< 1 000	9 700
	GpIIb	25 000	49 000
	GpIb	31 000	13 000

Exemple de valeurs obtenues sur un diagnostic de Syndrome de Fechtner (2)

(sABC) :

	Etat basal	Activation TRAP
GMP 140 (CD62P)	< 1 000	19 200
GpIIb (CD41)	137 000	204 000
GpIb (CD42b)	111 000	43 000

10 PERFORMANCES DE LA METHODE

Le test **PLT Gp/Receptors** a été validé pour les instruments Becton-Dickinson type FACSCalibur et Beckman-Coulter types XL et XL MCL (logiciel System II™).

• Spécificité de la méthode :

La trousse **PLT Gp/Receptors** a été testée sur échantillons présentant des thrombopathies constitutionnelles. Les résultats obtenus corréleront avec les observations cliniques et les tests génétiques⁽²⁾ (3).

• Spécificité des réactifs :

L'anticorps du réactif 2a est dirigé contre un épitope non humain.

L'anticorps du réactif 2b a été décrit comme spécifique de la GMP140⁽⁶⁾.

L'anticorps du réactif 2c a été clusterisé comme CD41 (Leucocyte Typing V)⁽⁸⁾.

L'anticorps du réactif 2d a été clusterisé comme CD42b (Leucocyte Typing V)⁽⁸⁾.

• Répétabilité :

2 échantillons normaux sont testés 5 fois avec la même trousse (sABC) :

Ech.		Etat basal			Activation TRAP		
		Moyenne	ET	CV	Moyenne	ET	CV
A	GMP140	< 1 000	-	-	12 580	860	6,8 %
	GpIIb	64 350	1 970	3,1 %	110 700	6 080	5,5 %
	GpIb	44 205	1 020	2,3 %	23 210	880	3,8 %
B	GMP140	< 1 000	-	-	15 350	910	5,9 %
	GpIIb	55 720	960	1,7 %	94 570	6 780	7,2 %
	GpIb	40 810	1 190	2,9 %	22 920	1 050	4,6 %

• Reproductibilité inter-lots :

Exemple de 2 lots testés en doublet sur un même échantillon sanguin (sABC) :

		Etat basal		Activation TRAP	
		Lot 1	Lot 2	Lot 1	Lot 2
GMP140 (CD62P)	Lot 1	<1 000	<1 000	13 860	14 230
	Lot 2	<1 000	<1 000	14 630	15 010
GpIIb (CD41)	Lot 1	56 540	55 470	102 820	96 550
	Lot 2	54 570	55 230	86 470	91 920
GpIbα (CD42b)	Lot 1	36 390	37 560	20 530	22 900
	Lot 2	40 060	40 080	21 350	22 570

11 LIMITATIONS

La trousse **PLT Gp/Receptors** est utilisable uniquement dans les conditions suivantes :

- échantillon non hémolysé.
- échantillon non activé. La quantification du marqueur CD62P à l'état basal doit être inférieure à 1 000 sABC.
- échantillon non traité par un antagoniste de la GpIIb. Confirmer par la trousse PLATELET GpIIb/IIIa Occupancy (BioCytex, Réf. 7001) en cas de doute.
- échantillon ne contenant pas d'auto- ou d'allo-anticorps de spécificité anti-plaquettaire.

12 RESPONSABILITE

L'utilisation en diagnostic *in vitro* n'est valide que dans une stricte application de la notice. Toute modification ou changement ainsi qu'une utilisation de réactifs d'autres lots peut influencer les résultats des tests. Dans ce cas, aucune contestation ou remplacement du produit ne sera accepté.

13 REFERENCES

- MORAN N. *et al.*, "Surface expression of glycoprotein Ib alpha is dependent on GpIb beta: evidence from a novel mutation causing Bernard-Soulier syndrome". *Blood* (2000), 96, 532-539.
- SCHLEGEL N. *et al.*, "The interest of quantitative flow cytometry kits for the identification and characterization of inherited platelet disorders", *Blood* (1998) Suppl. 1, 92, Abst. 3367.
- SCHLEGEL N. *et al.*, "Is X-linked familial thrombocytopenia (XLT) a pure platelet variant of Wiskott Aldrich Syndrome (WAS)." *Thromb. Haemost.* (1999) Suppl. 797, Abst. 2524.
- BUNESCU A. *et al.*, "Partial expression of GpIb measured by flow cytometry in two patients with Bernard-Soulier syndrome" *Thromb. Res.* (1994), 76, 441-450.
- HEZARD N. *et al.*, "Unexpected persistence of platelet hyporeactivity beyond the neonatal period: a flow cytometric study in neonates, infants and older children". *Thromb. Haemost.* (2003), 90, 116-23.
- PARMENTIER S. *et al.*, "Inhibition of Platelet functions by a monoclonal antibody (Lyp20) directed against a granule membrane glycoprotein (GMP140 / PADGEM)". *Blood* (1991), 77, 1734-1739.
- DROUIN J. *et al.* "Compound heterozygosity for a novel nine-nucleotide deletion and the Asn45Ser Missense Mutation in the Glycoprotein IX in a patient with Bernard-Soulier Syndrome" *Am. J. of Hematol.* (2005) 78: 41-48.
- SCHLOSSMAN, S.F. *et al.* -Eds, *Leucocyte Typing V*, Oxford University Press (1995).

14 SYMBOLES

	Référence du catalogue		Utiliser jusqu'au
	Dispositif médical de diagnostic <i>in vitro</i>		Contenu suffisant pour "n" tests
	Limites de température		Code du lot
	Fabricant		

 **BIOCYTEX**

140 ch. ARMEE D'AFRIQUE
13010 MARSEILLE
FRANCE

TEL : +33 (0) 4 96 12 20 40
FAX : +33 (0) 4 91 47 24 71

Version Décembre 2018