

SUJETS ABORDÉS

- ✓ Critères de classification et de diagnostic pour le SAPL
- ✓ Anticoagulant de type lupique
- ✓ Anticorps antiphospholipides

Les anticorps antiphospholipides sont un groupe hétérogène d'anticorps pouvant causer un allongement du TCA ; ils réagissent généralement avec les épitopes présents sur des protéines qui forment un complexe avec des phospholipides chargés négativement. Beaucoup de ces anticorps ont besoin de la bêta-2-glycoprotéine 1, une protéine qui se lie aux phospholipides. D'autres peuvent être dirigés contre la prothrombine. L'identification correcte de ces anticorps permettra de caractériser le syndrome des anticorps antiphospholipides (SAPL) (Ruiz-Irastorza *et al.*, 2010 ; Schreiber *et al.*, 2018). Il est important de noter que ces anticorps peuvent interférer avec les réactions de coagulation au laboratoire, allongeant les tests dépendant des phospholipides tels que le TCA et parfois le TP, mais ils ne sont pas associés à des saignements, sauf dans de rares cas où il existe un déficit acquis en prothrombine important. Paradoxalement, ces anticorps sont clairement associés à la thrombose veineuse et artérielle par des mécanismes qui ne sont pas bien compris. Dans les centres de diagnostic des troubles de la coagulation, il est indispensable de pouvoir détecter ces anticorps à l'aide de tests spécifiques pour étudier l'allongement du TCA (Barbosa *et al.*, 2019). Il existe actuellement des lignes directrices spécifiques pour la bonne exécution des tests diagnostiques du SAPL en laboratoire qui peuvent servir à l'actualisation des informations biologiques, voir ci-dessous.

- Devreese, K.M.J.; de Groot, P.G.; de Laat, B.; Erkan, D.; Favaloro, E.J.; Mackie, I.; Martinuzzo, M.; Ortel, T.L.; Pengo, V.; Rand, J.H.; *et al.* Guidance from the Scientific and Standardization Committee for lupus anticoagulant/antiphospholipid antibodies of the International Society on Thrombosis and Haemostasis: Update of the guidelines for lupus anticoagulant detection and interpretation. *J. Thromb. Haemost.* 2020; 18, 2828–2839.
- Devreese KM, Pierangeli SS, de Laat B, Tripodi A, Atsumi T, Ortel TL; Subcommittee on Lupus Anticoagulant/Phospholipid/Dependent Antibodies. Testing for antiphospholipid antibodies with solid phase assays: guidance from the SSC of the ISTH. *J Thromb Haemost.* 2014; 12(5): 792-795.
- Vandeveld A, Gris JC, Moore GW, Musiał J, Zuliy S, Wahl D, Devreese KMJ. Toward harmonized interpretation of anticardiolipin and anti-β2-glycoprotein I antibody detection for diagnosis of antiphospholipid syndrome using defined level intervals and likelihood ratios: communication from the ISTH SSC Subcommittee on Lupus Anticoagulant/Antiphospholipid Antibodies. *J Thromb Haemost.* 2024; S1538-7836(24)00236-8.

Critères de classification et de diagnostic pour le SAPL : puisqu'il est devenu clair que les anticorps antiphospholipides étaient significativement associés à la thrombose vasculaire et à la morbidité de la grossesse, la nécessité de critères consensuels pour le SAPL a abouti aux critères de Sydney, tableau 38 (Miyakis *et al.*, 2006). Les patients sont considérés comme étant atteints du SAPL lorsqu'un événement clinique survient avec au moins un critère biologique positif. Les critères biologiques définissant le SAPL sont la présence d'anticoagulant de type lupique, d'IgG/IgM anticardiolipines (aCL) ou d'IgG/IgM a2GPI, persistante, pendant au moins 12 semaines. Actuellement, une nouvelle initiative internationale est en cours pour développer de nouveaux critères. Les critères biologiques proposés comprennent uniquement les anticorps des critères actuels (anticoagulant de type lupique, IgG/IgM aCL et IgG/IgM a2GPI).

Tableau 38. Critères de Sydney de 2006 pour la classification du SAPL

Critères cliniques	Critères biologiques
1. Thrombose vasculaire	1. Anticoagulant lupique
Veineuse, artérielle ou microvasculaire	≥ 2 résultats positifs
Confirmée par des critères validés objectifs	Au moins 12 semaines d'intervalle
Aucun signe d'inflammation de la paroi vasculaire	
et/ou	
2. Morbidité de la grossesse	2. IgG et/ou IgM anticorps anticardiolipine
≥ 1 mort fœtale inexpliquée à la 10e semaine de gestation ou	Sérum et plasma
≥ 1 naissance prématurée < 34e semaine de gestation en raison de : éclampsie ou pré-éclampsie sévère, insuffisance placentaire	Titrage moyen ou élevé (> 40 GPL ou MPL, ou > 99e percentile)
≥ 3 avortements consécutifs inexpliqués < 10e semaine de gestation	Mesuré par ELISA standardisé
	≥ 2 résultats positifs
	Au moins 12 semaines d'intervalle
et/ou	
	3. IgG et/ou IgM anticorps anti-β2 glycoprotéine I
	Sérum et plasma
	Titrage moyen ou élevé (> 40 GPL ou MPL, ou > 99e percentile)
	Mesuré par ELISA standardisé
	≥ 2 résultats positifs
	Au moins 12 semaines d'intervalle

Anticoagulant lupique

Comment choisir le test ? L'anticoagulant de type lupique peut être détecté par différents tests de coagulation dépendant des phospholipides. La dernière mise à jour des lignes directrices de l'ISTH sur la détection des anticoagulants lupiques recommande d'utiliser deux tests en parallèle, le temps de venin de vipère de Russell dilué (dRVVT) et le TCA (Devreese et al., 2020). Le dRVVT est plus spécifique, tandis que le TCA est plus sensible aux anticoagulants lupiques (dépendant grandement des réactifs utilisés). Les deux dosages sont complémentaires, car les anticorps ne réagissent pas toujours dans les deux. Le dRVVT repose sur l'activation directe de FX par une enzyme présente dans le venin des vipères de Russell. Le TCA s'appuie sur l'activation de la voie de contact (intrinsèque) de la cascade de coagulation. Le choix des réactifs appropriés pour la recherche d'anticoagulants lupiques est important, car plusieurs réactifs sont disponibles, en particulier pour le TCA (Favaloro et al., 2019). Deux aspects doivent être pris en considération dans la sélection du réactif pour le TCA : le choix de l'agent activant et la composition et la concentration des phospholipides. Le temps de coagulation de la silice (SCT) peut être utilisé en remplacement du TCA. La réalisation des dosages des anticoagulants lupiques doit être validée ou vérifiée avant leur mise en œuvre dans la pratique clinique. Il convient qu'une partie du processus de vérification comprenne l'analyse d'échantillons dont la teneur en anticoagulant de type lupique est connue et des valeurs moyennes bien caractérisées (Gardiner et al., 2021a ; Gardiner et al., 2021b).

Comment le test est-il effectué ? L'évaluation des anticoagulants lupiques consiste en une procédure en trois étapes : le dépistage, le mélange et la confirmation (Devreese et al., 2020). Du PPP est nécessaire pour éviter les résultats faussement négatifs en raison de l'interaction des phospholipides et des plaquettes. La phase de dépistage comprend des tests avec des réactifs pour le dRVVT et le TCA à de faibles concentrations phospholipidiques. Un déficit en facteur de coagulation ou des inhibiteurs autres

que l'anticoagulant de type lupique peuvent provoquer un dépistage positif ; il est donc nécessaire de procéder à un mélange et un test de confirmation. La procédure par étapes peut réduire les coûts, car elle évite d'effectuer inutilement l'étape de mélange et de confirmation si l'étape de dépistage est négative. Dans l'étape de confirmation, un excès de phospholipide anionique est ajouté au réactif de test, et l'excès de phospholipide peut réduire ou neutraliser les anticorps. Dans le dRVVT, les dosages de dépistage et de confirmation sont effectués en parallèle, et le résultat de l'étape de confirmation est exprimé sous la forme d'un rapport normalisé selon le calcul : [(dépistage résultat du patient) / (dépistage résultat du pool)] / [(confirmation résultat du patient) / (confirmation résultat du pool)]. Dans l'étape de mélange, le test de dépistage est effectué sur un mélange 1/1 de plasma de patient et de pool de plasma normal. Le test de mélange est exprimé en rapport normalisé [(dépistage mélange) / (dépistage pool de plasma normal)]. Lorsque le temps de coagulation est allongé dans le dosage de confirmation, une étape de mélange supplémentaire avec les réactifs de confirmation (mélange de confirmation) peut être effectuée, et le rapport est plus robuste et moins affecté par l'interférence des déficits en facteurs congénitaux ou acquis. Il existe des tests intégrés qui effectuent les trois étapes en une seule procédure. Les tests de dépistage et de confirmation sont effectués en parallèle sur le plasma du patient mélangé à du PNP et les résultats sont principalement exprimés par la différence entre les deux.

Valeurs limites : pour interpréter les résultats des anticoagulants lupiques, il est nécessaire de déterminer des valeurs limites pour définir la positivité à toutes les étapes. Tout d'abord, il est recommandé que les laboratoires déterminent les valeurs limites en s'appuyant sur une population d'au moins 120 sujets sains, le point limite étant le 99^e percentile après le rejet des valeurs aberrantes (Devreese et al., 2020). Nombre de laboratoires peuvent toutefois avoir des difficultés à recruter 120 personnes. Une approche qui nécessite moins de volontaires est le transfert des valeurs limites recommandées par le fabricant. Cela suppose que les points limites de fabrication reposent sur une vaste population de référence de personnes saines avec des données démographiques adéquates, une méthode statistique correcte et une combinaison réactif-instrument correcte (Castellone, 2017). Lorsque ces conditions sont remplies, les valeurs limites du fabricant doivent être vérifiées avant le transfert en testant 20 volontaires sains représentant la démographie de la population locale. Après avoir rejeté les valeurs aberrantes et les avoir remplacées par de nouveaux résultats provenant des volontaires sains, les résultats (population sans valeurs aberrantes) doivent être comparés à la valeur limite suggérée.

Interférences et limites : la protéine C réactive interfère *in vitro* avec le test du TCA par son affinité aux phospholipides, conduisant à des résultats faussement positifs. Bien que cet effet n'ait pas été observé pour le dRVVT, il peut varier d'un réactif à l'autre. De plus, l'activité coagulante accrue du facteur VIII est liée à un TCA plus court donnant des résultats faussement négatifs. Des taux élevés de facteur VIII peuvent être observés pendant la grossesse, une intervention chirurgicale, une inflammation, ainsi qu'en présence d'une tumeur maligne et d'autres affections. Il n'est pas recommandé de rechercher des anticoagulants lupiques pendant un épisode thrombotique ou une anticoagulothérapie (Devreese et al., 2020). Les lignes directrices les plus récentes de l'ISTH ne recommandent pas de prétiluer les échantillons en présence d'AVK (Devreese et al., 2020). Les anticoagulants oraux directs (AOD) inhibent directement la thrombine (p. ex. le dabigatran) ou le facteur Xa (apixaban, bêtrixaban, edoxaban, rivaroxaban, etc.), avec divers effets sur les tests de coagulation, ce qui conduit à l'interprétation de résultats faux négatifs et faux positifs. Le TCA et le TP doivent être réalisés avant de procéder au test des anticoagulants de type lupique afin d'avoir plus d'informations sur l'échantillon, mais cela n'exclut pas la présence d'AOD ou d'HBPM.

Anticorps antiphospholipides

Comment choisir le test ? Les anticorps anticardiolipine et anti-β₂-glycoprotéine 1 sont identifiés par des immunodosages en phase solide. Les critères de classification du SAPL indiquent la mesure de ces anticorps par ELISA standardisé. Cependant, d'autres techniques de détection des anticorps sont désormais disponibles, notamment la chimiluminescence, les enzymes de fluorescence et les immunodosages multiplex (Devreese et al., 2014). Par rapport aux méthodes ELISA manuelles traditionnelles, les techniques les plus récentes sont plus faciles à utiliser et bénéficient d'une meilleure fidélité de mesure.

Les tests diffèrent en termes de phase solide, de principe de détection, de coating, de source d'antigènes et d'anticorps, d'agents bloquants pour prévenir une liaison non spécifique, de protocole de dilution, d'étalonnage et d'unités (Devreese et al., 2014). Il est recommandé d'effectuer les tests de suivi du patient dans le même laboratoire, car les plateformes ne peuvent pas être utilisées de manière interchangeable.

Comment effectuer le test ? Il est possible d'avoir recours à du sérum ou du PPP pour les aCL et a2GPI (Devreese et al., 2018). La nécessité d'effectuer le test en double dépend des caractéristiques de performances. Elle est particulièrement recommandée pour les analyses ELISA manuelles ou si la mesure inter et intra-cycles n'est pas fidèle à $> 10\%$ (Devreese et al., 2014). À chaque cycle, le matériau de contrôle interne de qualité doit être analysé aux titrages pertinents. Les courbes d'étalonnage doivent être déterminées à chaque cycle ELISA ou pour chaque lot de réactifs dans les systèmes automatisés. Chaque étalonnage doit être évalué et rejeté lorsqu'il ne répond pas aux exigences du fabricant ou lorsque le coefficient de corrélation entre les résultats et les valeurs cibles est inférieur à 0,90 (Devreese et al., 2014). Malheureusement, il n'y a pas d'uniformité dans le matériel de référence pour l'étalonnage des tests. Des efforts sont déployés pour développer de nouvelles normes monocloniales et polycloniales pour l'aCL et l'a2GPI, dans le but de créer des normes de l'OMS avec l'UI/ml comme unité universelle.

Valeurs limites et profil des anticorps : 40 GPL/MPL comme point limite de l'aCL reposait sur des études montrant une meilleure corrélation de cette valeur avec le SAPL (Levine et al., 1997). Cependant, la différence peut être marquée entre 40 GPL/MPL et le 99^e percentile pour l'aCL (Vandevelde et al., 2024). Le comité scientifique et de normalisation de l'ISTH ne recommande pas d'utiliser 40 GPL/MPL comme point limite. Il est suggéré de calculer une valeur limite spécifique au laboratoire pour la positivité sur la base d'un 99^e percentile non paramétrique d'au moins 120 sujets de référence. Le rejet des valeurs aberrantes selon la méthode Dixon/Reed est recommandé pour éviter la surestimation des valeurs limites. Le transfert des points limites du fabricant après vérification sur au moins 20 sujets de référence est une alternative valable si le point limite du fabricant est calculé sur une population de référence suffisamment importante et qu'une méthodologie statistique appropriée a été appliquée. Chaque résultat d'aCL et d'a2GPI au-dessus du point limite doit être signalé comme positif, accompagné de la valeur numérique et de la valeur limite interne (Vandevelde et al., 2024). La positivité de l'un des tests (anticoagulant de type lupique, IgG aCL, IgM aCL, IgG a2GPI ou IgM a2GPI) est suffisante pour diagnostiquer le SAPL. L'interprétation combinée de différents profils d'anticorps antiphospholipides a été suggérée pour identifier les patients à haut risque, par rapport à l'évaluation individuelle. Chez les personnes porteuses d'antiphospholipides asymptomatiques, la double et triple positivité était un facteur de risque pour le développement d'événements thrombotiques, mais la positivité unique de l'aCL ou de l'a2GPI ne l'était pas (Mustonen et al., 2014).

Interférences : la présence de facteur rhumatoïde peut entraîner des résultats faussement positifs pour les IgM aCL et les IgM a2GPI (Devreese et al., 2014 ; Forastiero et al., 2014). Contrairement à la recherche d'anticoagulants lupiques, la recherche d'anticorps par immunodosages en phase solide n'est pas soumise à l'interférence analytique des réactifs de la phase aiguë ou d'une anticoagulothérapie. Toutefois, une hausse transitoire d'aCL et d'a2GPI est observée en conditions inflammatoires (Exner et al., 2020 ; Laureano et Crowthe, 2018).

Références

Barbosa ACN, Montalvão SAL, Barbosa KGN, Colella MP, Annichino-Bizzacchi JM, Ozelo MC, De Paula EV. Prolonged APTT of unknown etiology: A systematic evaluation of causes and laboratory resource use in an outpatient hemostasis academic unit. *Res Pract Thromb Haemost* 2019; 3(4): 749-757.

Castellone DD. Establishing reference intervals in the coagulation laboratory. *Int J Lab Hematol* 2017; 39 Suppl 1: 121-127.

Devreese KMJ, de Groot PG, de Laat B, Erkan D, Favaloro EJ, Mackie I et al. Guidance from the Scientific and Standardization Committee for lupus anticoagulant/antiphospholipid antibodies of the International Society on Thrombosis and Haemostasis: Update of the guidelines for lupus anticoagulant detection and interpretation. *J Thromb Haemost* 2020; 18(11): 2828-2839.

Devreese KMJ, Ortel TL, Pengo V, de Laat B. Laboratory criteria for antiphospholipid syndrome: Communication from the SSC of the ISTH. *J Thromb Haemost* 2018; 16(4): 809-813.

Devreese KM, Pierangeli SS, de Laat B, Tripodi A, Atsumi T, Ortel TL. Testing for antiphospholipid antibodies with solid phase assays: Guidance from the SSC of the ISTH. *J Thromb Haemost* 2014; 12(5): 792-795.

Exner T, Rigano J, Favaloro EJ. The effect of DOACs on laboratory tests and their removal by activated carbon to limit interference in functional assays. *Int J Lab Hematol* 2020; 42 Suppl 1: 41-48.

Favaloro EJ, Kershaw G, Mohammed S, Lippi G. How to optimize activated partial thromboplastin time (APTT) testing: Solutions to establishing and verifying normal reference intervals and assessing APTT reagents for sensitivity to heparin, lupus anticoagulant, and clotting factors. *Semin Thromb Hemost* 2019; 45(1): 22-35.

Forastiero R, Papalardo E, Watkins M, Nguyen H, Quirbach C, Jaskal K et al. Evaluation of different immunoassays for the detection of antiphospholipid antibodies: Report of a wet workshop during the 13th international Congress on Antiphospholipid Antibodies. *Clin Chim Acta* 2014; 428: 99-105.

Gardiner C, Coleman R, de Maat MPM, Dorgalaleh A, Echenagucia M, Gosselin RC, Ieko M, Kitchen S. International Council for Standardization in Haematology (ICSH) laboratory guidance for the evaluation of haemostasis analyser-reagent test systems. Part 1: Instrument-specific issues and commonly used coagulation screening tests. *Int J Lab Hematol* 2021; 43(2): 169-183.

Gardiner C, Coleman R, de Maat MPM, Dorgalaleh A, Echenagucia M, Gosselin RC, Ieko M, Kitchen S. International Council for Standardization in Haematology (ICSH) laboratory guidance for the verification of haemostasis analyser-reagent test systems. Part 2: Specialist tests and calibrated assays. *Int J Lab Hematol* 2021; 43(5): 907-916.

Harris EN, Gharavi AE, Patel SP, Hughes GR. Evaluation of the anti-cardiolipin antibody test: Report of an international workshop held 4 April 1986. *Clin Exp Immunol* 1987; 68(1): 215-222.

Laureano M, Crowther MA. Higher-risk aps: Do we dare to DOAC? *Blood* 2018; 132(13): 1357-1358.

Levine SR, Salovich-Palm L, Sawaya KL, Perry M, Spencer HJ, Winkler HJ, Alam Z, Carey JL. IgG anticardiolipin antibody titer > 40 GPL and the risk of subsequent thrombo-occlusive events and death. A prospective cohort study. *Stroke* 1997; 28(9): 1660-1665.

Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T, Branch DW, Brey RL, Cervera R et al. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J Thromb Haemost* 2006; 4(2): 295-306.

Mustonen P, Lehtonen KV, Javela K, Puurunen M. Persistent antiphospholipid antibody (aPL) in asymptomatic carriers as a risk factor for future thrombotic events: A nationwide prospective study. *Lupus* 2014; 23(14): 1468-1476.

Ruiz-Itastorza G, Crowther M, Branch W, Khamashta MA. Antiphospholipid syndrome. *Lancet* 2010; 376(9751): 1498-1509.

Schreiber K, Sciascia S, de Groot PG, Devreese K, Jacobsen S, Ruiz-Itastorza G, Salmon JE, Shoenfeld Y, Shovman O, Hunt BJ. Antiphospholipid syndrome. *Nat Rev Dis Primers* 2018; 4: 17103.

Vandeveldé A, Gris JC, Moore GW, Musiał J, Zuily S, Wahl D, Devreese KMJ. Toward harmonized interpretation of anticardiolipin and anti-β2-glycoprotein I antibody detection for diagnosis of antiphospholipid syndrome using defined level intervals and likelihood ratios: Communication from the ISTH SSC Subcommittee on Lupus Anticoagulant/ Antiphospholipid Antibodies. *J Thromb Haemost* 2024; 22(8): 2345-2362.