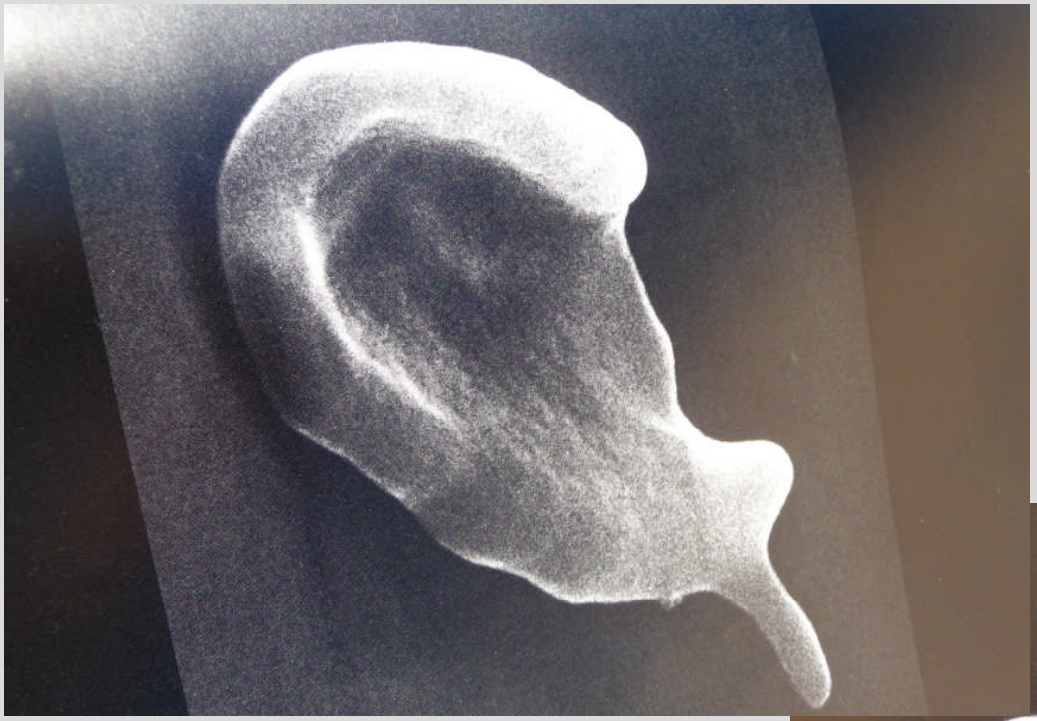
Schizocytes

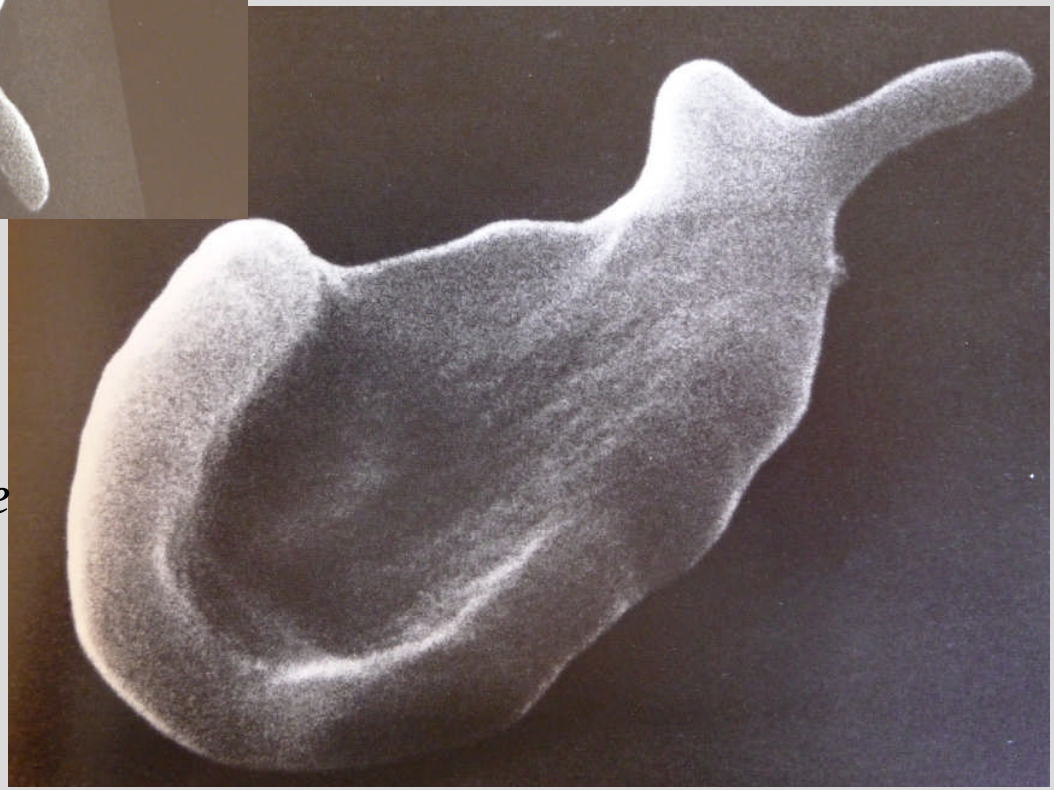
Recherche et Interprétation

Chantal Fossat,
Laboratoire d'hématologie
CHU Timone, Marseille



« σχίζειν » : cassure

« κυτε » : cellule



Marcel Bessis,
Corpuscules
Essai sur la forme des GR de l'homme
Springer International, 1976

Colloque des hôpitaux généraux,
Lille 5 Octobre 2010

- Témoin d'une fragmentation mécanique
- Présence anormale
  - Découverte orientée
  - Découverte fortuite
- Ecarter tous artéfacts
- Intégrer cette morphologie érythrocytaire dans le contexte clinico-biologique du patient

Hémolyses mécaniques par fragmentation

- **Nouveaux-Nés,**
- **Splénectomisés**
- **Grands Brulés**
- **Troubles métaboliques**
  - hyperuricémie, hypophosphatémie, hépatopathies
- **Agents chimiques, infectieux**
  - Plomb, cuivre, aluminium, champignons, venins

- **Dysérythropoïèse : constitutionnelle ou acquise**
  - **Anomalies de l'hémoglobine :**
    - β thalassémie
  - **Anomalies de la membrane :**
    - Elliptocytose (nouveau-né)
    - Déficit protéine 4.1
    - Défaut de tétramérisation de la spectrine
  - **Carences en fer, en vitamines**
  - **SMP, SMD, myélofibroses, leucémies**

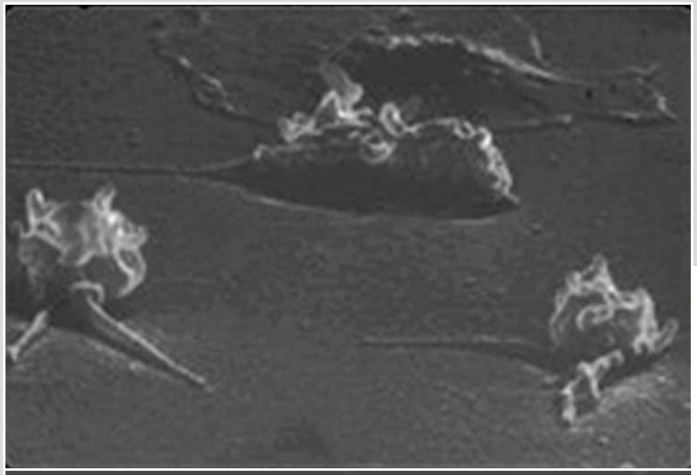
- **Macro-angiopathies**

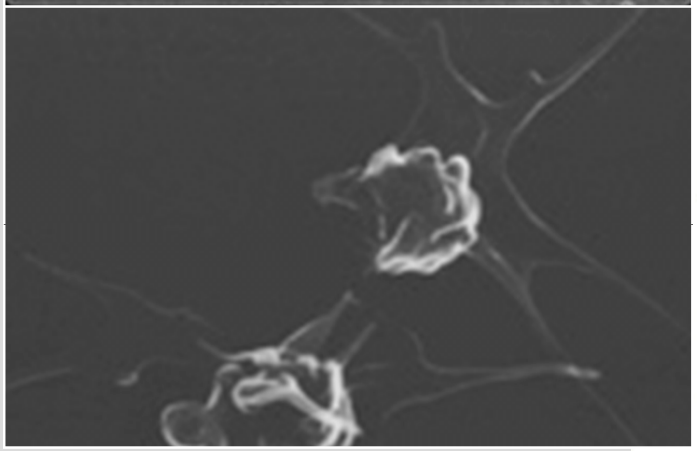
- Prothèse vasculaire, valvulaire
- Pathologie vasculaire, valvulaire non opérée
- Circuit de dialyse, de CEC
- Chocs palmoplantaires répétés

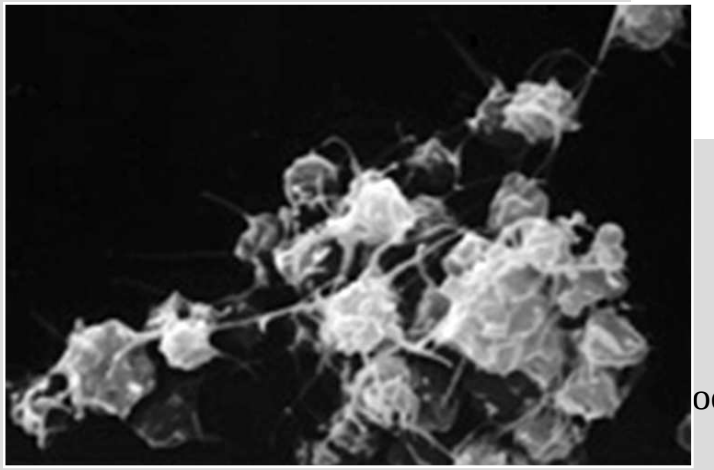
- **Micro-angiopathies**

- Sur des agrégats plaquettaires
- Sur filaments de fibrine

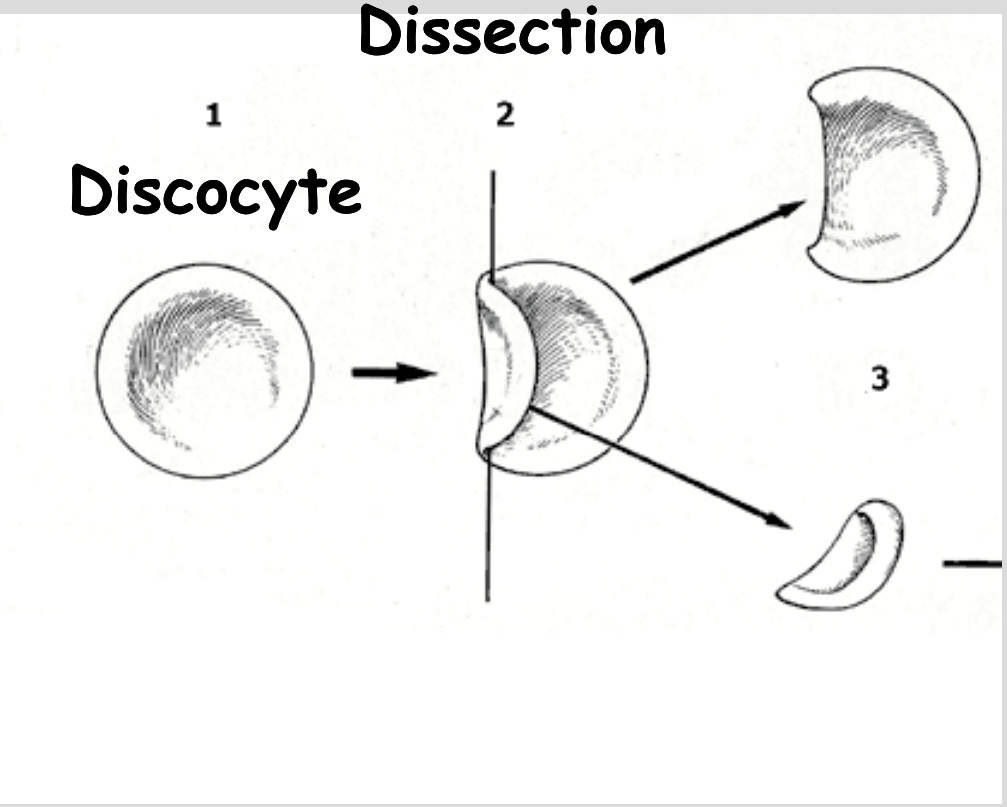
- **Formes idiopathiques**
- **Formes secondaires**







Dissection



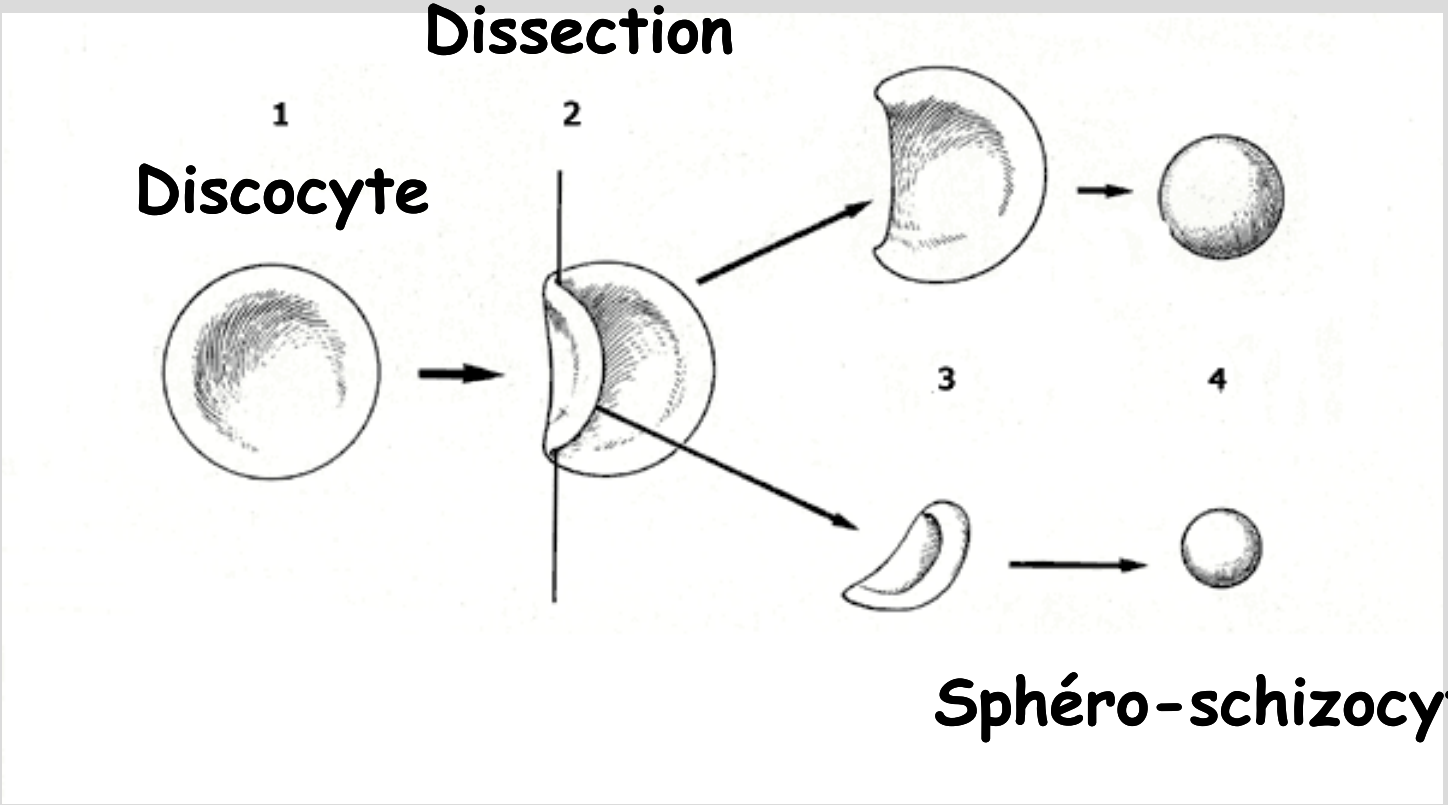
Devenir d'un schizocyte

- Sphérisation par vieillissement :

sphéro-schizocytes

- Destruction splénique

Dissection



Sphéro-schizocyte

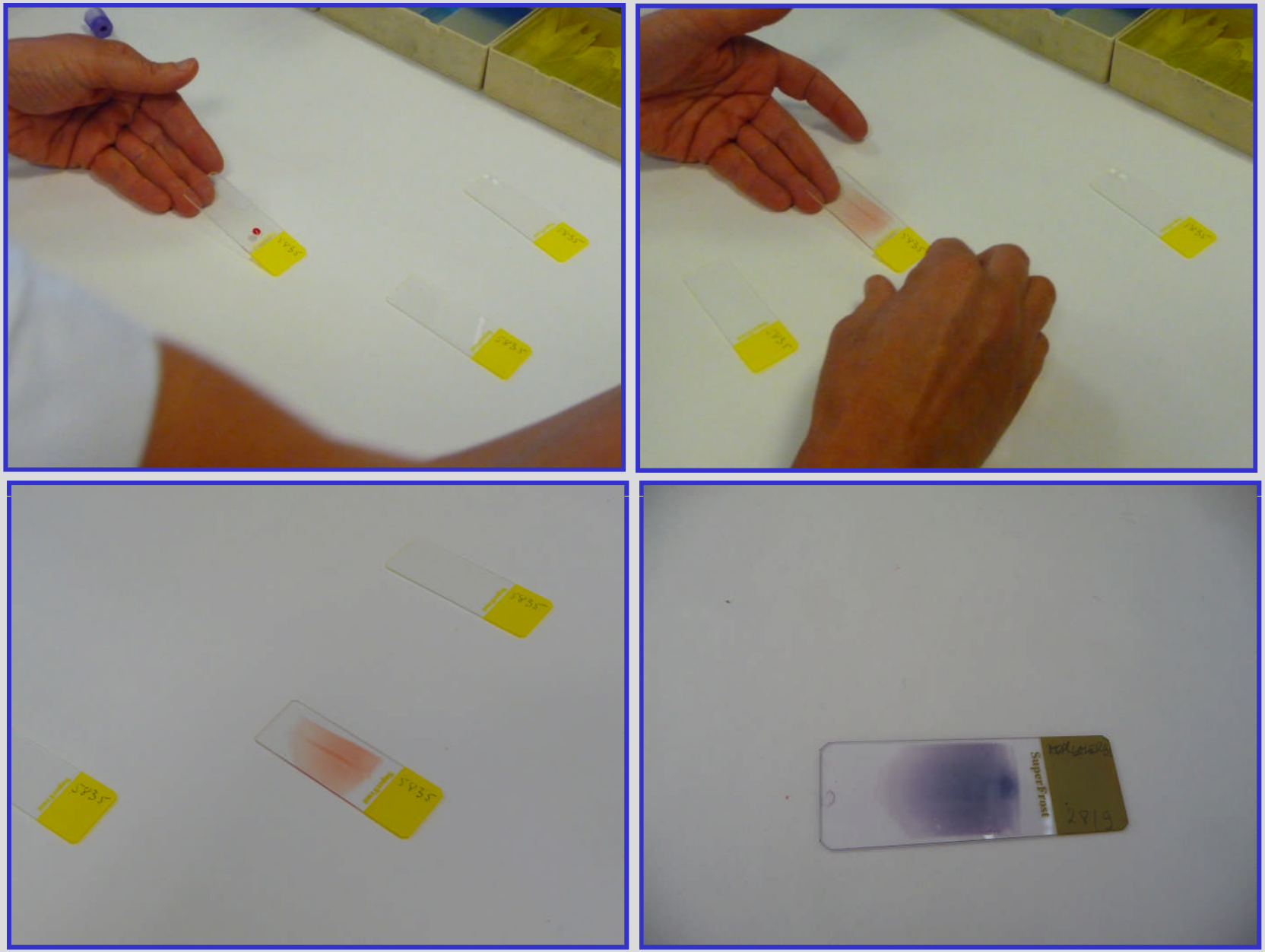
Identification

- Automates : Technique de dépistage
- Microscope : Technique de référence

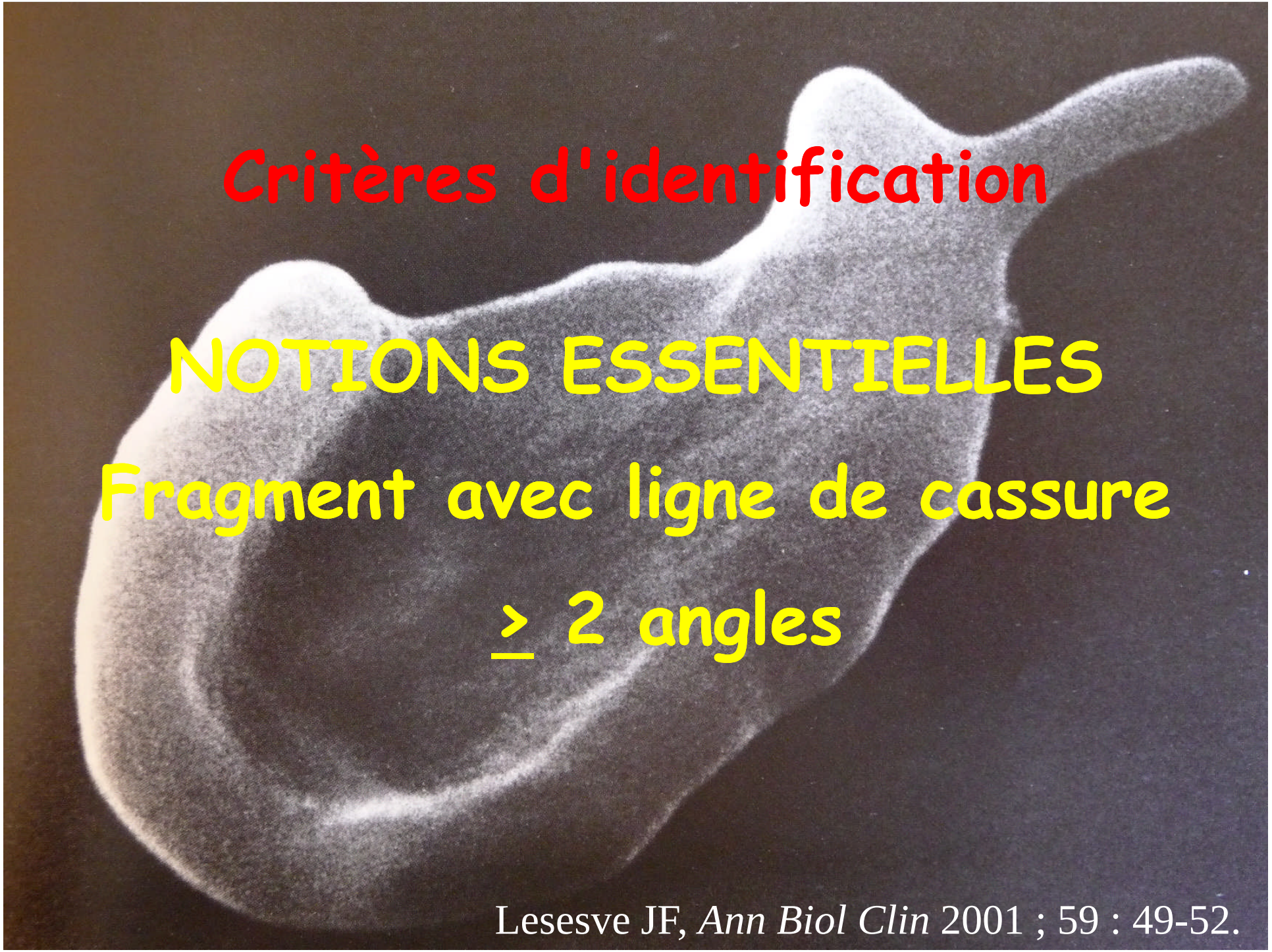
Microscopie optique

- Frottis sanguin coloré au M.G. G pH6,8

- Frottis : 5µl sang EDTA
- Lecture : 2/3 externe du frottis
- Objectif 50X : Double décompte
  5000 Hématies

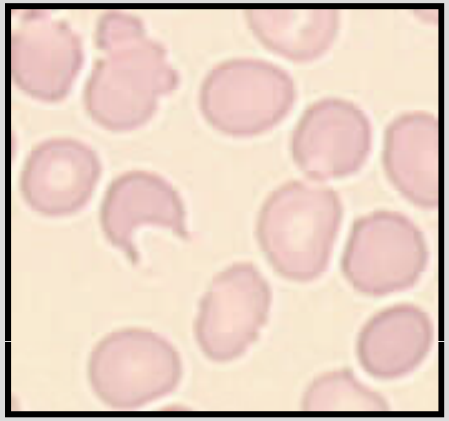
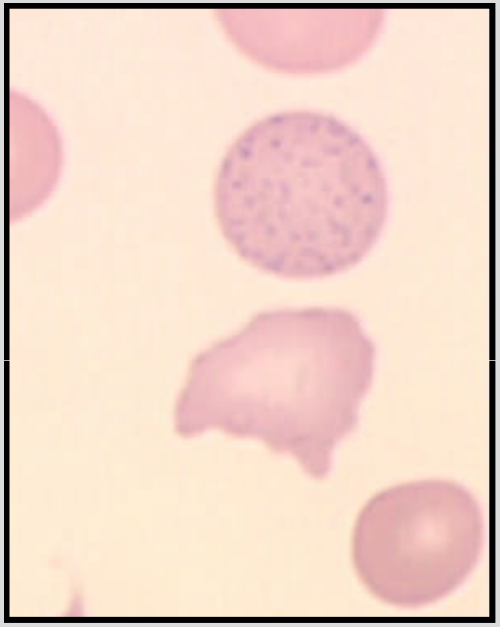
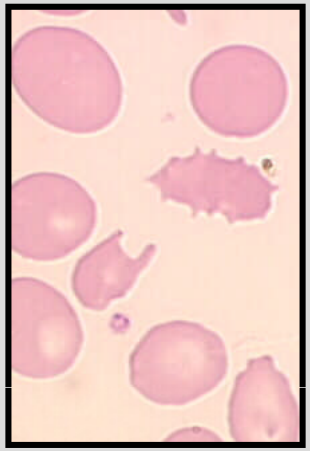
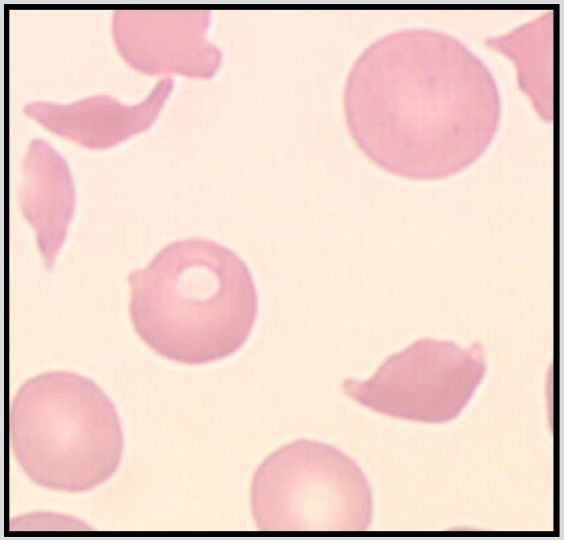
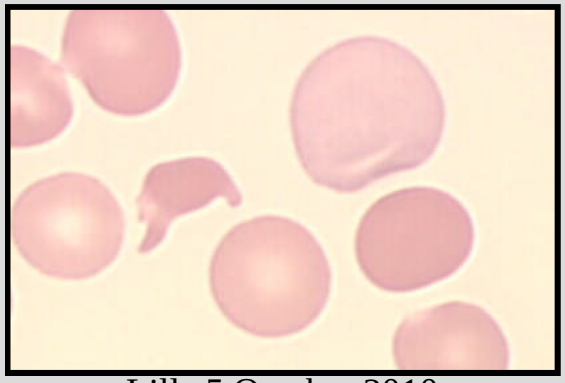
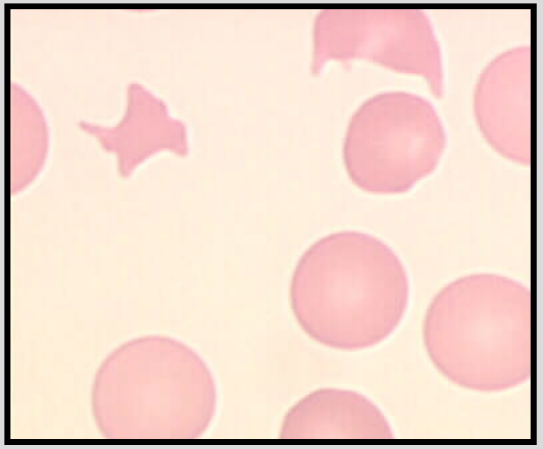


Colloque des hôpitaux généraux,
Lille 5 Octobre 2010

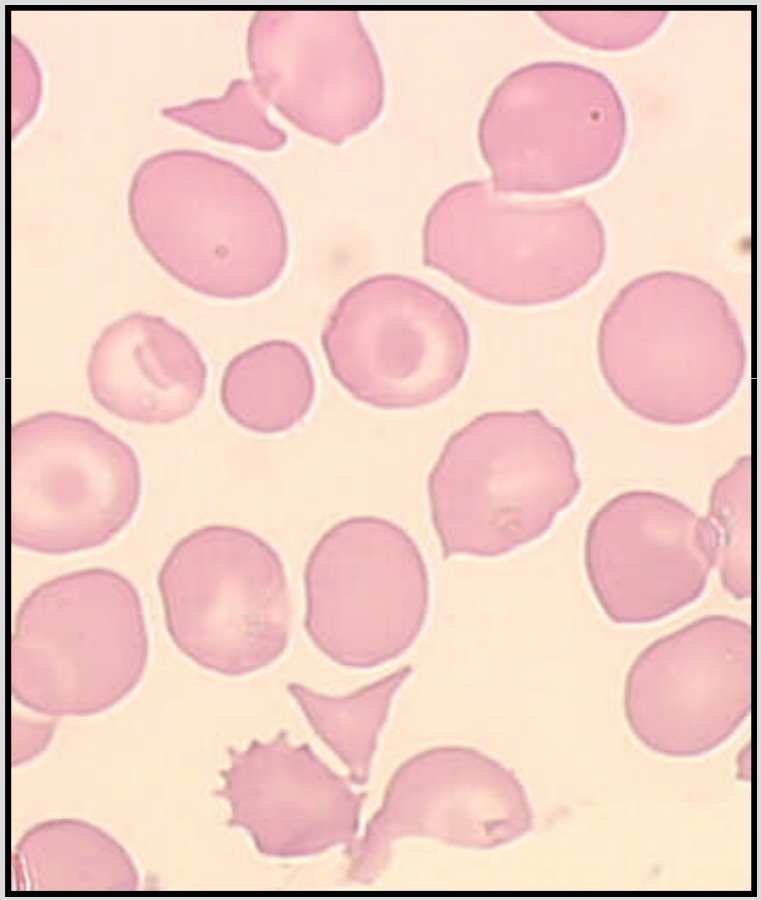


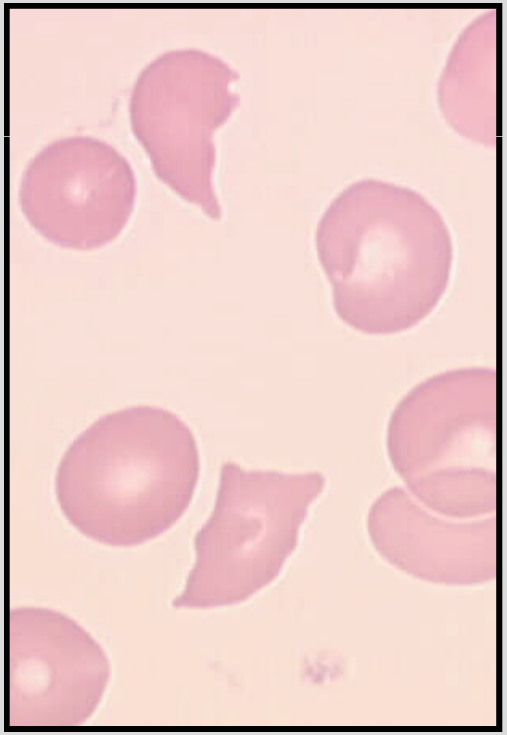
Lesesve JF, *Ann Biol Clin* 2001 ; 59 : 49-52.

Tête de chat

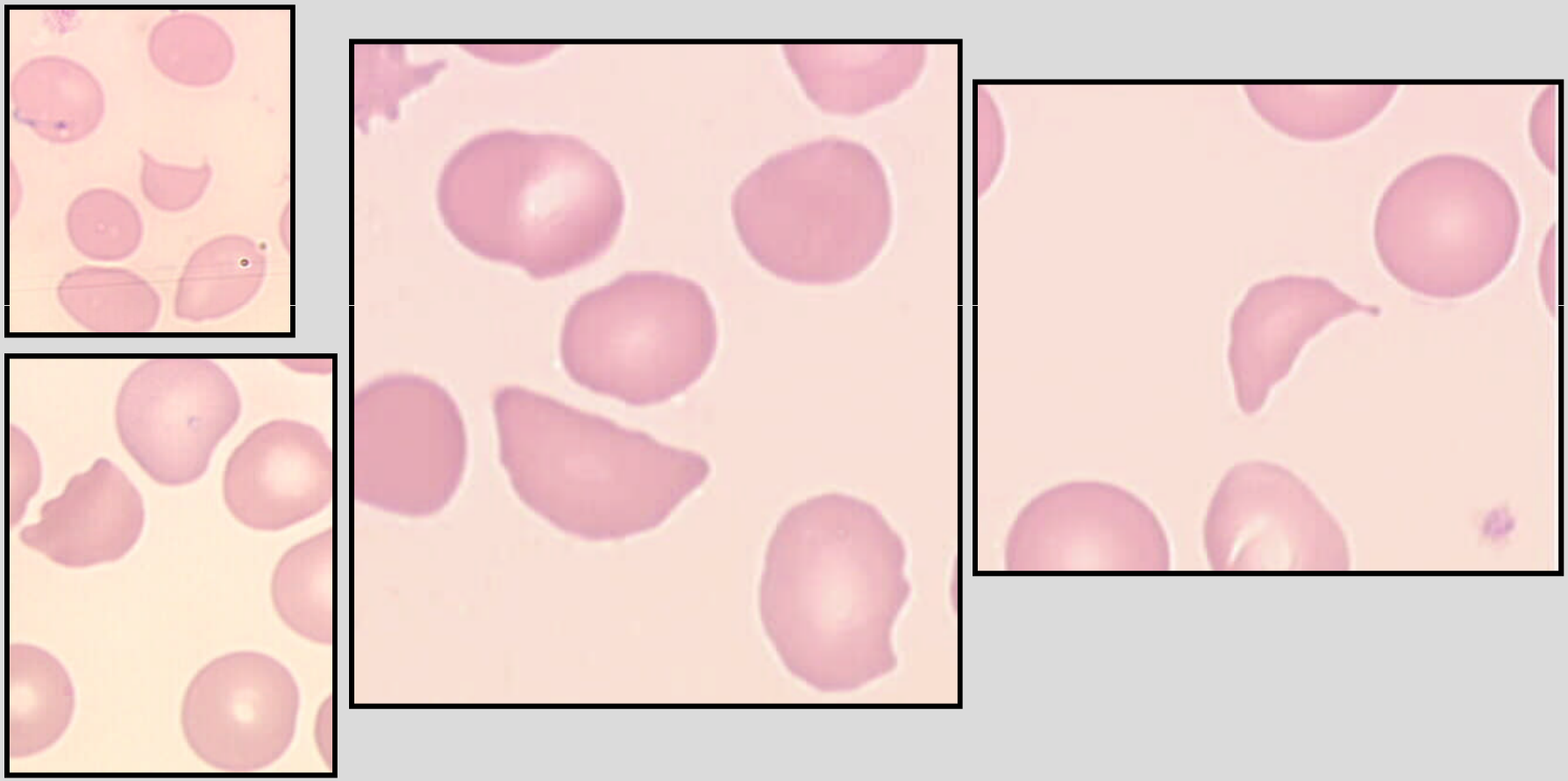
Formes en triangle





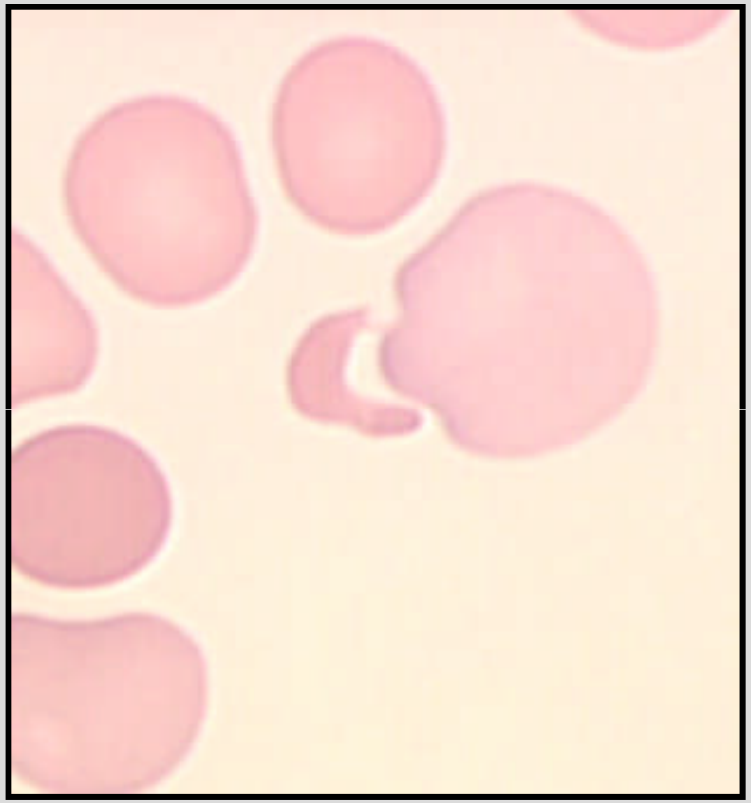
Colloque des hôpitaux généraux,
Lille 5 Octobre 2010

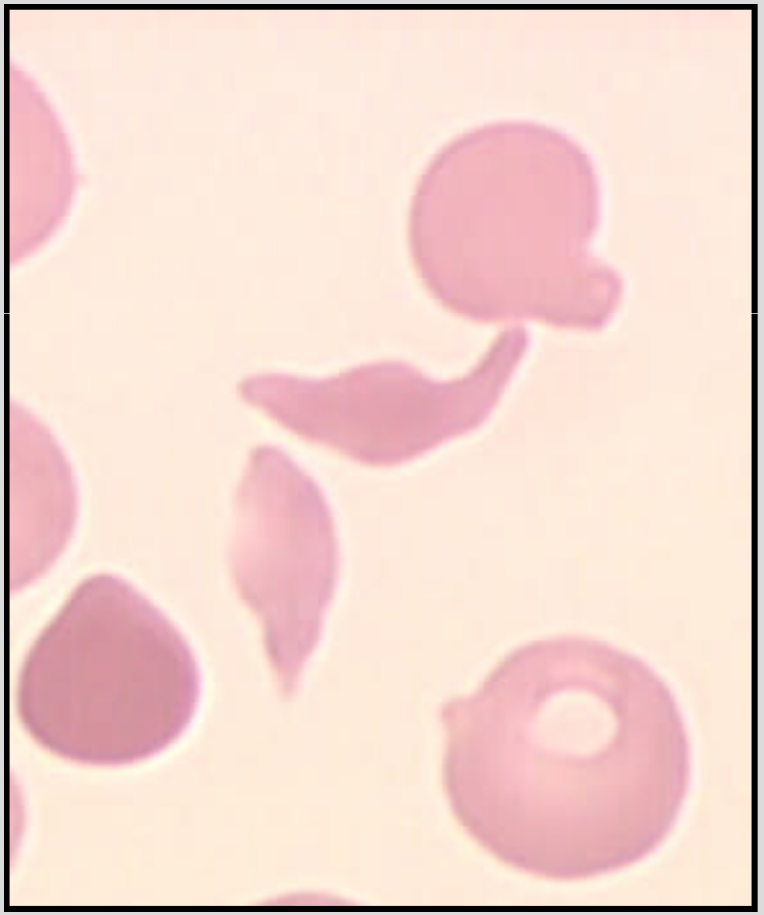
Formes en casque
Chapeau de gendarme



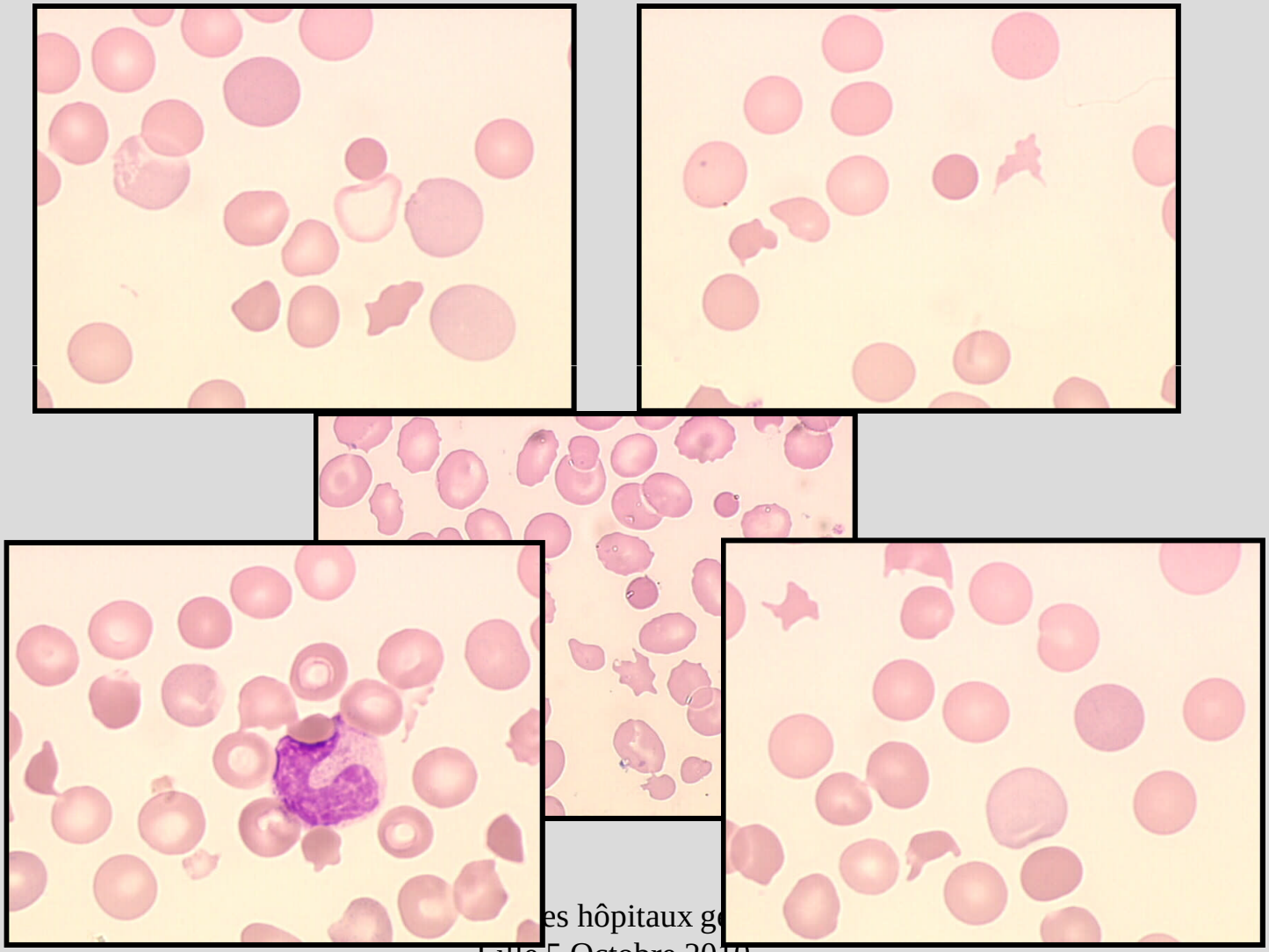
Colloque des hôpitaux généraux,
Lille 5 Octobre 2010

En croissant de lune



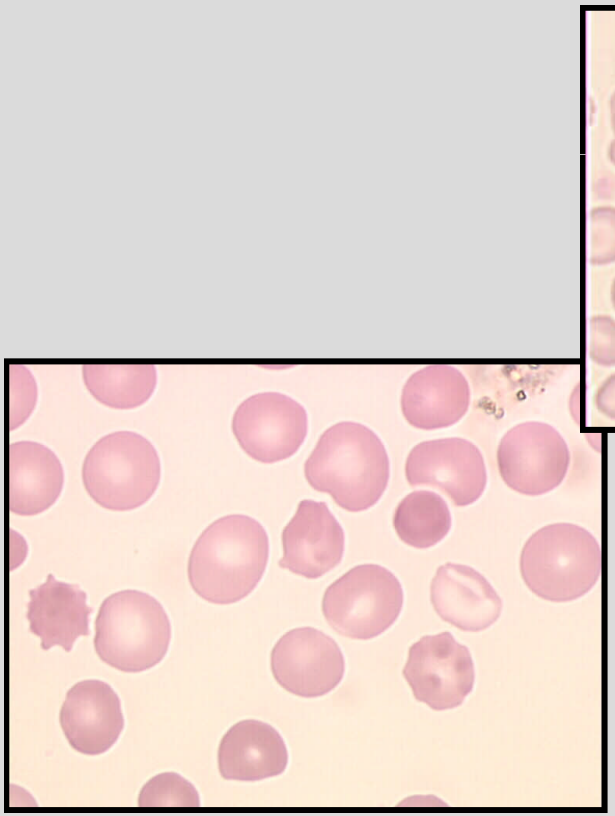


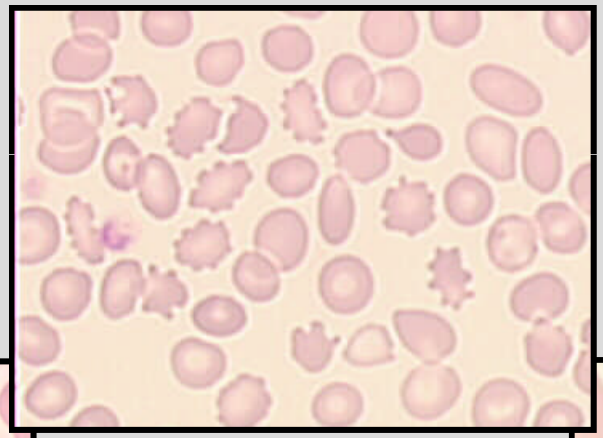
Sphéro-schizocytes

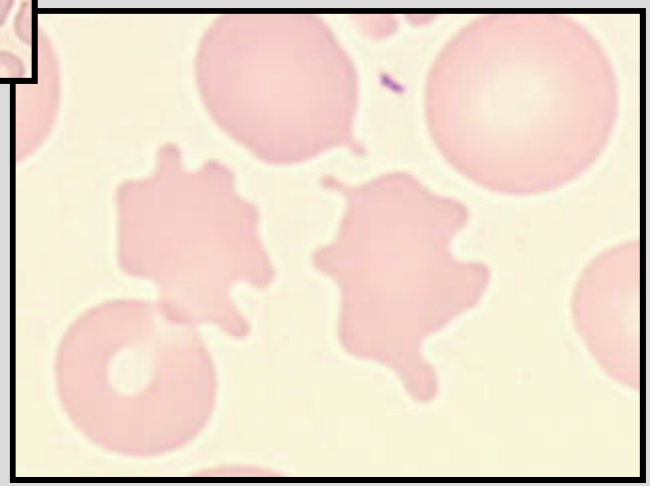


A rejeter

- Hématies spiculées, crênelées,



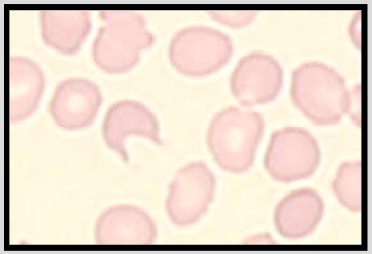


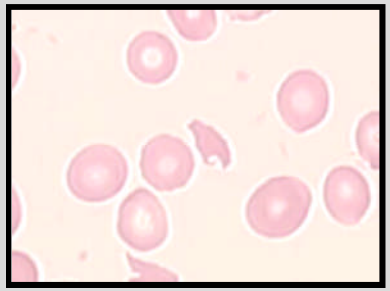


A discuter

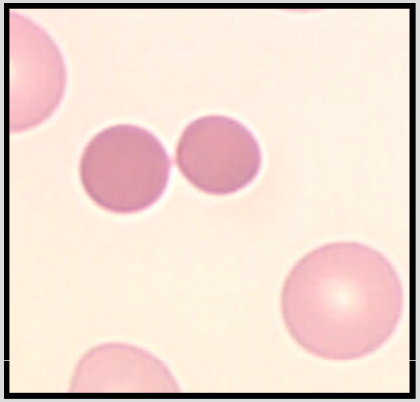
- hématies mordues : kératocytes,
- hématies de taille diminuée,
- hématies déformées,
- hématies en bâtonnet

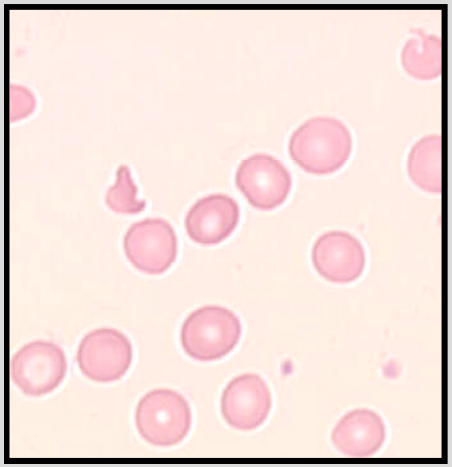
kératocyte



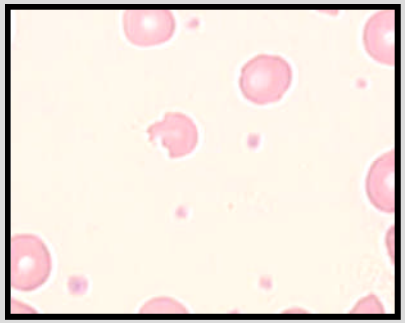


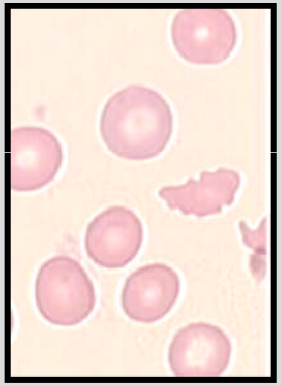
Diminuée

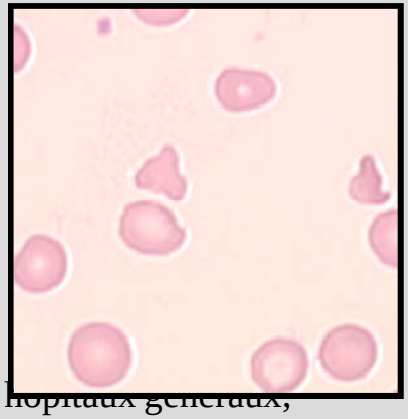




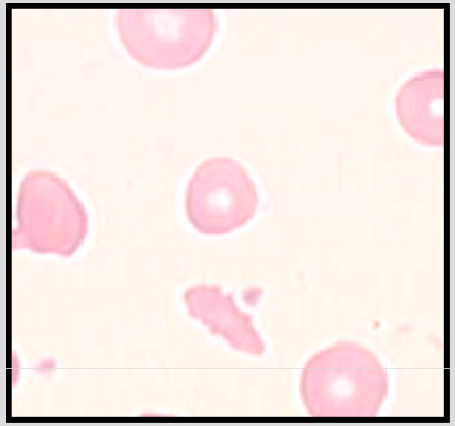
Déformée

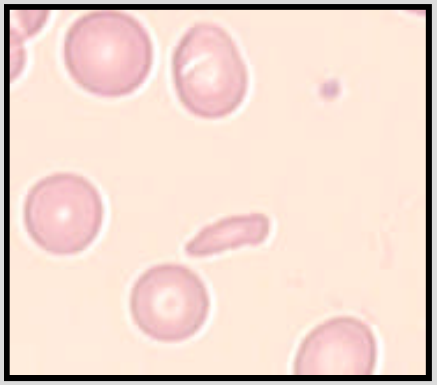






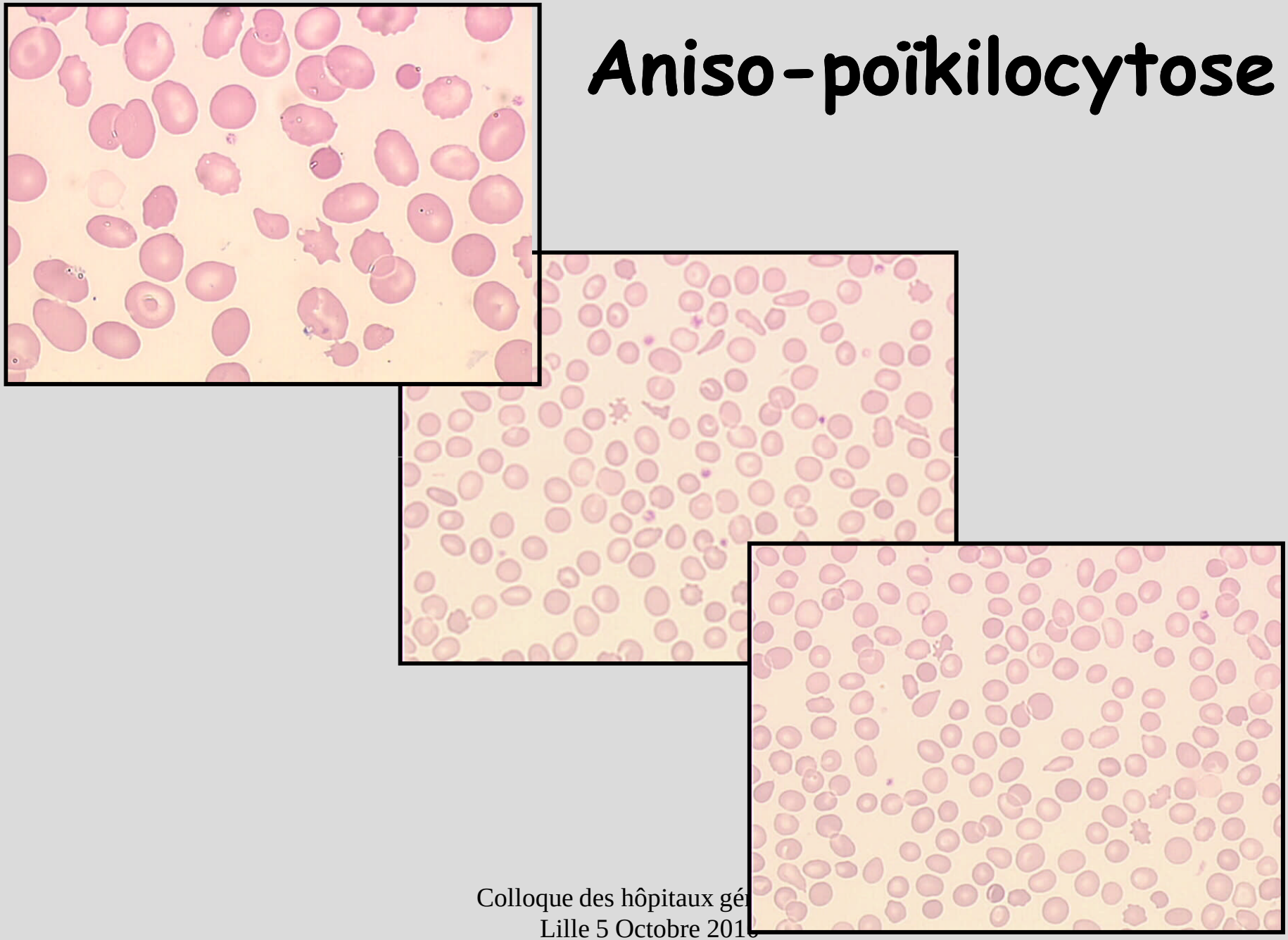
En bâtonnet



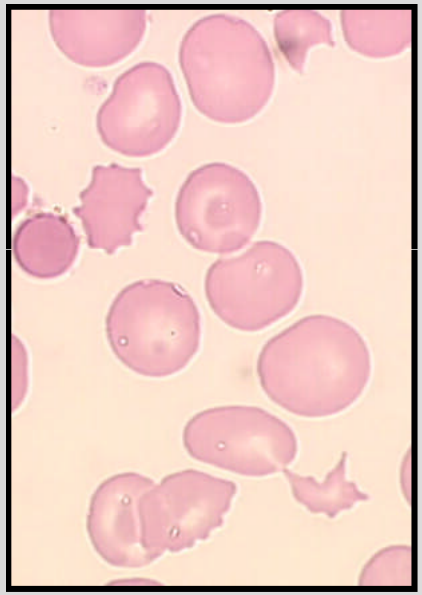


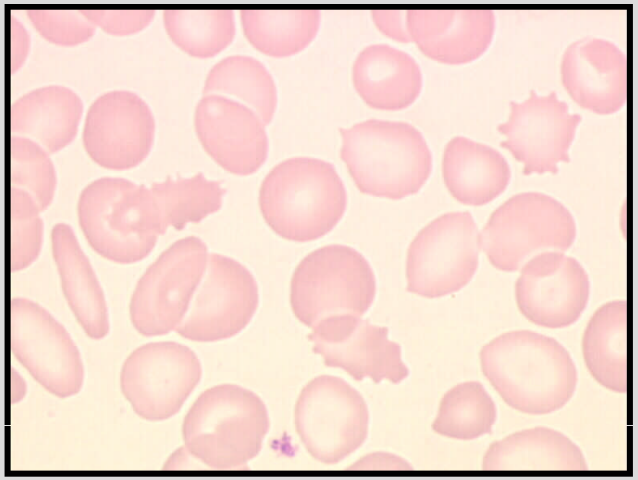
- les artéfacts et les risques d'erreur au cours de certaines situations sont nombreux

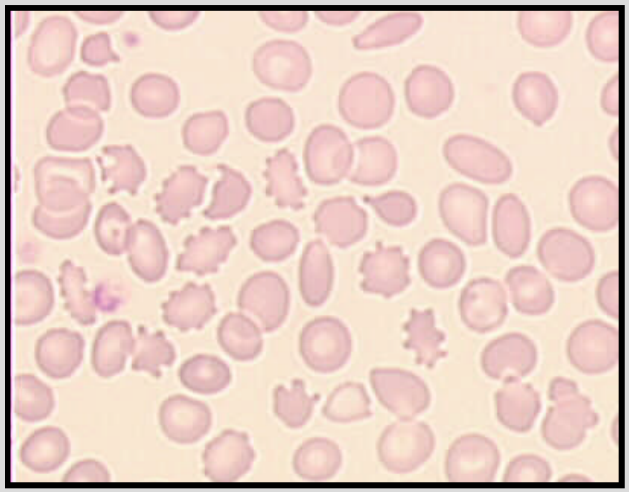
Aniso-poïkilocytose

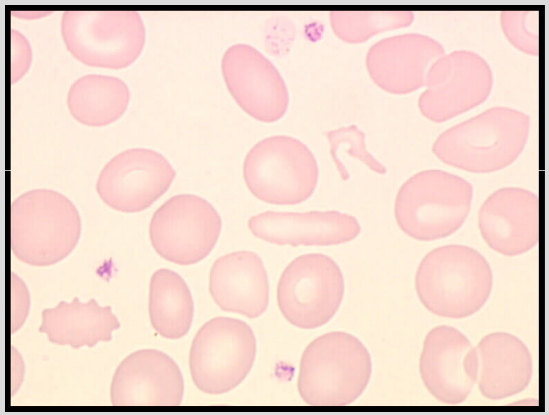


Acanthocytes



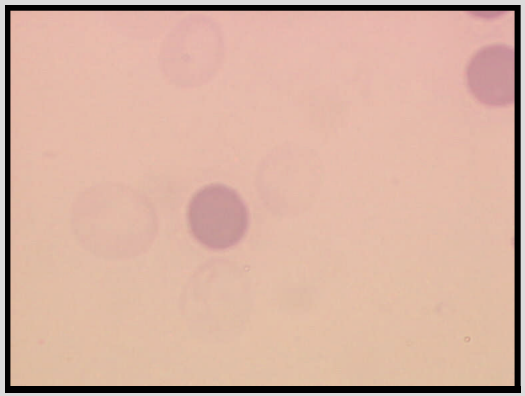


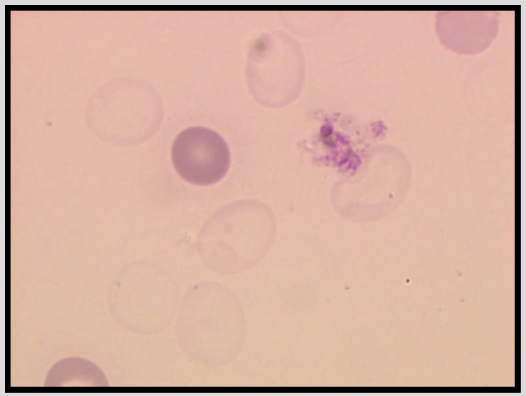


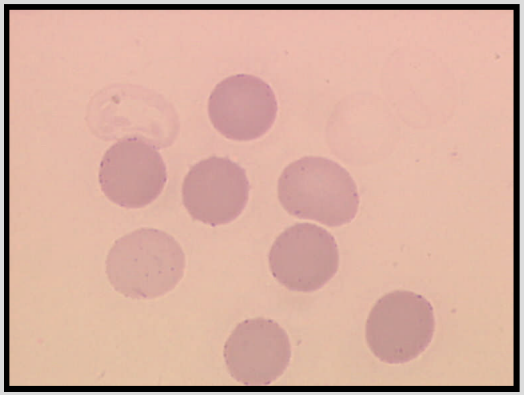


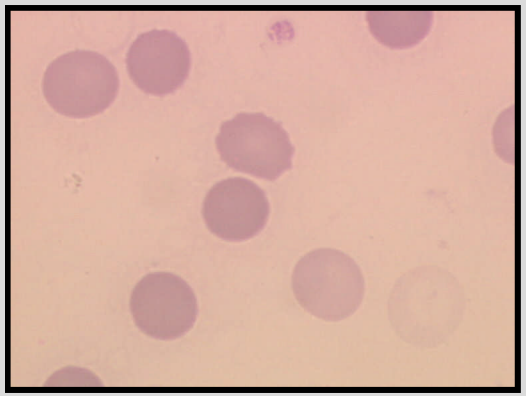
Colloque des hôpitaux généraux,
Lille 5 Octobre 2010

Gr fantômes

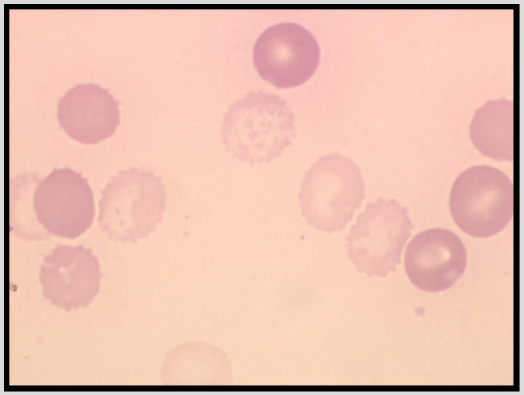


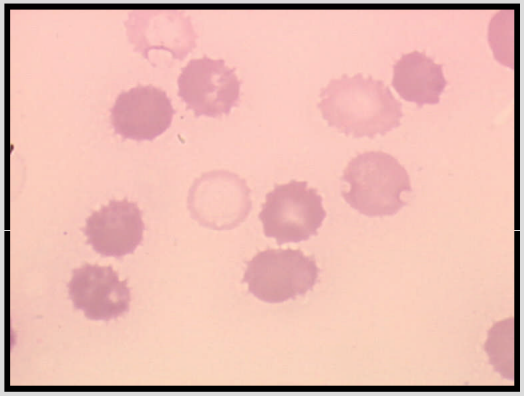


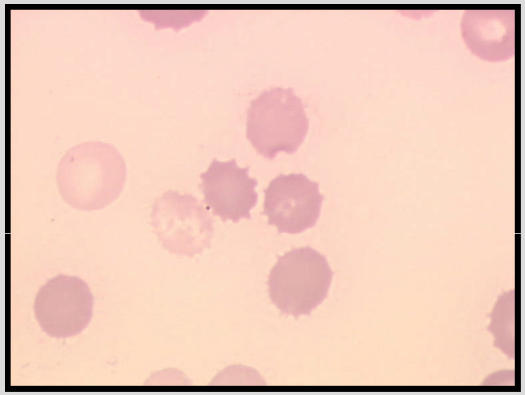


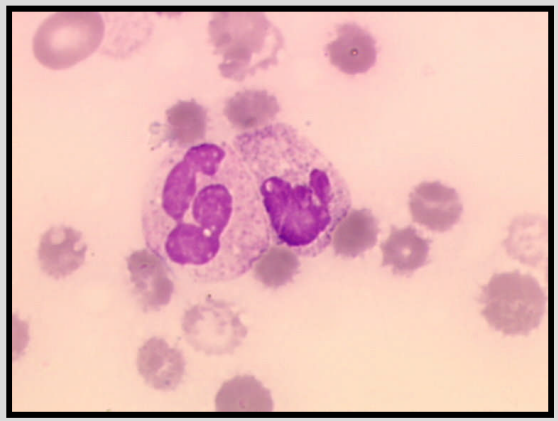


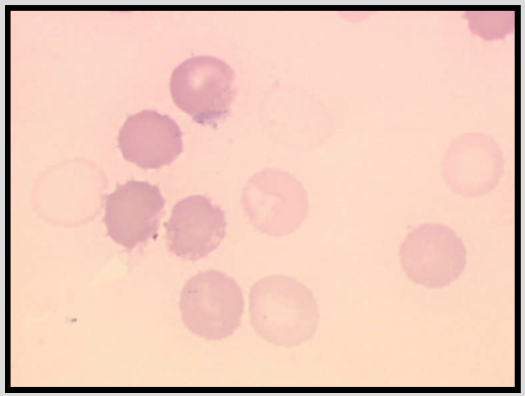
Echinocytes



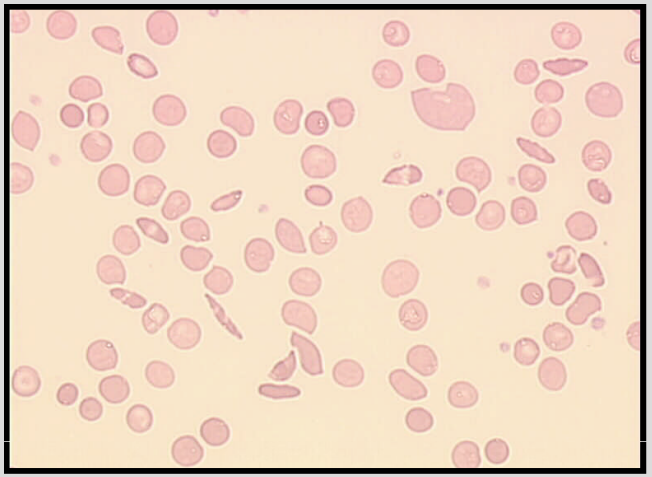


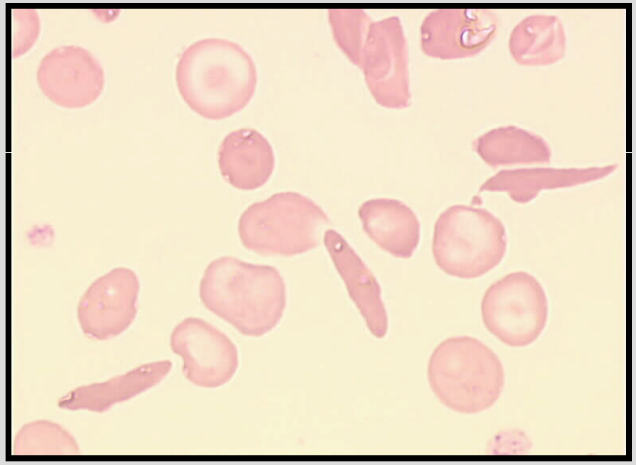


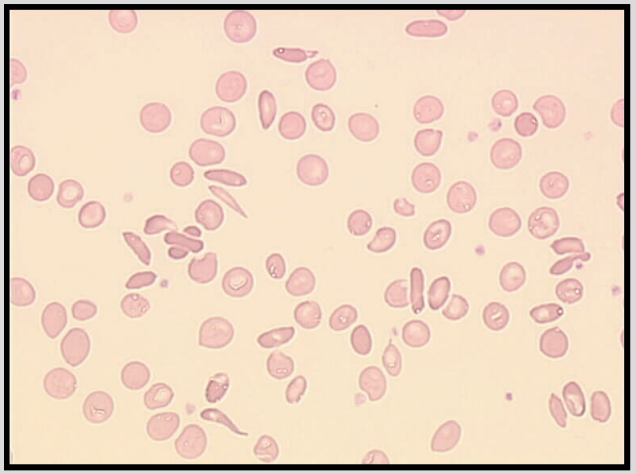




Drépanocytes

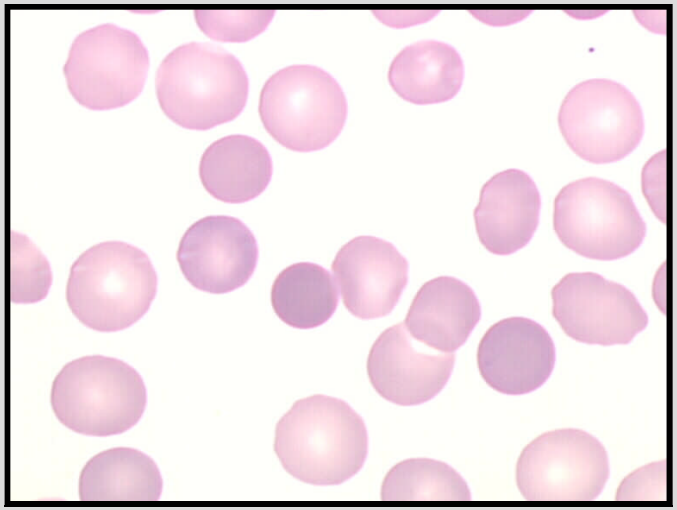


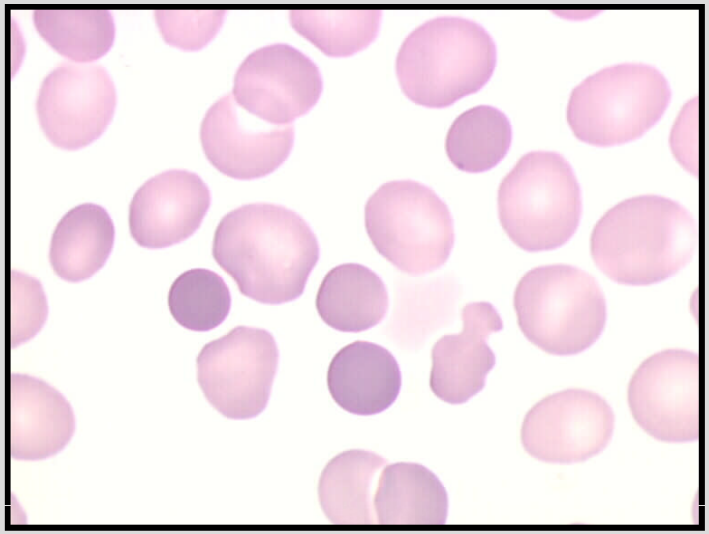


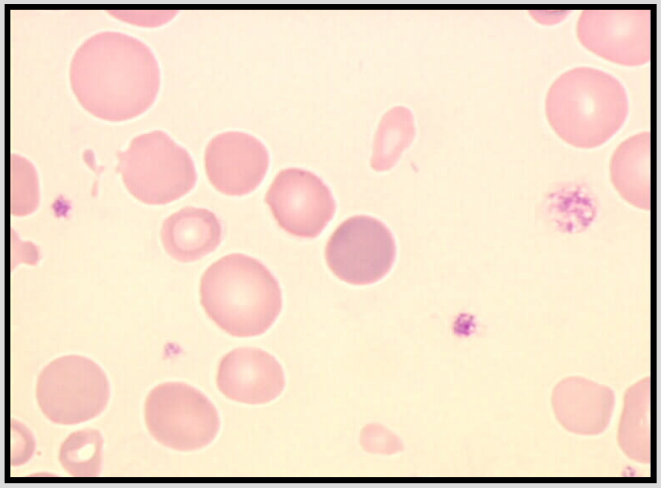


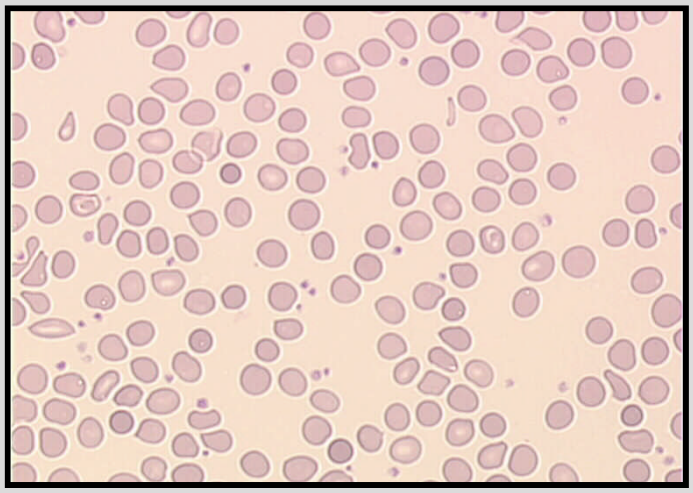
Colloque des hôpitaux généraux,
Lille 5 Octobre 2010

Sphérocytes

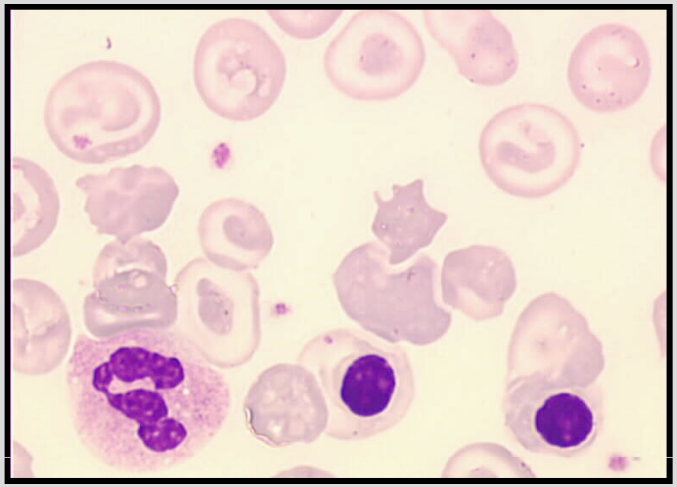


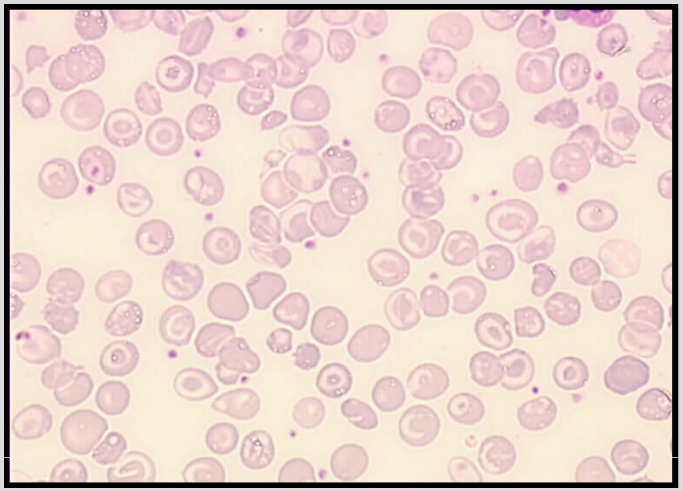


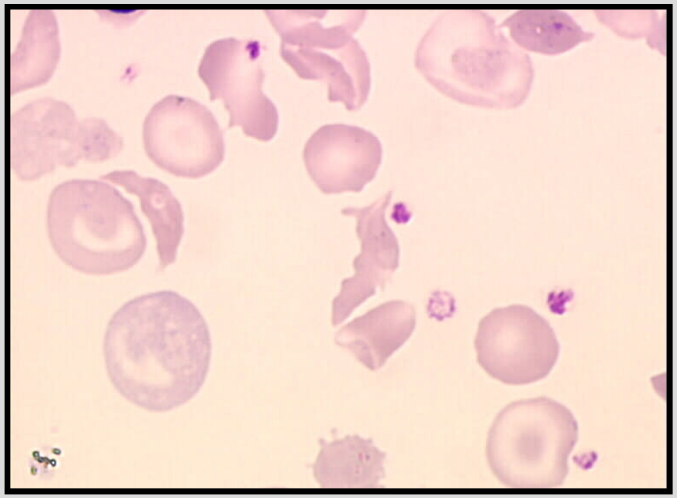


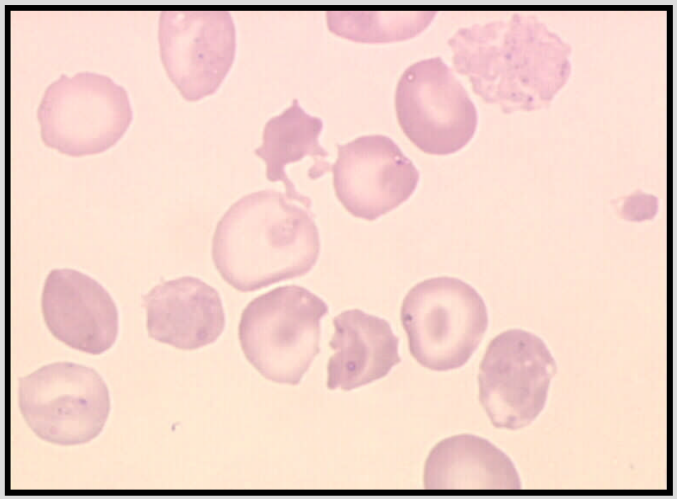


Cellules Cibles

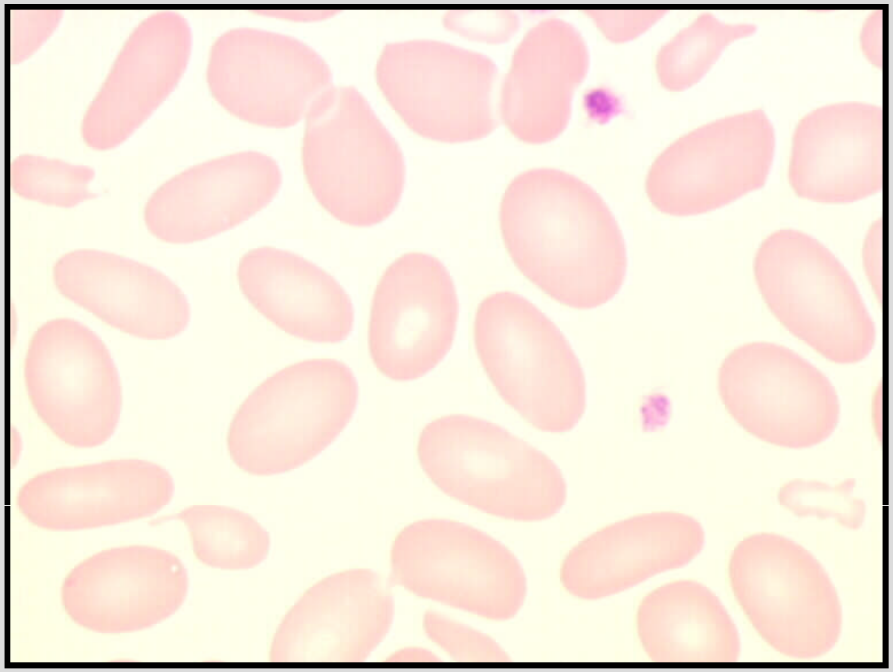


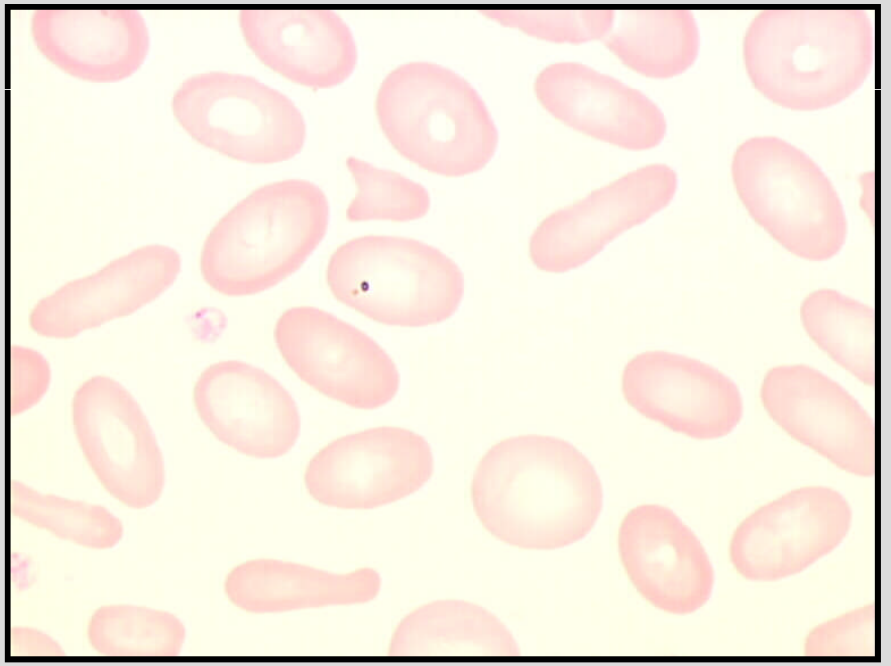






Elliptocytes





Risques d'erreur

- En queue de lame : sphérisation de GR
- Seuil de détection : 0,2%

article original

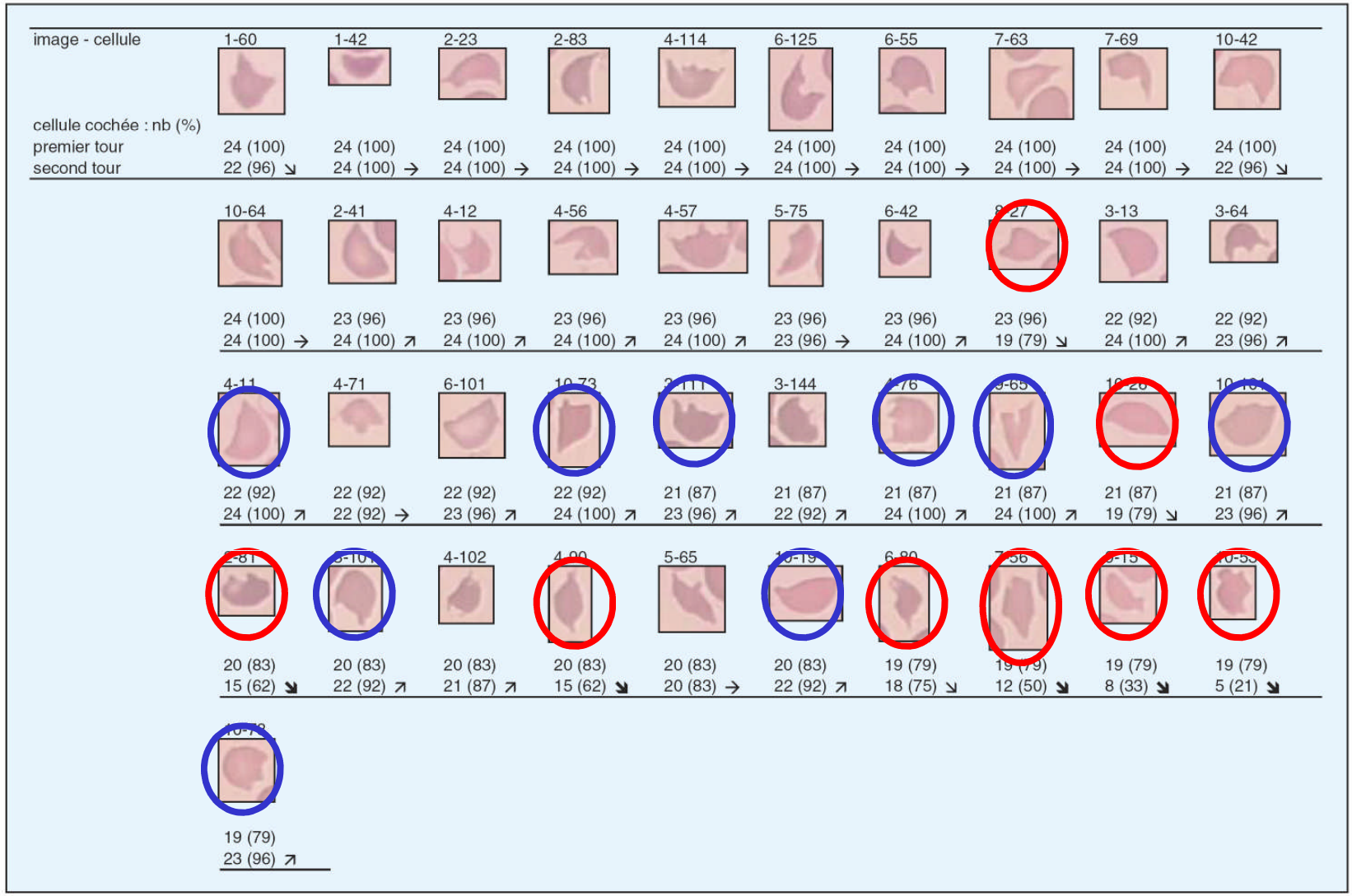
abc

Ann Biol Clin 2005 ; 63 (3) : 279-89

Schizocytes : reproductibilité du diagnostic morphologique et intérêt de méthodes observateur-indépendantes

J.-F. Lesesve[1]
T. Lecompte[1]
F. Alla[2]
O. Fenneteau[3]
T. Cynober[4]
J.-P. Siest[5]
X. Troussard[6]
G. Flandrin[7],
et le Groupe français d'hématologie cellulaire (GFHC)*

Colloque des hôpitaux généraux,
Lille 5 Octobre 2010



Lesesve J F, *Ann Biol Clin, 2005, 63,3,279-289*

Colloque des hôpitaux généraux,
Lille 5 Octobre 2010

Image	Schizocytes			
	Minimum (n)	Maximum (n)	Moyenne (%)	Écart-type (%)
1	1	7	4,0	4,2
2	2	7	4,5	3,5
3	5	13	9,0	5,7
4	5	19	12,0	9,9
5	2	6	4,0	2,8
6	3	15	9,0	8,5
7	0	7	3,5	4,9
8	0	6	3,0	4,2
9	0	10	5,0	7,1
10	4	11	7,5	4,9

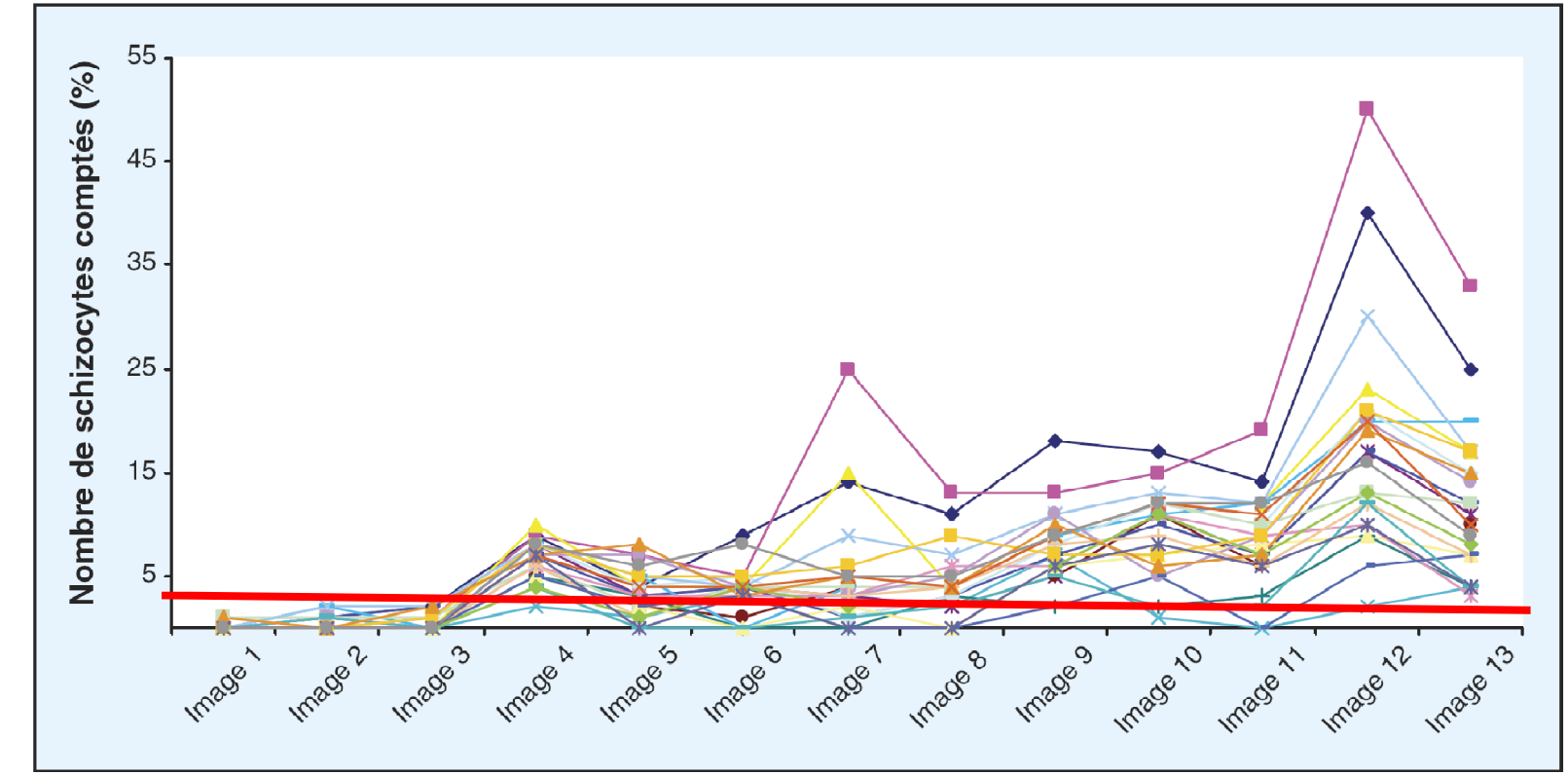


Figure 1. Enquête sur la numération des schizocytes : pourcentages sur 13 photographies comptés par 10 biologistes spécialisés et 14 biologistes polyvalents (variation inter-observateur).

article original

abc

Ann Biol Clin 2005 ; 63 (3) : 279-89

Schizocytes : reproductibilité du diagnostic morphologique et intérêt de méthodes observateur-indépendantes

J.-F. Lesesve[1]
T. Lecompte[1]
F. Alla[2]
O. Fenneteau[3]
T. Cynober[4]
J.-P. Siest[5]
X. Troussard[6]
G. Flandrin[7],
et le Groupe français d'hématologie cellulaire (GFHC)*

Colloque des hôpitaux généraux,
Lille 5 Octobre 2010

Les Automates d'hémocytométrie

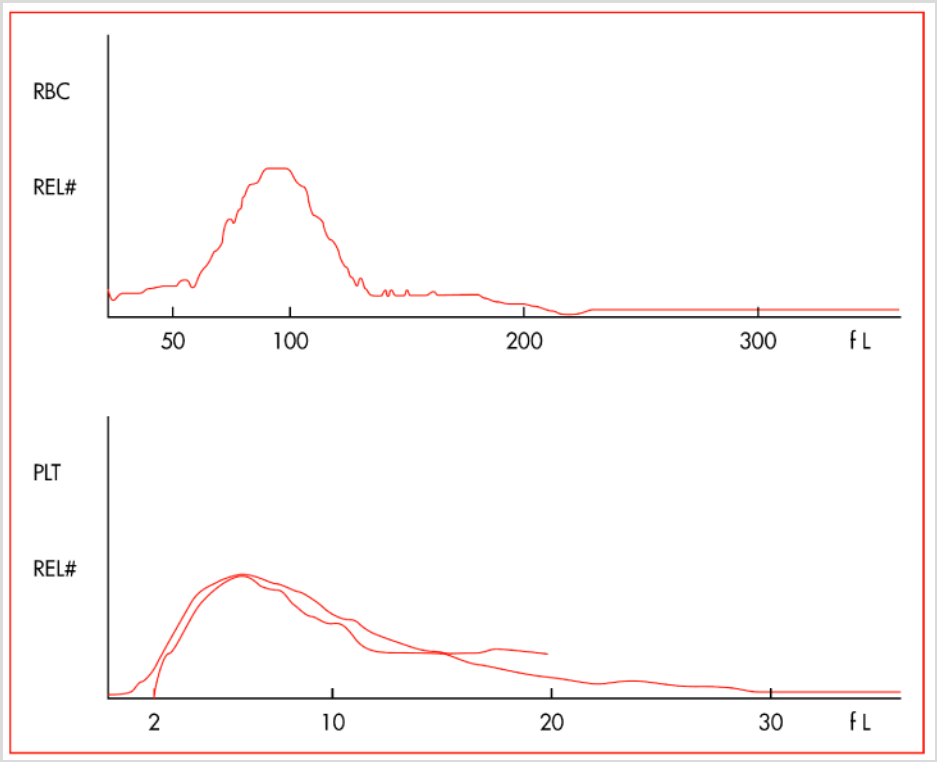
- Sensibilité <100%
- Spécificité <100%

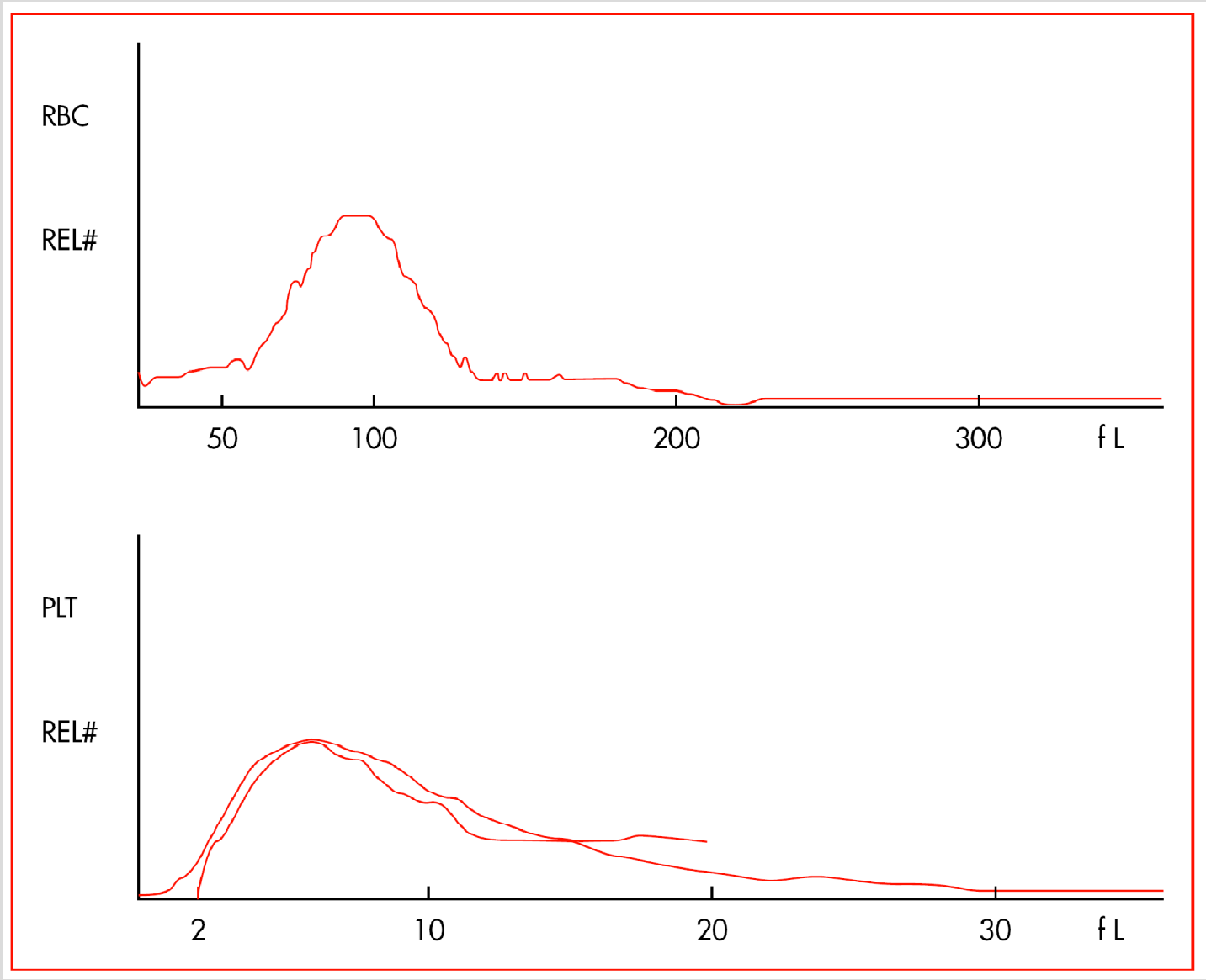
- Evaluation incomplète

- Avantages : Grand nombre d'évènements analysés

Principes de détection

- Alarme de Volume :
  - 3-30fL
  - 1-60fL





Colloque des hôpitaux généraux,
Lille 5 Octobre 2010

Principes de détection

- Alarme de Volume : 3-30fL
  1-60fL
- Alarme de Contenu :
  Indice de réfraction
  ARN

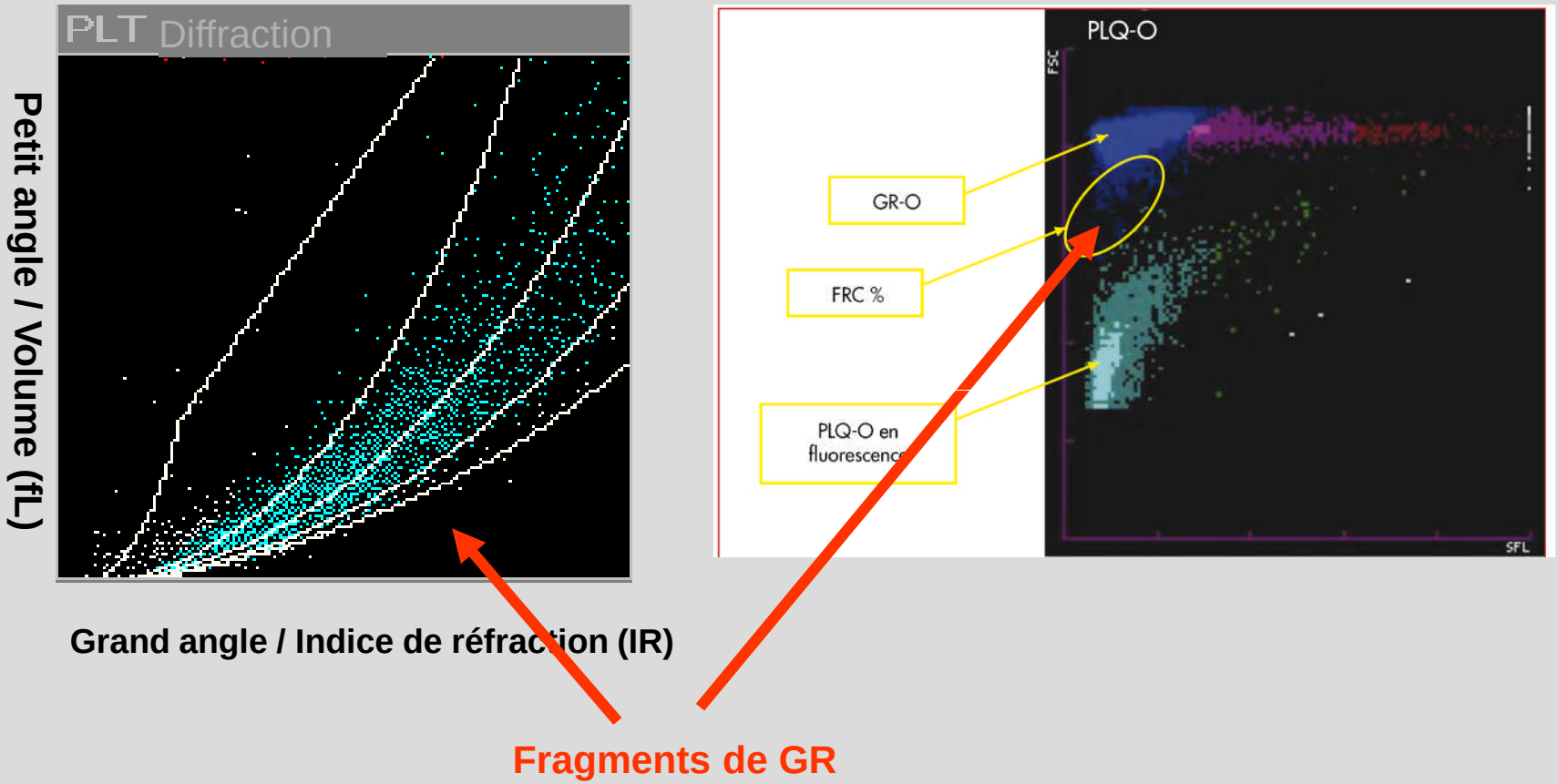


Figure 3. Cytogramme érythrocytaire et plaquettaire (technologie Roche Sysmex, XE 2100). Zone correspondant aux FRiC (*fragmented red cells*).

Risques d'erreur

- Hyperplaquettose
- Plaquettes >12fL
- Fragment cytoplasme
- Cryoglobuline
- ……

Dépistage par les Automates

- Abbot
- ABX
- Beckman-Coulter
- Siemens
- Sysmex

Abbot - cell dyn sapphire

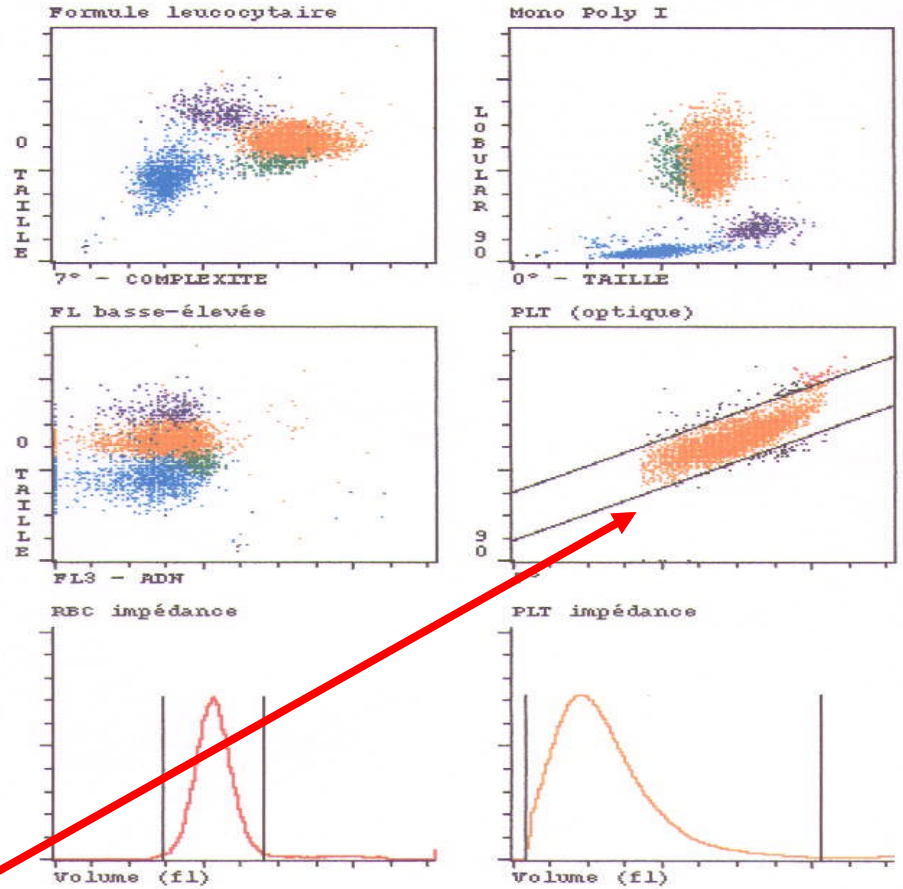
- Canal GR/Plaq
- Impédance et optique par analyse d'une lumière polarisée à 2 angles

- Alarme de morphologie
- Liée aux courbes de distribution de volume plaquettaire

ECHANTILLON NORMAL

CELL DYN 4000 / CELL DYN SAPPHIRE

X-B 2 Out	WBC 2 Out		RBC In	PLT In	RETC In
WBC	8.36	10e3/ul	WVF	.994	
NEU	5.40		%N	64.6	
LYM	2.07		%L	24.8	
MONO	.504		%M	6.03	
EOS	.373		%E	4.46	
BASO	.007		%B	.080	
RBC	4.75	10e6/ul	RBCo	4.75	
HGB	13.4	g/dl			
HCT	41.9	%			
MCV	88.2	fl			
MCH	28.3	pg			
MCHC	32.1	g/dl			
RDW	11.1	%			
RETC	----	10e3/ul	%R	----	
IRF	----				
NRBC	0.00	10e3/ul	NR/W	0.00	
PLTo	325.	10e3/ul	PLTi	327.	
MPV	9.25	fl			
PDW	16.5	10(GSD)			
PCT	.300	%			



Plaquettes optique

Plaquettes Impédance

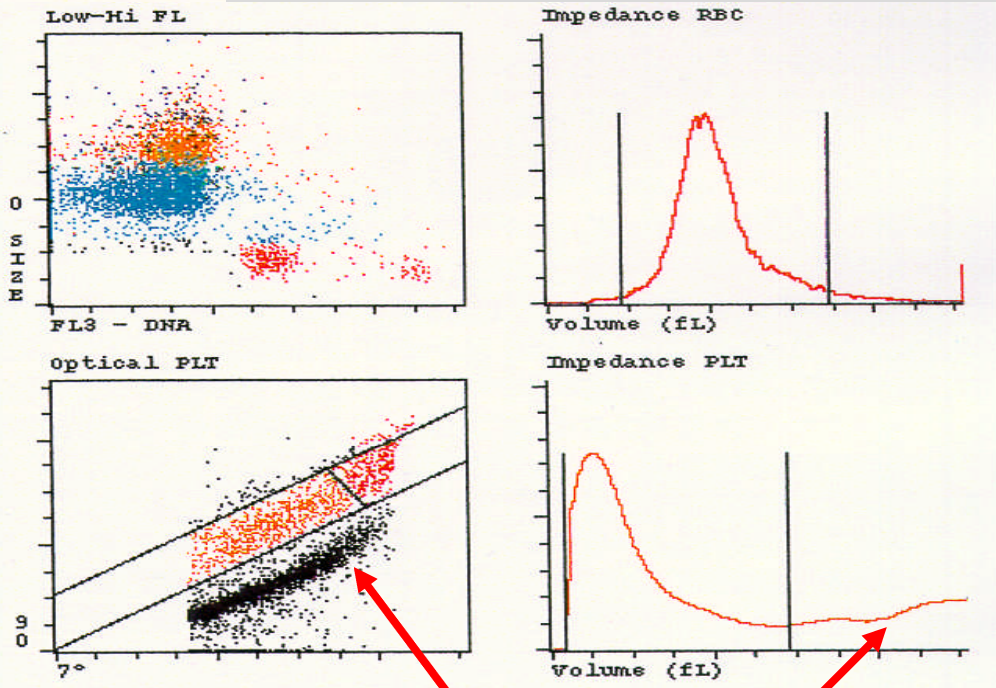
Ellipse plaquettaire en optique

ABBOTT DIAGNOSTICS

Anémie Hémolytique : Sphérocytes + Schizocytes (Microangiopathie)

CELL DYN 4000 / CELL DYN SAPPHIRE

WBC	13.7	10e9/L	WVF	.976
SEG	2.83		%S	20.7
BAND	0.00		%BD	0.00
IG	.776		%IG	5.69
BLST	.562		%BL	4.12
MONe	.059		%Me	.432
EOS	.037		%E	.274
BASO	0.00		%B	0.00
LYMe	9.19		%Le	67.3
VARL	.202		%VL	1.48
RBC	2.83	10e12/L	RBCo	2.84
HGB	5.53	mmol/L		
HCT	.245	L/L		
MCV	86.6	fL		
MCH	1.95	fmol		
MCHC	22.6	mmol/L		
RDW	22.4	%CV		
RETC	----	10e9/L	%R	----
IRF	----			
NRBC	.668	10e9/L	NR/W	4.89
PLT	20.2*	10e9/L	PLTi	89.7*
MPV	6.27*	fL		
PDW	20.7*	10(GSD)		
PCT	.127*	mL/L		



Discordance PIC / POC

SCHIZOCYTES

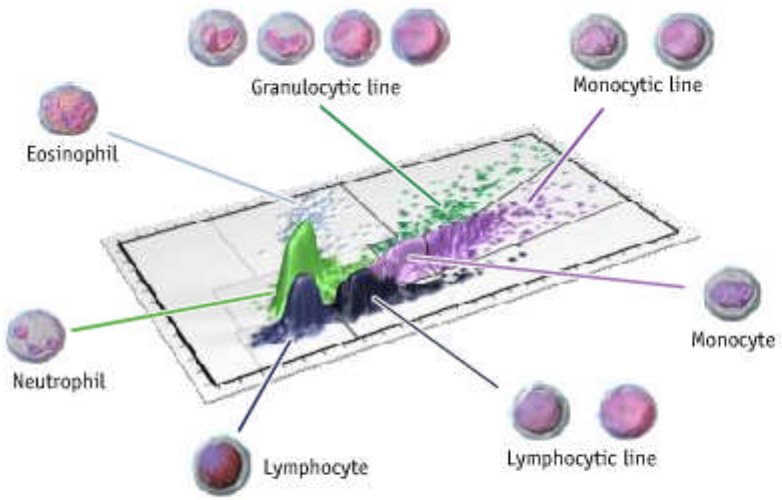
ABBOTT DIAGNOSTICS

ABX - Pentra 120

- Canal GR/Plaq
- Alarme de morphologie

- Liée aux courbes de distribution de volume
- Liée aux seuils matrice

Hematopoiesis through ABX Pentra DX 120



Double DIFF matrix

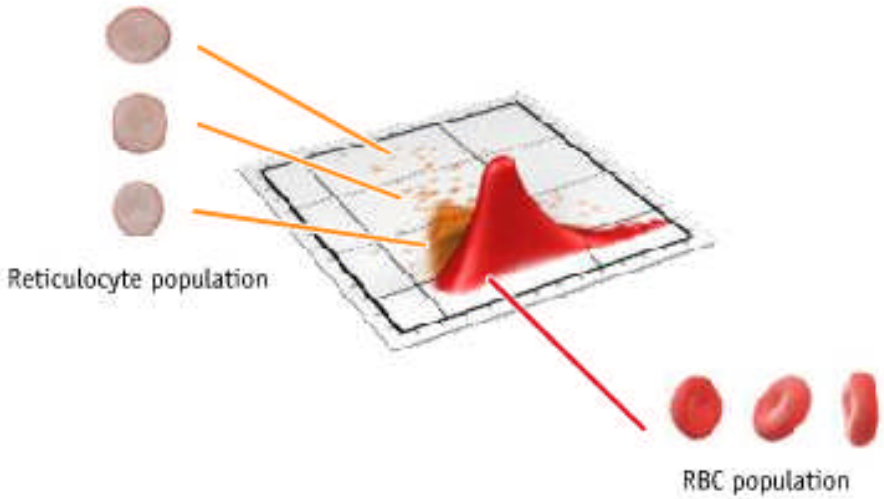
Full leukopoiesis analysis :

Routine identification and quantification of three cell lines

- granulocytic line (IMG)
- lymphocytic line (IML)
- monocytic line (IMM)

Skip intro

Hematopoiesis through ABX Pentra DX 120



Reticulocytes

Differential diagnosis of anemia :

Simultaneous count of 10 parameters
Classification according to three stages of maturation (Heilmeyer) :

- RET High
- RET Medium
- RET Low

Follow-up of iron-deficiency anemia based on the MRV (Mean Reticulocyte Volume)

Confirmation of bone marrow regeneration level based on the CRC (Corrected Reticulocyte Count)

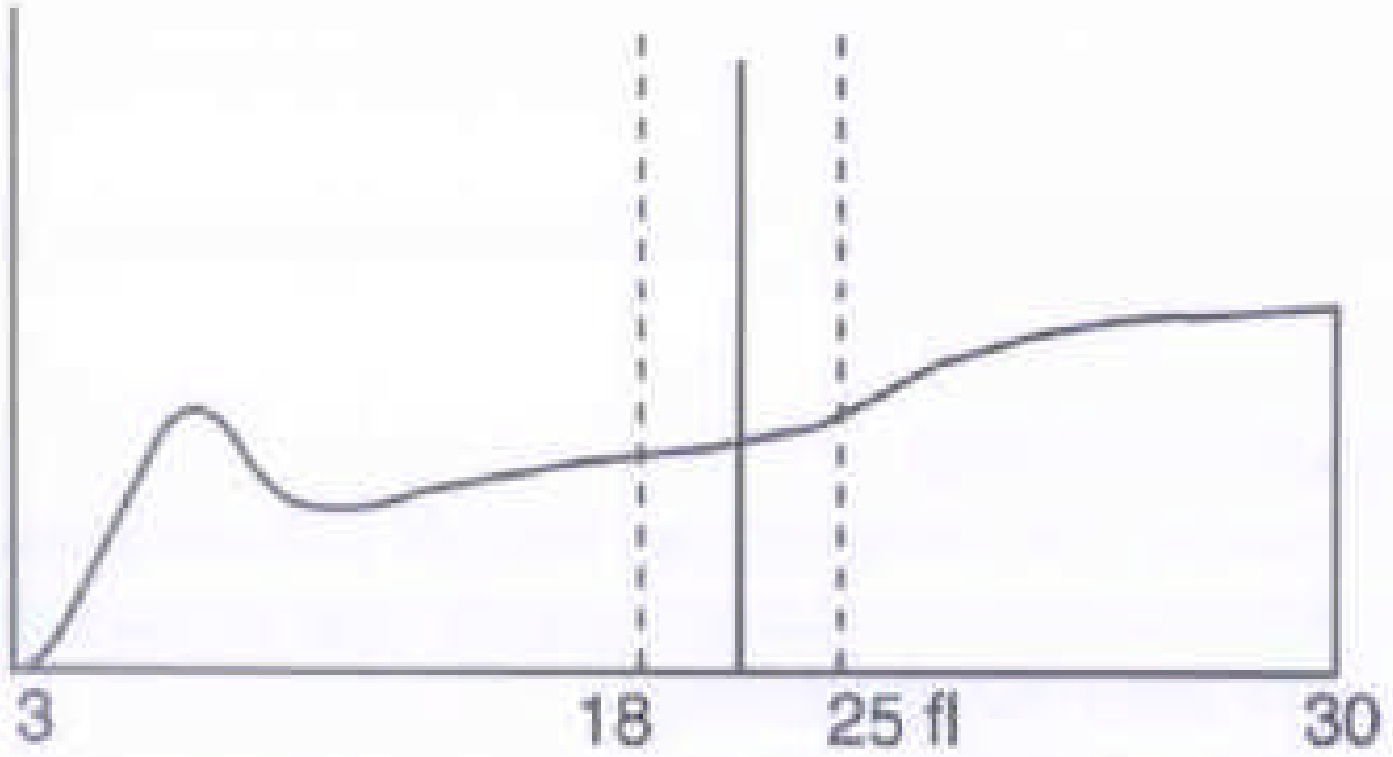
Skip intro

3 – L'alarme SCH (Schizocytes) est déclenchée si le nombre de particules dans la zone de 18 à 25 fl est trop important par rapport au nombre total de plaquettes. L'alarme SCH est accompagnée d'un rejet (*) sur les Pla.

Anormalies suspectées :

- Présence de schizocytes
- Présence d'agrégats plaquettaires

Vérifier le résultat sur une lame.



SCH (Schizocytes) : Le nombre de cellules comptées dans la zone S4 est comparée à un seuil maximum et le nombre de cellules comptées dans la zone S5 est comparé au nombre total de cellules comptées dans la zone S6. Cette alarme donne un rejet sur les paramètres associés (VMP, THT et IDP).

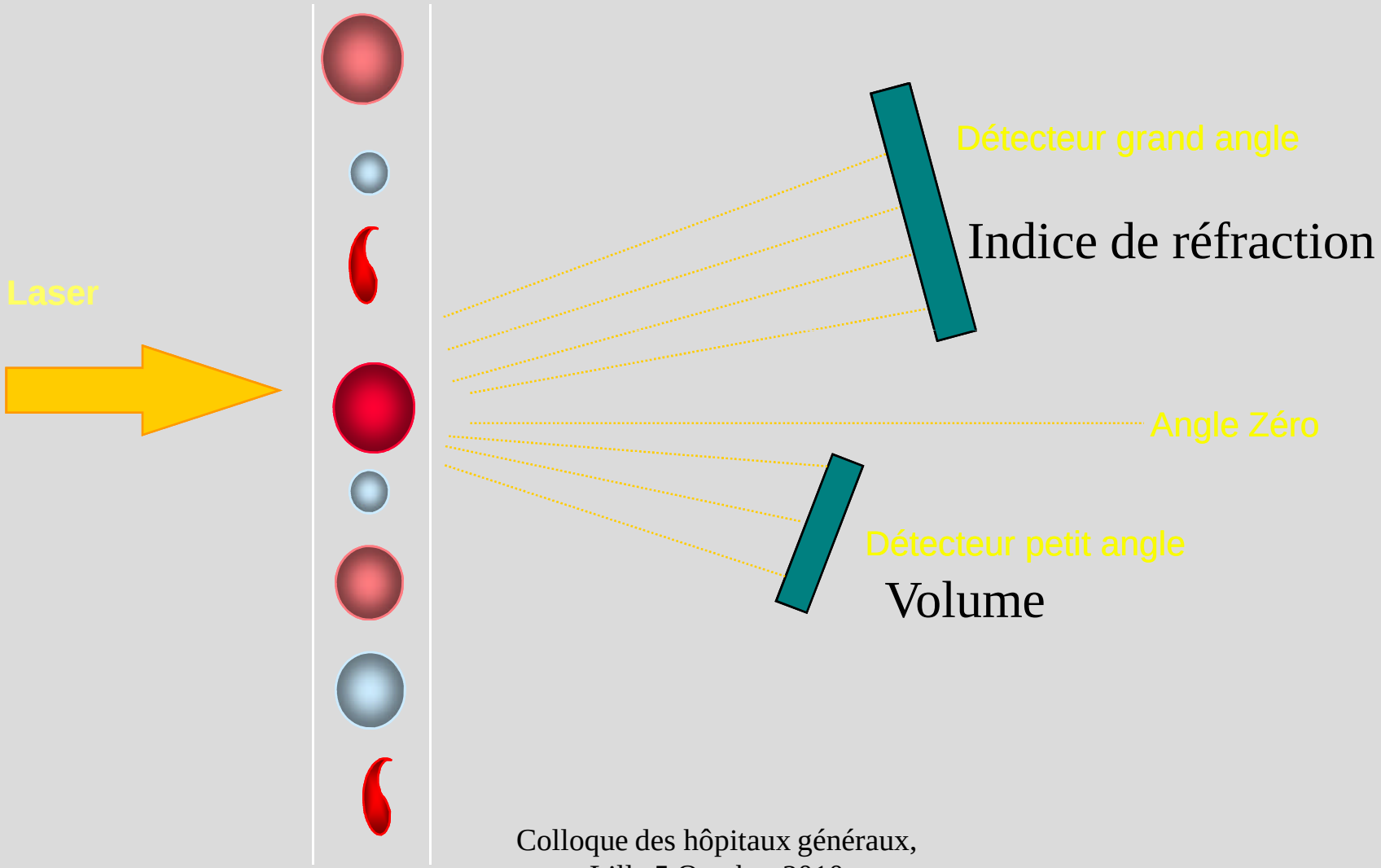
.13

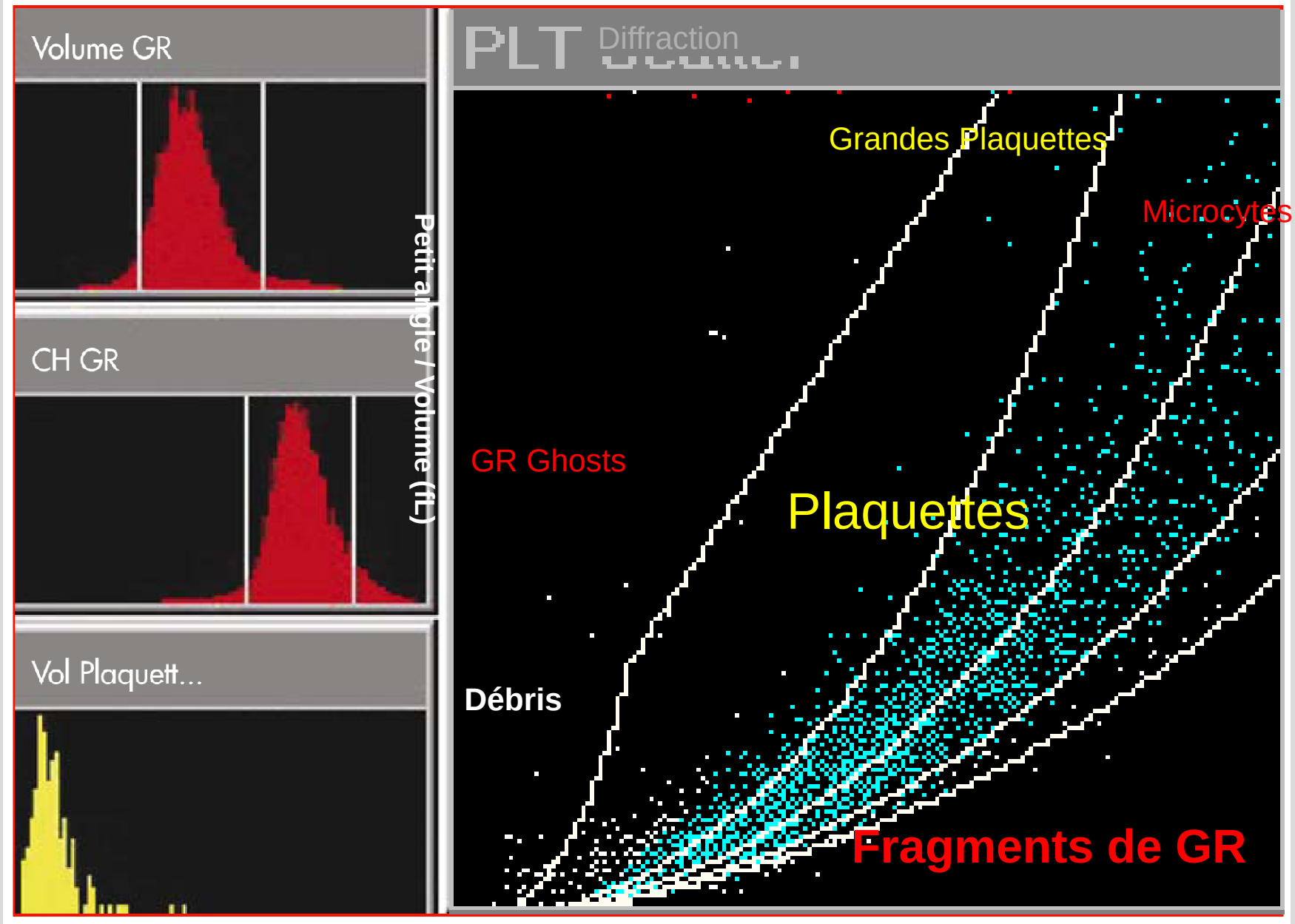
SCH suivi du résultat PLA : indique la présence excessive de schizocytes dans la zone de comptage des PLA. Vérifier le résultat à l'aide d'une méthode de référence (méthode manuelle).

Siemens-Advia 120

- Canal GR/Plaq
- Analyse en deux dimensions : volume/Indice de Réfraction

- Alarme de morphologie
- Liée aux courbes de distribution

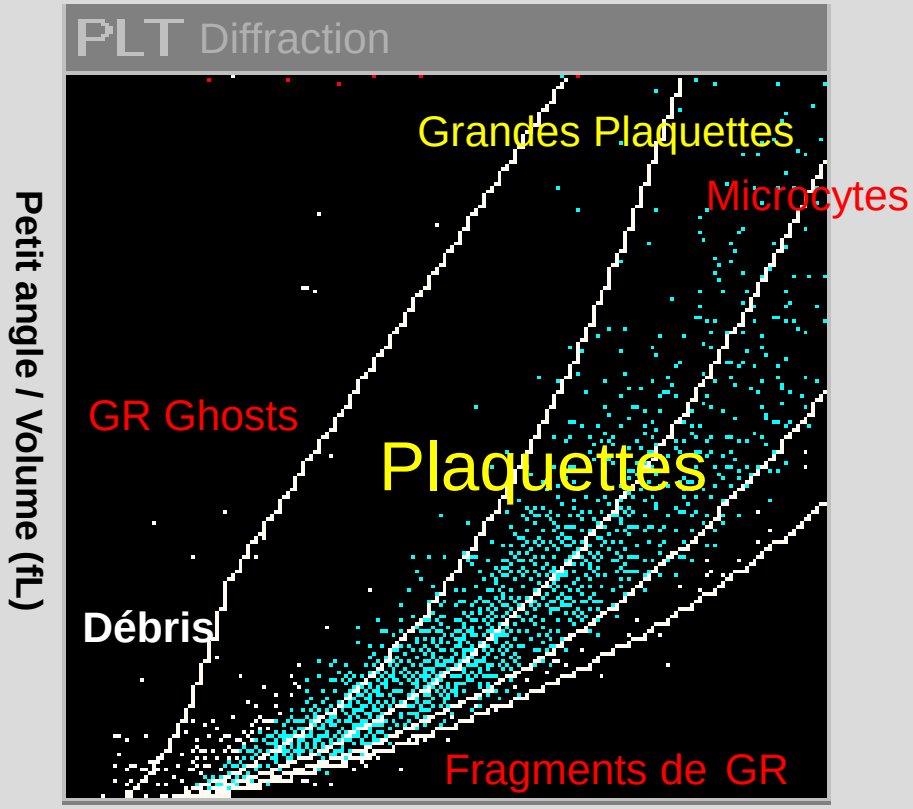

Laser
Détecteur grand angle
Indice de réfraction
Angle Zéro
Détecteur petit angle
Volume

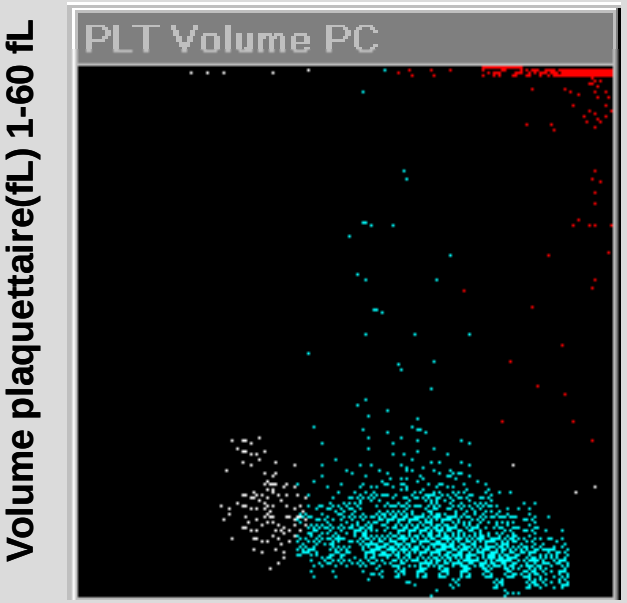


Grand angle / Indice de réfraction (IR)

2-D plaquettes

- ✓ Analyse individuelle des plaquettes en 2 D
- ✓ Théorie de diffraction de Mie sous deux angles
- ✓ Deux signaux convertis en volume (1 - 60 fL) indice de réfraction (1.35 - 1.40)





	Globules rouges fragmentés (Advia 120)			
	≥ 0,25 %	≥ 0,5 %	> 1 %	
Sensibilité (%)	100	100*	88,5	80*
Spécificité (%)	17	73,4*	87,6	95,3*
Valeur prédictive négative (%)	100	100*	96,8	98,4*
Valeur prédictive positive (%)	23	22,7*	63,9	57,1*

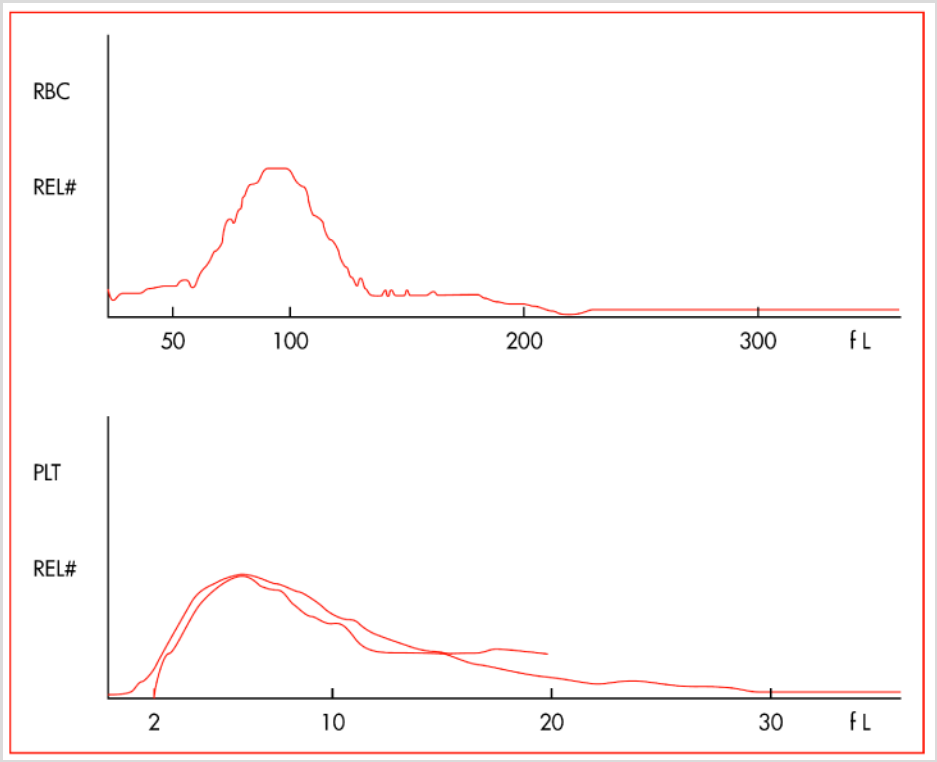
Lesesve J F, *Ann Biol Clin, 2005, 63,3,279-289*

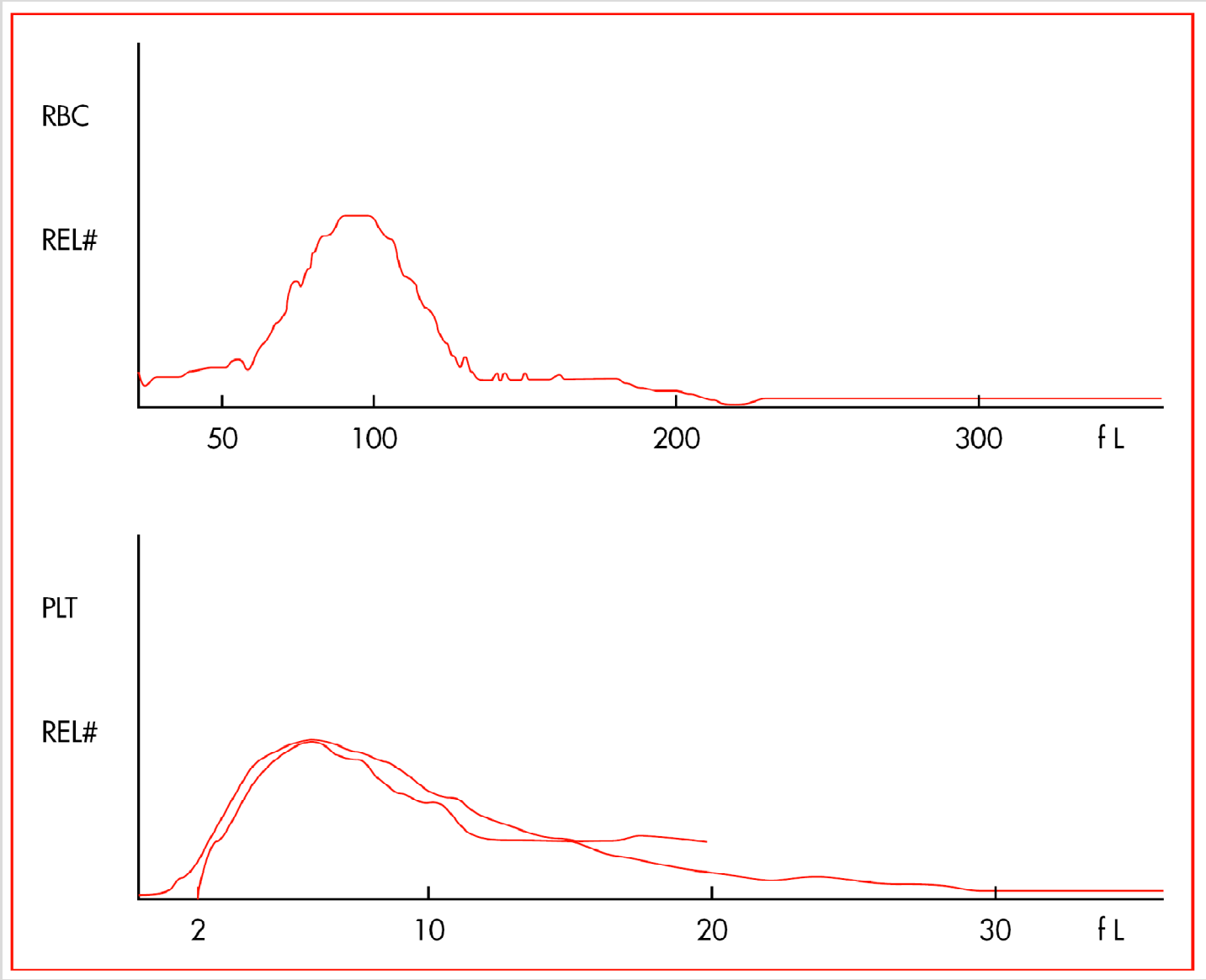
Beckman-Coulter LH750

- Alarme de morphologie
- Liée aux courbes de distribution

- Alarme de Volume :

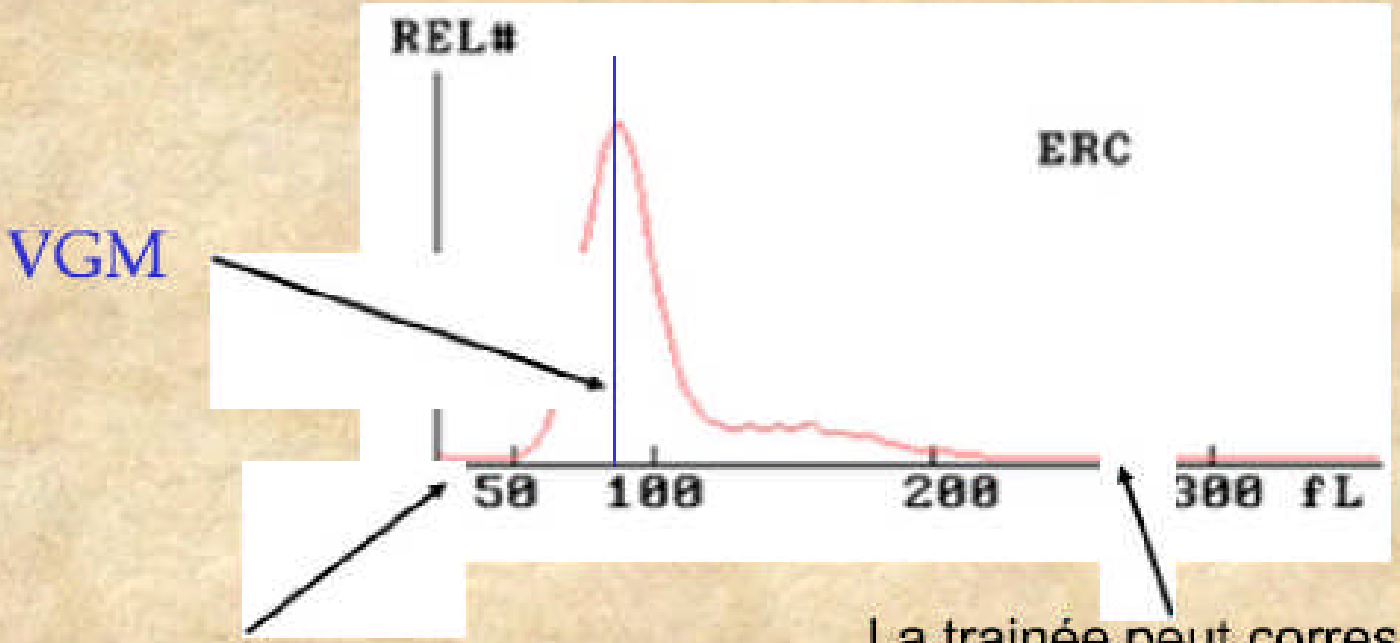
- 10-20fL





Colloque des hôpitaux généraux,
Lille 5 Octobre 2010

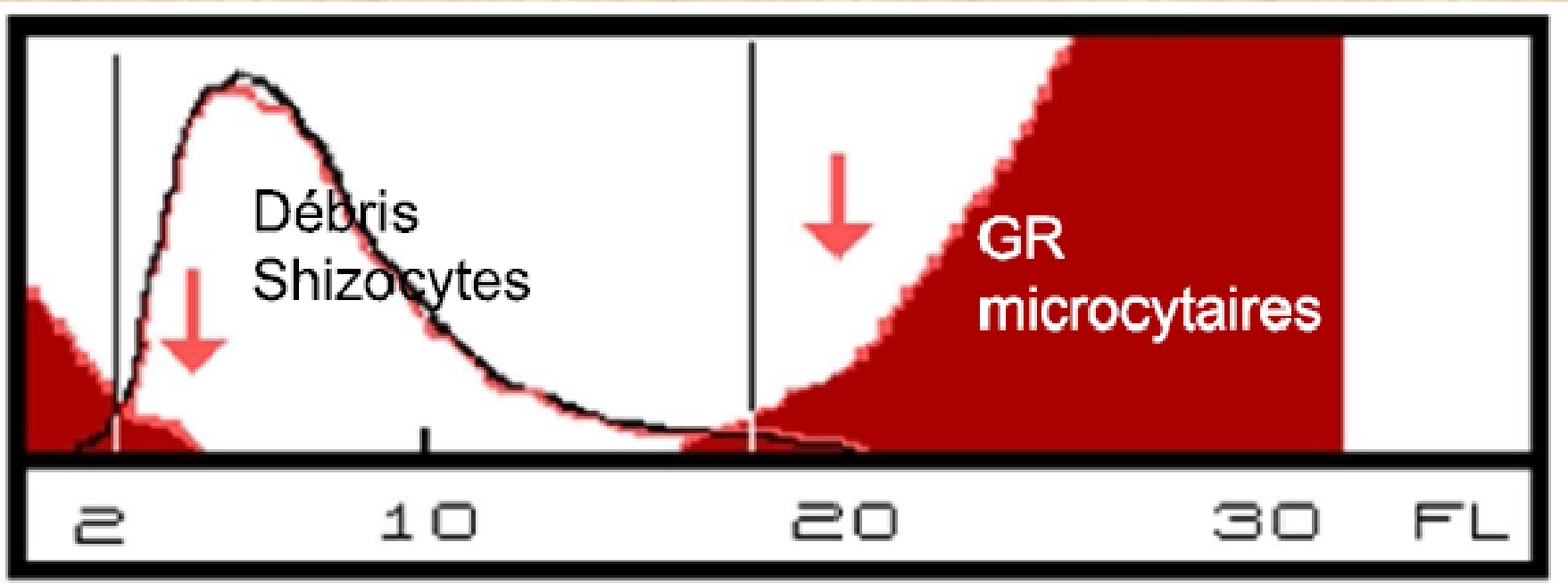
Numération des Globules Rouges
Histogramme des GR



Mise en évidence de fragments de cytoplasme ou de grandes plaquettes par l'analyse de l'histogramme à partir de 24 fl.

La trainée peut correspondre aux :

- Passages en coïncidence
- Agrégats cellulaires
- Cellules agées
- Globules blancs



Petites plaquettes Grandes plaquettes

Sysmex XE-2100

- Canal réticulocyte
- Analyse en deux dimensions : volume/contenu cellulaire ARN

- Alarme de morphologie
- Liée aux courbes de distribution

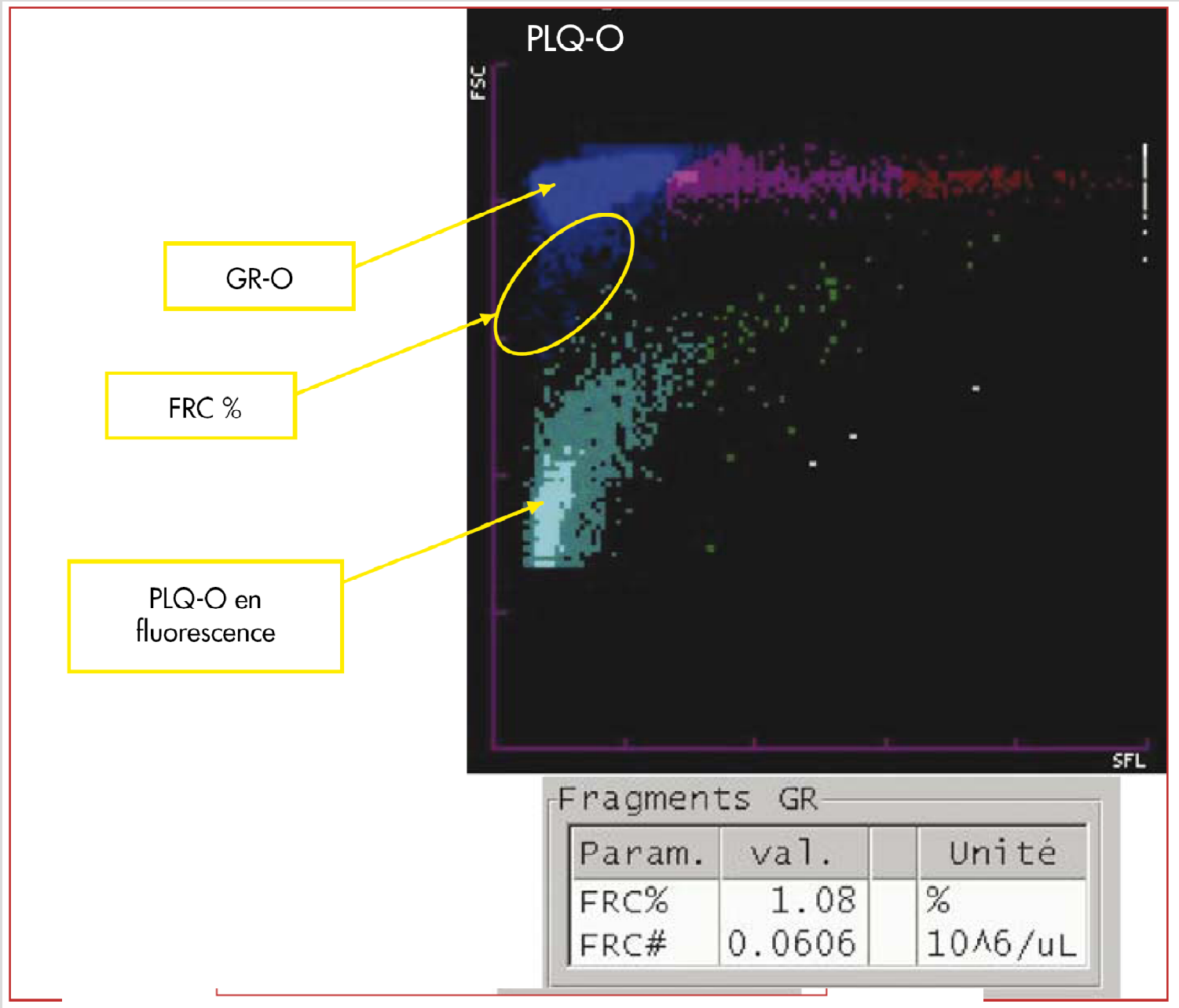


Figure 3. Cytogramme érythrocytaire et plaquettaire (technologie Roche Sysmex, XE 2100). Zone correspondant aux FRIC (*fragmented red cells*).

Tableau 2

Sensibilité, spécificité, valeur prédictive positive et négative pour les schizocytes déterminées par hématimètre ADVIA 120 et par numération microscopique dans le suivi des greffés médullaires

Technique	Seuils (%)	Sensibilité (%)	Spécificité (%)	Valeur prédictive négative (%)	Valeur prédictive positive (%)
Advia 120 (GR fragmentés)	0,5	100	73,4	100	22,7
	1	80	95,3	98,4	57,1
Microscope (schizocytes)	0,2	100	78,1	100	26,3
	0,5	60	100	97	100

- **Essentiel d'indiquer au clinicien si oui ou non il y a des schizocytes**

Résultat

- Qualitatif

  0/+/++

  absence/rares/nombreux

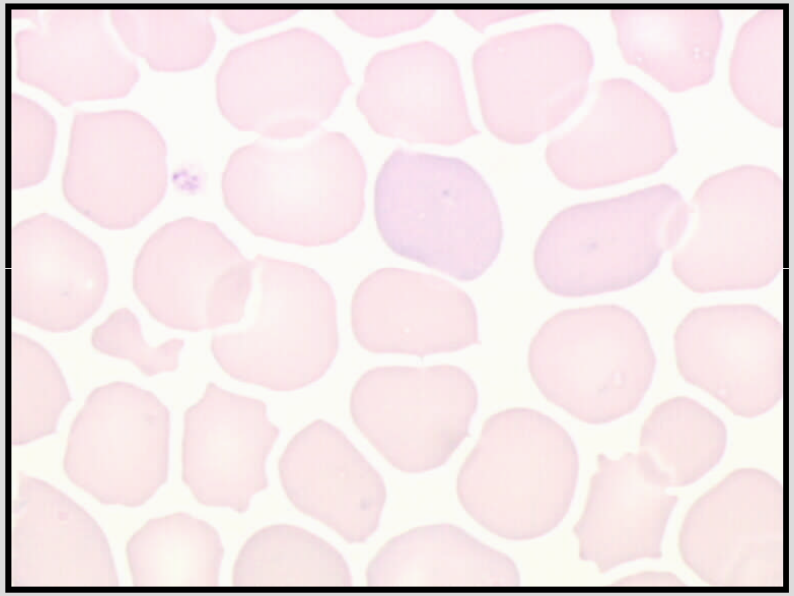
- Quantitatif

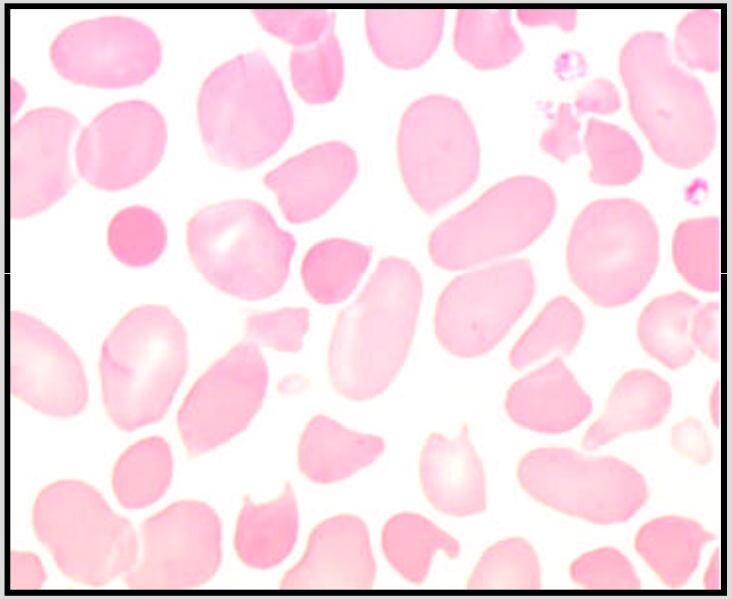
  Pourcentage sur >1000 Hématies

Interprétation

- Anomalie morphologique associée à … ?
- Schizocytose imposant le diagnostic étiologique de MAT ?

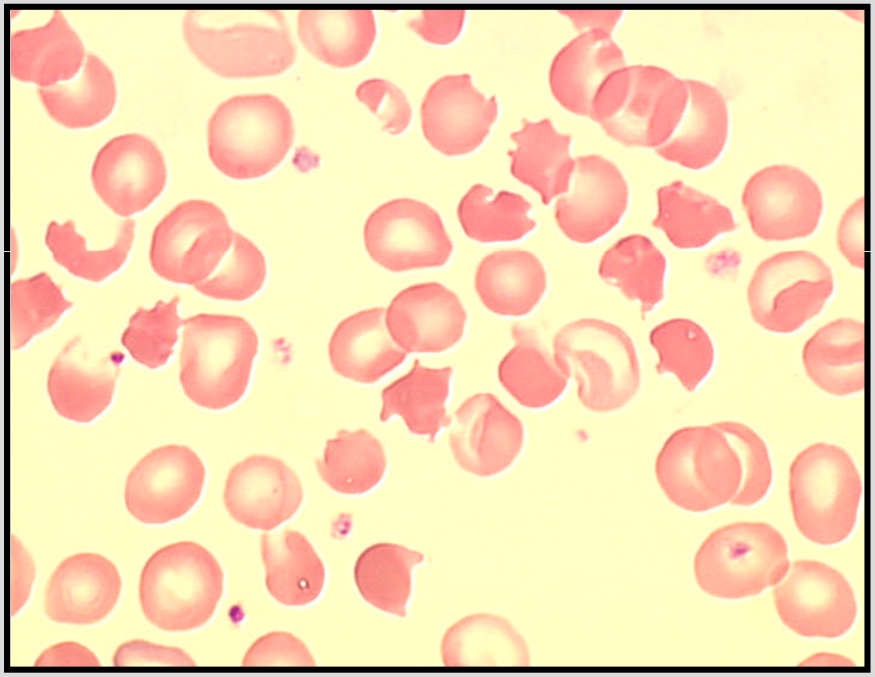
Nouveau né prématuré





Colloque des hôpitaux généraux,
Lille 5 Octobre 2010

Anémie néonatale

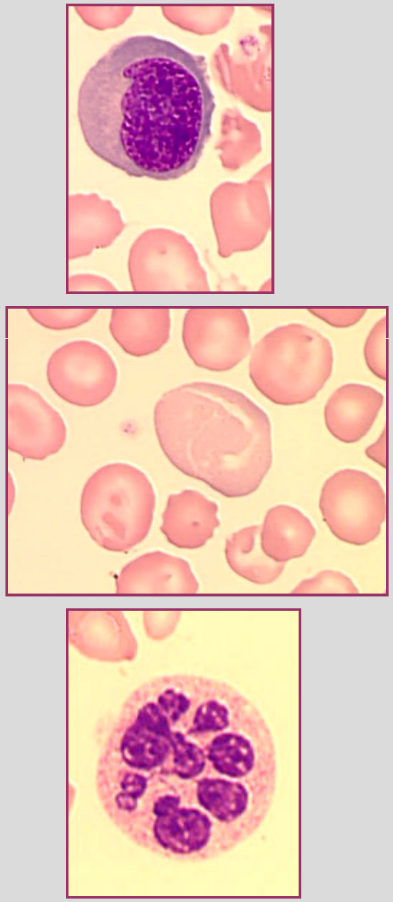


•Pic à 3-4 semaines de vie
•Nombreux pyknocytes : hématies contractées avec de rares projections irrégulières
•Ictère spontanément résolutif en quelques semaines.

•Rôle d'un facteur extra corpusculaire responsable de dommage oxydatif.

Collection Odile Fenneteau

Anomalie du métabolisme B12, Folates



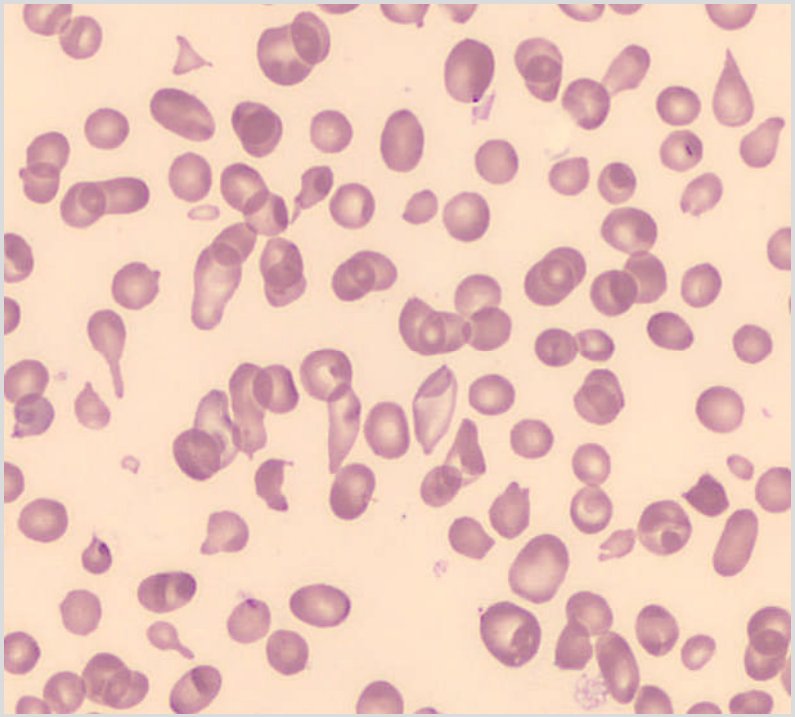
Au cours des rares pathologies héréditaires du métabolisme de la vitamine B12 et des folates,

l'anémie est macrocytaire mais difficile à évaluer en période néonatale, le VGM étant physiologiquement élevé d'où l'importance de l'observation de macrocytes et d'érythroblastes dysmorphiques et de polynucléaires neutrophiles hypersegmentés ou rubanés.

Collection Odile Fenneteau

Colloque des hôpitaux généraux,
Lille 5 Octobre 2010

Anomalie du métabolisme B12, Folates

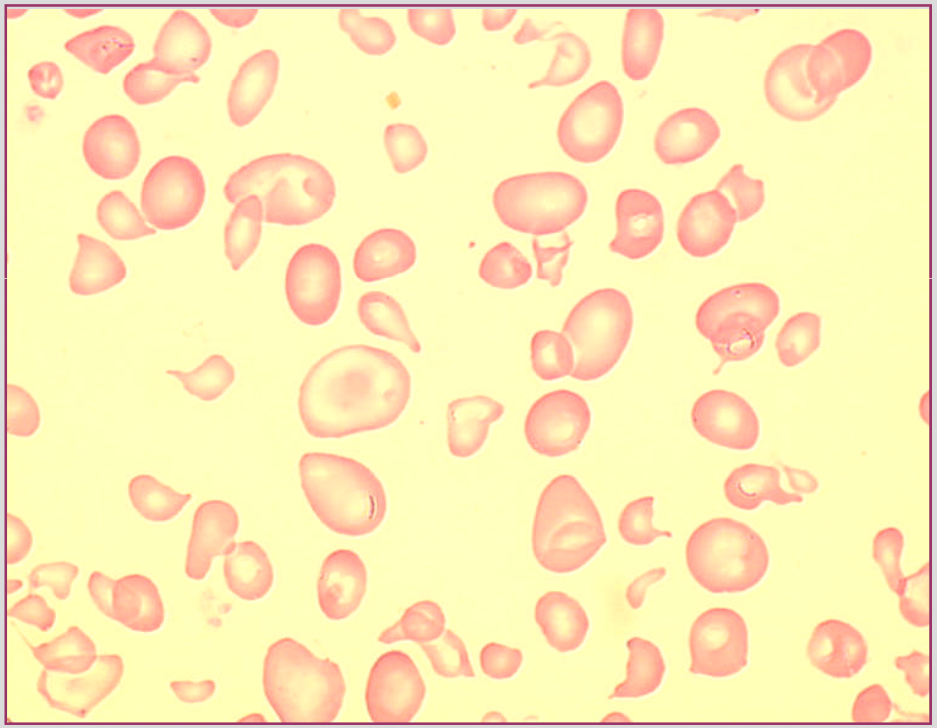


Enfant de 24 mois,
l'anémie est profonde

le VGM est discrètement élevé
Malgré les macrocytes,
car fragmentation des hématies,
dacryocytes et ovalocytes
il s'agit d'un trouble
Intrinsèque de la vitamine B12
(anomalie du transport
par déficit en transcobalamine II)

Collection Odile Fenneteau

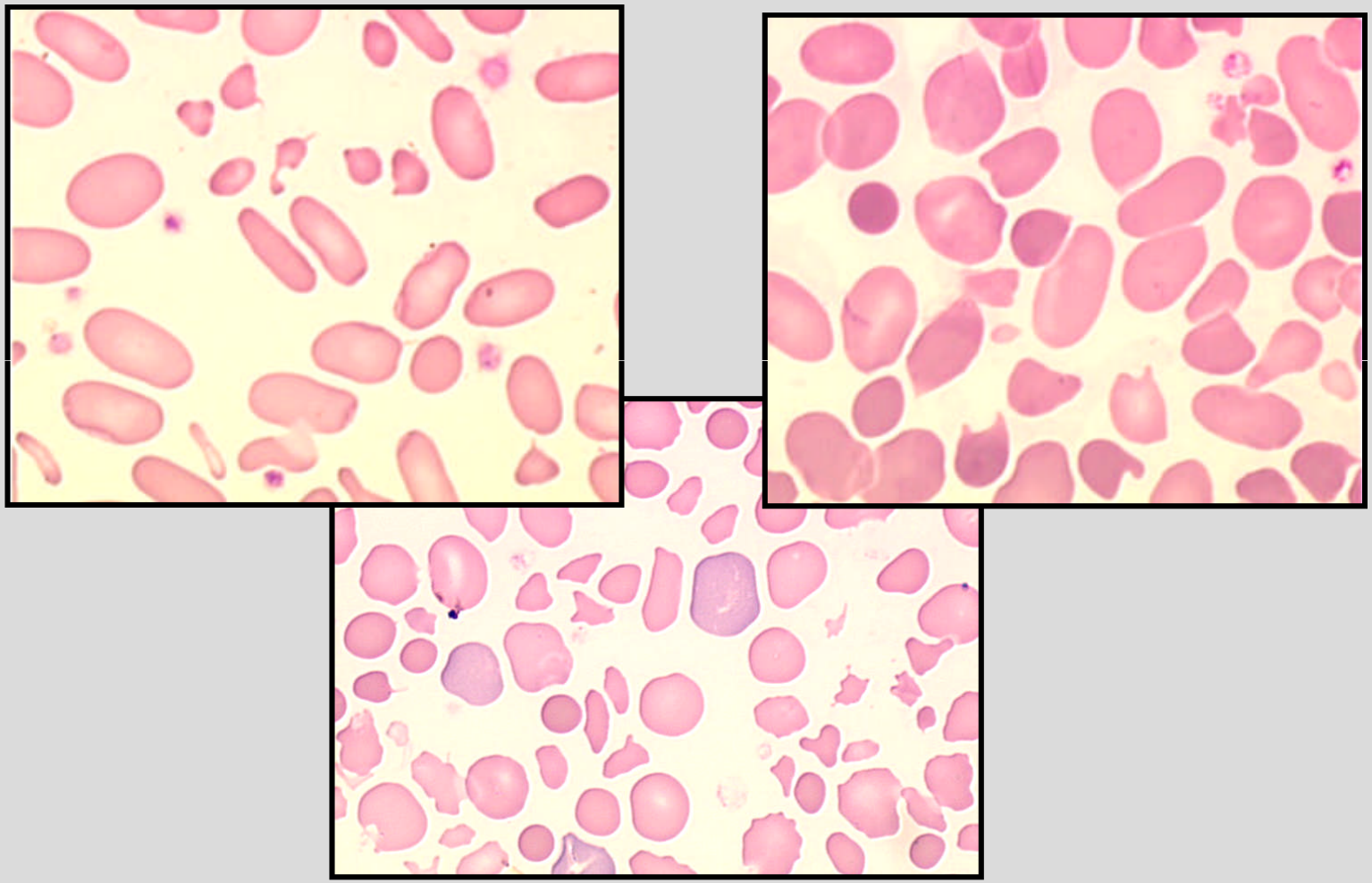
Anomalie du métabolisme B12, Folates



Patient atteint de trouble intrinsèque de la vitamine B12

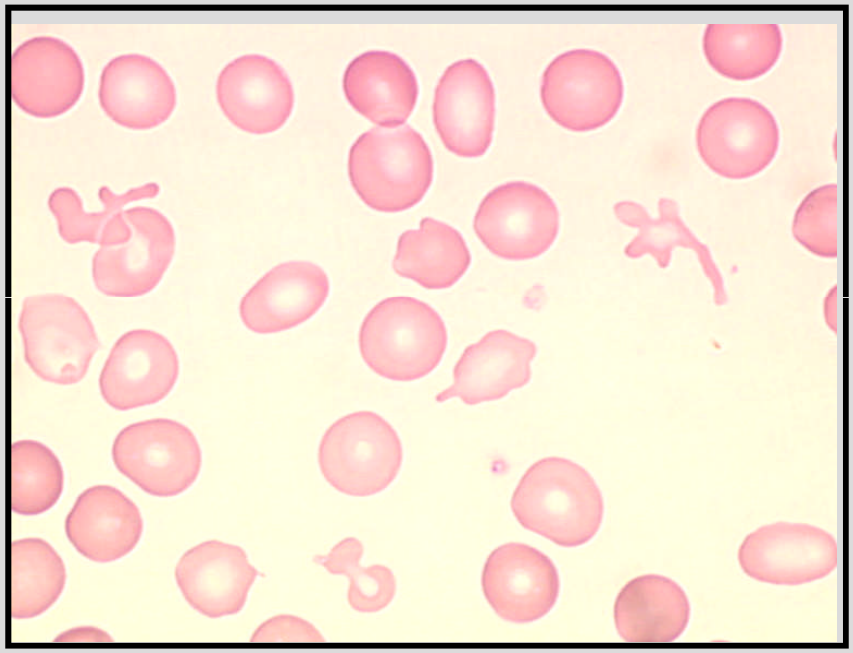
Anomalies au niveau du complexe spectrine-actine-protéine 4-1.

Elliptocytose



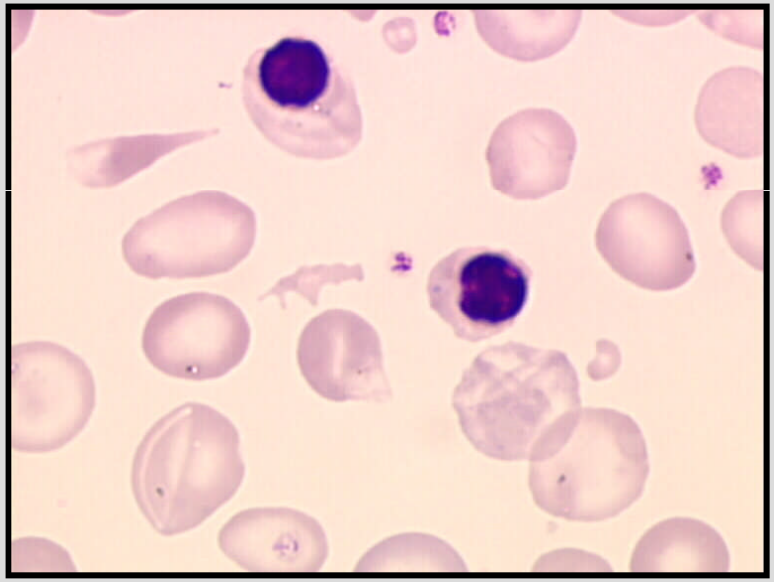
Colloque des hôpitaux généraux,
Lille 5 Octobre 2010

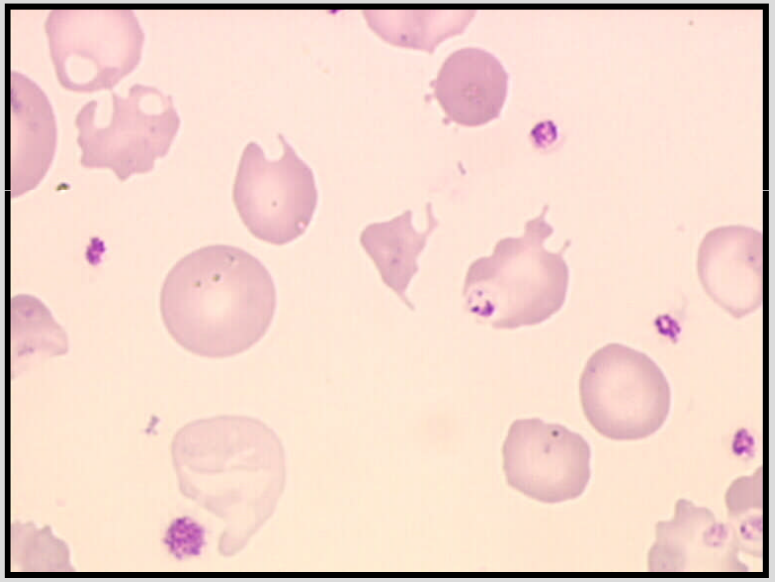
Poïkilocytose



Colloque des hôpitaux généraux,
Lille 5 Octobre 2010

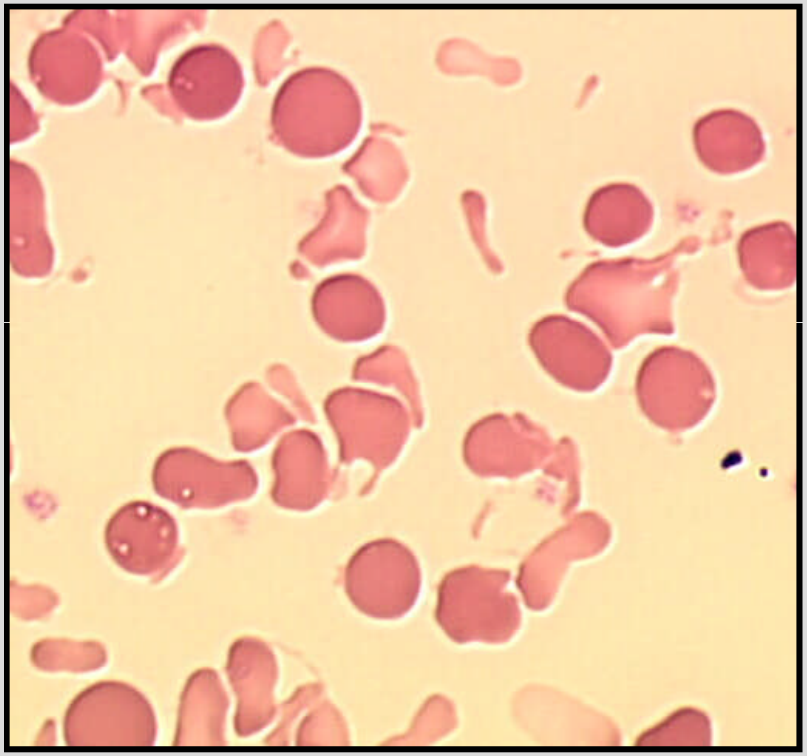
Beta thalassémie homozygote





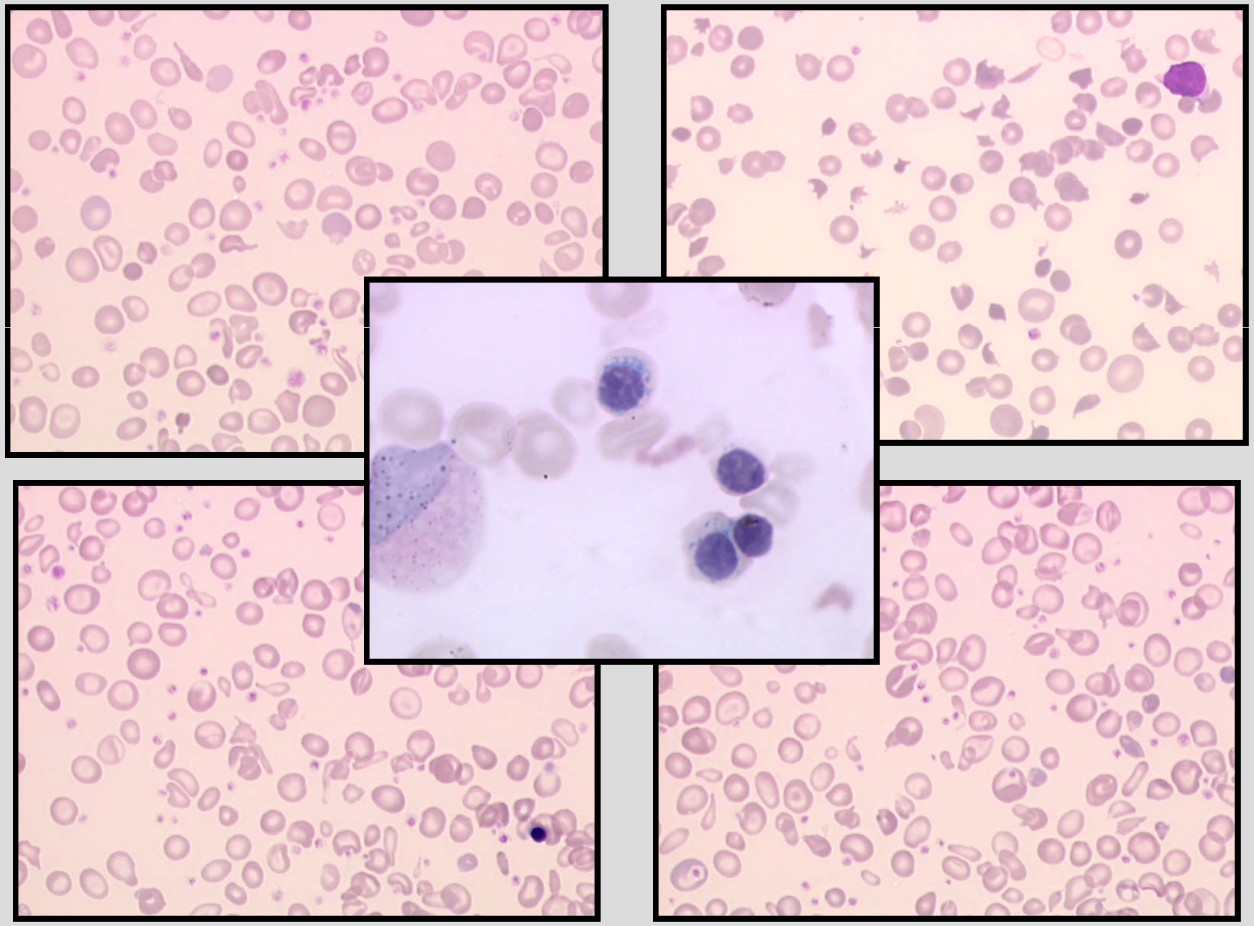
Colloque des hôpitaux généraux,
Lille 5 Octobre 2010

Pyropoikilocytose héréditaire



Colloque des hôpitaux généraux,
Lille 5 Octobre 2010

An sidéroblastique congénitale



Colloque des hôpitaux généraux,
Lille 5 Octobre 2010

- Ecarter tout artéfact

- Intégrer cette morphologie érythrocytaire dans le contexte clinico-biologique du patient

Macro angiopathie

- **Pathologie cardio vasculaire :**

  - Pathologie vasculaire ou valvulaire
  - Prothèse vasculaire ou valvulaire

  Valves : selon le type, le nombre, la position
  30% ont des signes biologiques
  Stent : rare

- **Circuits extracorporels : dialyse, CEC**

- **Chocs palmoplantaires répétés**

Micro angiopathie

- Définition, clinique, etiologie
- classification
- Diag positif
- Diag differentiel
- Enquête étiologique : SHU PTT

- traitement

Micro angiopathie (MAT)

- Affections occlusives des petits vaisseaux
- Formation de thrombi plaquettaires dans la microcirculation systémique ou intrarénale
- Thrombopénie
- Lésions mécaniques des hématies

Diagnostic de MAT

- **Pentade de signes :**
  - Anémie hémolytique microangiopathique
  - Thrombopénie souvent sévère
  - Anomalies neurologiques fluctuantes
  - Atteinte rénale
  - Fièvre
  - **LDH**

- **L'atteinte rénale est très variable**

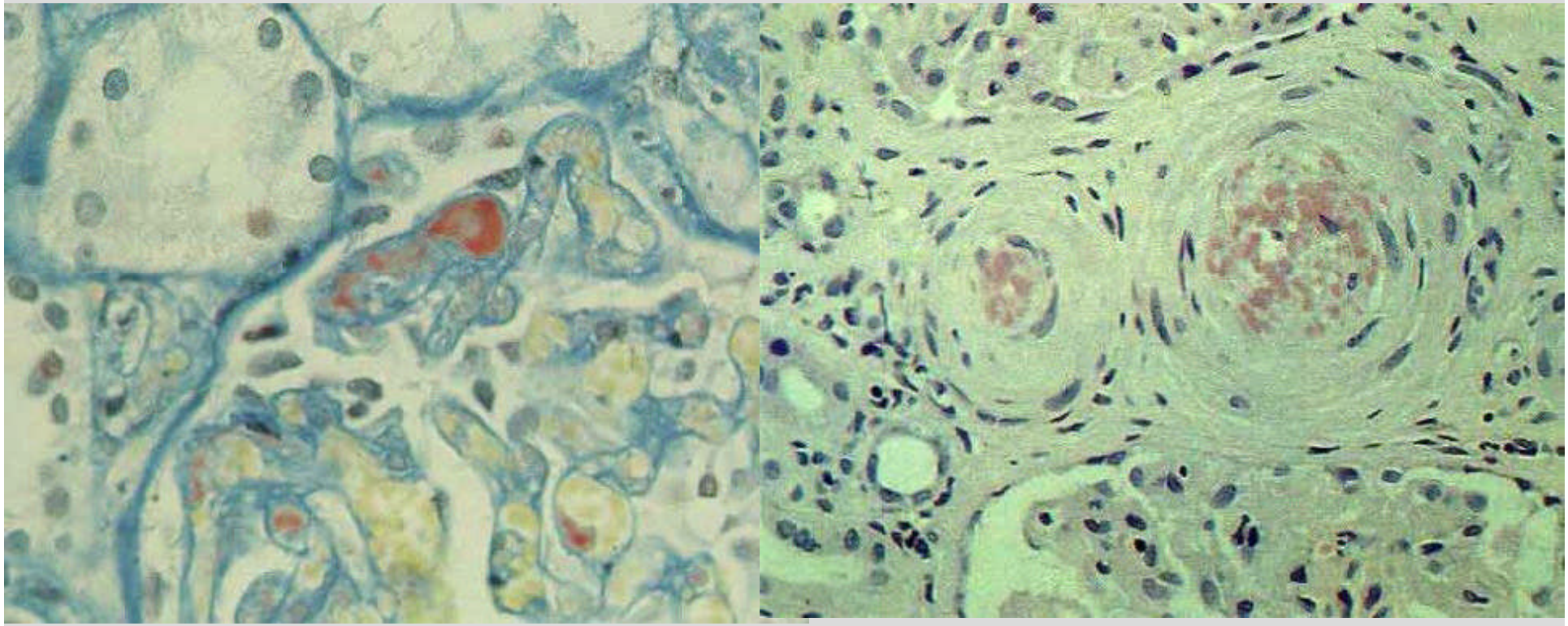
  - Souvent marquée
  - d'évolution rapidement progressive

  - pouvant aller jusqu'à l'anurie qui peut nécessiter le recours à la dialyse

  - Le sédiment urinaire est par contre assez pauvre avec peu ou pas de cylindre et la protéinurie est de faible abondance (1 à 2 g par jour)

  - Une hypocomplémentémie est observée dans la moitié des cas environ et doit faire suspecter la possibilité d'une glomérulonéphrite rapidement progressive ou d'une vascularite associée.

Dépots de fibrine (coloration orange) dans les capillaires glomérulaires



Occlusion glomérulaire par des lésions prolifératives au cours d'une MAT

Colloque des hôpitaux généraux,
Lille 5 Octobre 2010

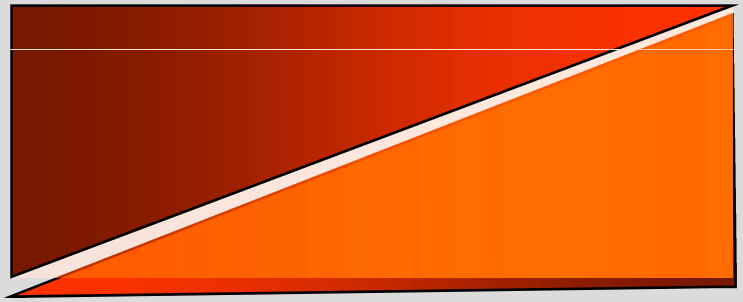
- **Les symptômes neurologiques présents chez la plupart des patients avec une MAT**
  - très variables et fluctuants : confusion, céphalée violente, crises comitiales, troubles de la conscience jusqu'au coma
- **La fièvre**
  - classique est relativement peu fréquente et doit toujours faire rechercher une infection associée (ou causale).

Historiquement

Enfant

SHU D+

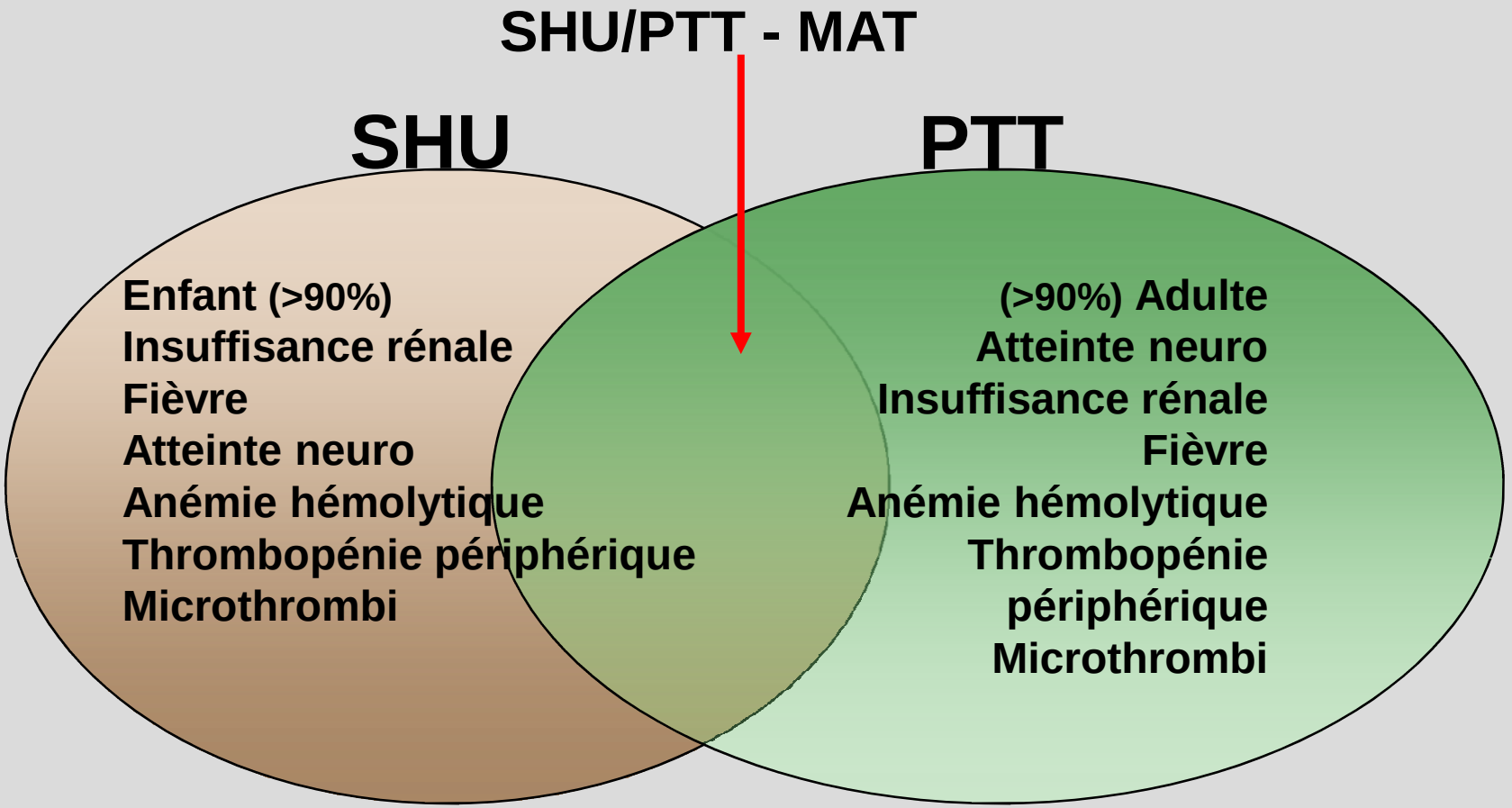
Cytotox endoth



Adulte

PTT

Déficit ADAMTS 13



PTT et SHU: même entité à expression clinique variable ?

Symmers, 1952; Remuzzi, 1987

Syndrome Hémolytique et Urémique

SHU post-diarrhéique
= épidémique

SHU sans diarrhée
= atypique

Enfant (> 90% des cas)

Escherichia coli

Souches O157:H7 +++
O111:H-
O26:H11
O103:H2

Toxines Shiga-like:
Stx-1
Stx-2 +++

Adulte (> 90% des cas)

- **Pathologies associées:**
  - Infection VIH
  - Cancer
  - Lupus érythémateux
  - Médicaments
  - Greffe...
- **Idiopathique**

Enfant (< 10% des cas)

- **Déf en Facteur H**
- **Déf en ADAMTS13**

Syndrome Hémolytique et Urémique

SHU post-diarrhéique
= épidémique

SHU sans diarrhée
= atypique

Enfant (> 90% des cas)
Escherichia coli
Souches O157:H7 +++
O111:H-
O26:H11
O103:H2

Toxines Shiga-like:
Stx-1
Stx-2 +++

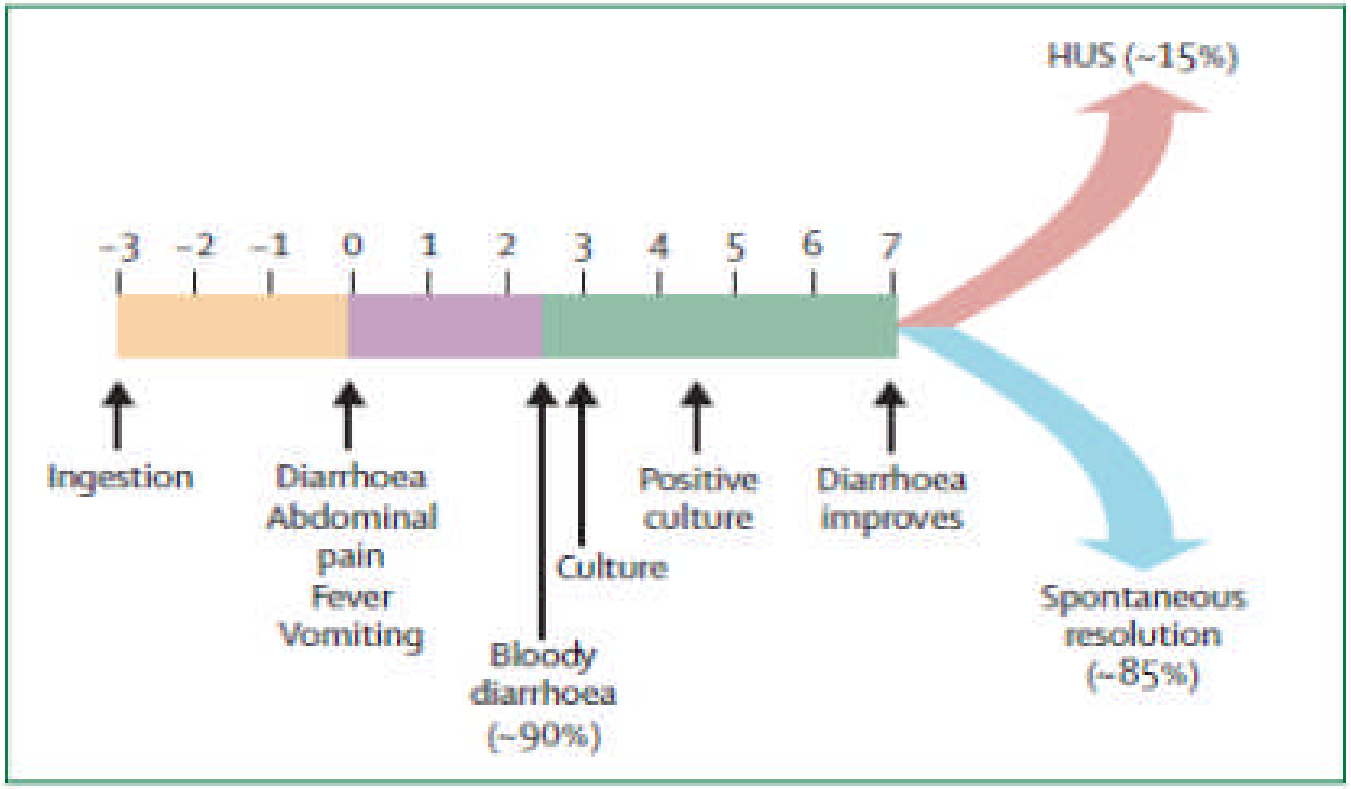
Adulte (> 90% des cas)

- **Pathologies associées:**
  - Infection VIH
  - Cancer
  - Lupus érythémateux
  - Médicaments
  - Greffe...
- **Idiopathique**

Enfant (< 10% des cas)

- **Déf en Facteur H**
- **Déf en ADAMTS13**

Histoire naturelle



Tarr, Lancet 2005

Ce n'est pas qu'une maladie de l'enfant ….

- « The burger that shattered her life » Mickael MOSS ***NYT 3 Octobre 2009***

  http:/www.nytimes.com/2009/10/04/health/04meat.html

- Une jeune femme de 22 ans mange un hamburger mal cuit …
- SHU typique avec complications neurologiques graves
- La filière du beuf aux USA

Histoire naturelle

- Pronostic :
  - Plus de 8 jours de dialyse
  - PN > 20 G/L

- 1% des enfants meurent
- 5% des enfants restent en dialyse
- Séquelles rénales : 10-20%

- Guérison : 60-70%

Ducluck, 2000

Traitement

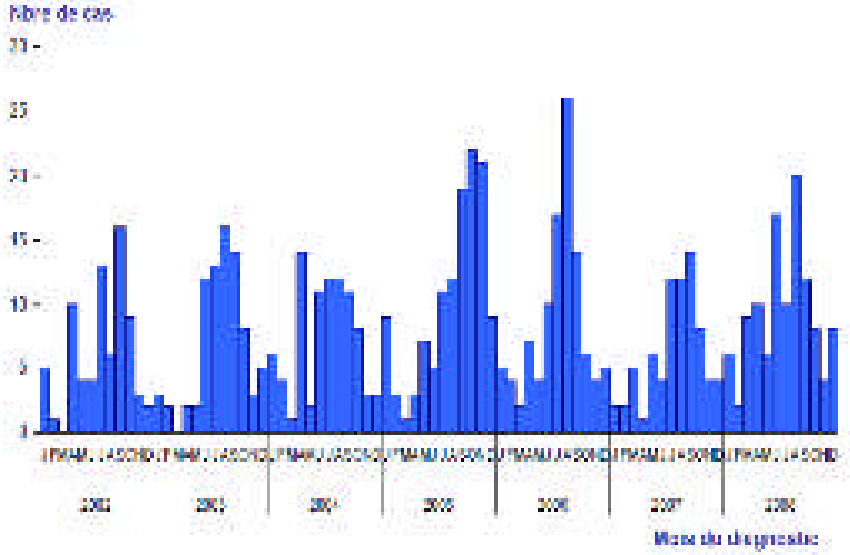
- Symptomatique
  - Hydratation pendant la diarrhée
  - Transfusion, dialyse, contrôle de la TA pendant le SHU
- Avenir :
  - **URTOXAZUMAB : mAc anti Stx2**
    - (Lopez AAC,2010)
  - Vaccination
  - Prévention

Le SHU épidémique en France en 2008

Tableau II : Incidence annuelle moyenne du SHU par 100 000 enfants par groupe d'âge. France, 1996-2008.

Groupe d'âge (ans)	Incidence annuelle moyenne
0-2	2,3
3-5	1,0
6-10	0,3
11-15	0,1

Figure 2 : Distribution mensuelle du nombre de SHU chez l'enfant de moins de 15 ans. France, 2002-2008.



- 37% des malades ont été transfusés et dialysés,
- 45% ont été transfusés uniquement,
- 2% dialysés uniquement
- 15% n'ont pas été dialysés ni transfusés.

INVS, 2009

Syndrome Hémolytique et Urémique

SHU post-diarrhéique
= épidémique

SHU sans diarrhée
= atypique

Enfant (> 90% des cas)

Escherichia coli

Souches O157:H7 +++
O111:H-
O26:H11
O103:H2

Toxines Shiga-like:
Stx-1
Stx-2 +++

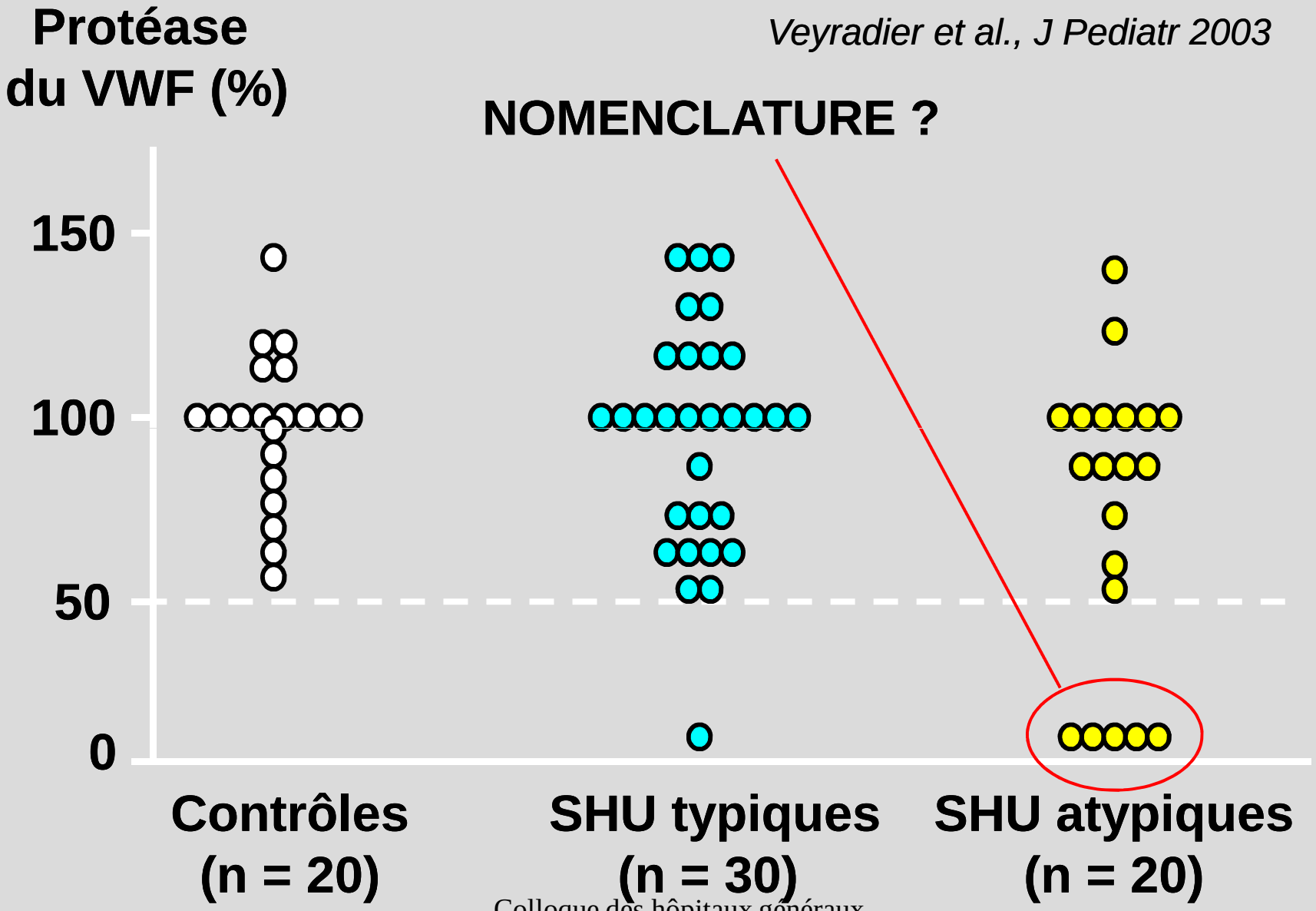
Adulte (> 90% des cas)

- **Pathologies associées:**
  - Infection VIH
  - Cancer
  - Lupus érythémateux
  - Médicaments
  - Greffe...
- **Idiopathique**

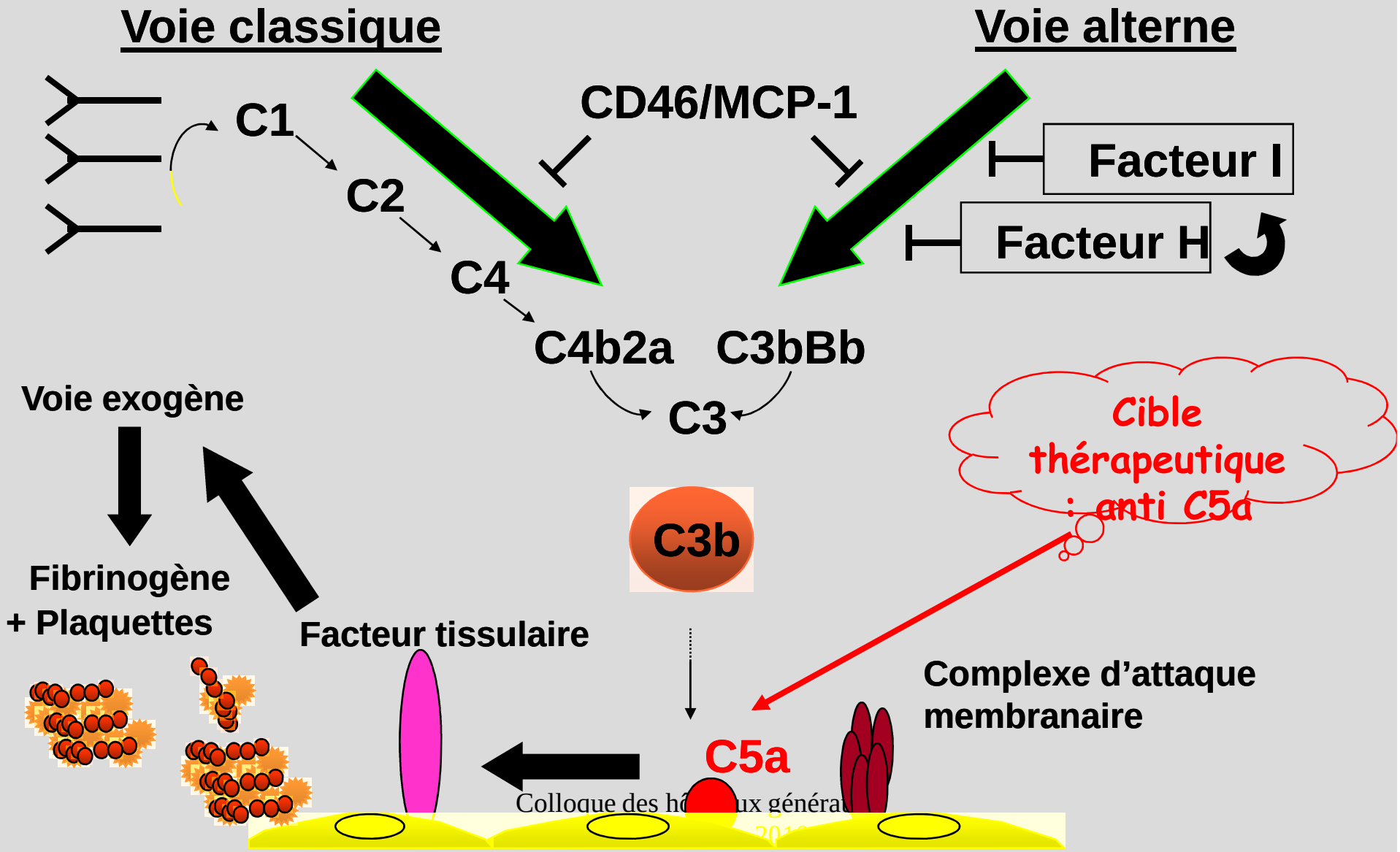
Enfant (< 10% des cas)

- **Déf en Facteur H**
- **Déf en ADAMTS13?**

SHU et protéase du FvW I.



SHU et ANOMALIES du COMPLEMENT



Purpura Thrombotique Thrombopénique

Formes idiopathiques

- Sporadiques
- Héréditaires :
  - Déf en ADAMTS 13
- Intermittentes
  - Ac anti ADAMTS 13

Pathologies associées

- Maladies autoimmunes
- Infection VIH
- Greffes
- Pathologies malignes
- Médicaments

  Antinéoplasiques
  Antiagrégants
  Quinine
  Cyclosporine A ...

Enquête étiologique d'une MAT

- Anamnèse : cancer, chimiothérapie, grossesse, lupus, syndrome des antiphospholipides, prise de médicaments, néphropathie sous jacente
- Coprocultures, sérodiagnostic des entérobactéries, recherche de Shigatoxine de l'E. Coli O157:H7 (PCR selles)
- Anticorps anticardiolipine, anticoagulant lupique Sérologies HIV, CMV
- Activité de la protéase vWF (ADAMTS13)
- Anticorps IgG anti-ADAMTS13, anticorps antinucléaires
- Complément sérique et fractions (Facteur H, facteur I, protéine MCP)

Traitement

- L'évolution spontanée des MAT de l'adulte se faisait dans la plupart des cas vers l'insuffisance rénale irréversible et la mort (avant l'utilisation des échanges plasmatiques).

- Les échanges plasmatiques quotidiens (entrepris en urgence dès la suspiçion diagnostique) représentent la principale modalité thérapeutique ayant bouleversé le pronostic vital et fonctionnel de la MAT avec des taux de rémissions à long-terme de 80-90 %.
- L'exception au recours systématique aux échanges plasmatiques sont les MAT après chimiothérapie des cancers ou greffes de cellules souches.

- Le bénéfice des échanges plasmatiques est lié à la fois à l'administration d'ADAMTS13 par les transfusions plasmatiques et à l'épuration des multimères de facteur von Willebrand et des anticorps anti-ADAMTS13 par la plasmaphérèse.

Autres …

- Les transfusions de plaquettes doivent être évitées car elles peuvent aggraver les signes neurologiques et l'insuffisance rénale.
- Les corticoides et les immunosuppresseurs (azathioprine, cyclophosphamide) sont souvent utilisés en l'absence d'infection associée. Ils pourraient s'avérer plus particulièrement utiles dans les formes réfractaires et/ou associées à un anticorps antiADAMTS13.
- Les veinoglobulines sont inefficaces (essai controlé).
- Le bénéfice de la vincristine et de la splénectomie reste controversé (récidives).
- **Le rituximab** (anticorps monoclonal humanisé anti-CD20) est en cours d'évaluation.

Vers une classification des MAT

Déficit sévère en ADAMTS13 (PTT)

PTT + mutations d'ADAMTS13

PTT autoimmun + VIH
+ médicaments (anti-agrégants)
+ cancers
« Idiopathique »

ADAMTS13 détectable (SHU ou autres)

SHU + mutation du facteur H
mutation du facteur I
mutation de MCP-1/CD46

SHU post-diarrhéique

SHU sporadique + VIH
+ lupus, autres
+ médicaments
Idiopathique

HELLP Sd, HTA maligne, CAPS, TIH II, MVO...

Colloque des hôpitaux généraux,
Lille 5 Octobre 2010