HAL open science

Comment identifier les patients à haut risque thrombotique dans le syndrome des antiphospholipides ?

Mathilde Lambert

To cite this version:

Mathilde Lambert. Comment identifier les patients à haut risque thrombotique dans le syndrome des antiphospholipides ?. Sciences pharmaceutiques. 2022. dumas-03709110

HAL Id: dumas-03709110

https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03709110v1

Submitted on 29 Jun 2022

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives 4.0 International License

Faculté de Pharmacie
Aix*Marseille Université

THÈSE D'EXERCICE / DOCTEUR JUNIOR

Phase d'Approfondissement du DES de Biologie Médicale

Soutenu le 24 juin 2022

Par Mme Mathilde LAMBERT
Née le 04/10/1996
À Paris

Conformément aux dispositions de l'Arrêté du 12 avril 2017
portant organisation du troisième cycle des études de Médecine et de Pharmacie

THÈSE

POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

----oOo----

COMMENT IDENTIFIER LES PATIENTS À HAUT RISQUE THROMBOTIQUE DANS LE SYNDROME DES ANTIPHOSPHOLIPIDES ?

----oOo----

JURY :

Président : Madame le Professeur BARDIN Nathalie

Membres : Monsieur le Docteur BERTIN Daniel

Monsieur le Docteur ARCANI Robin

REMERCIEMENTS

Aux membres de mon jury,

A Madame le Professeur Nathalie BARDIN,

Pour l'honneur que vous me faites de présider ce jury de thèse et d'avoir encadré ce travail. Je vous suis particulièrement reconnaissante de m'avoir si bien accueillie au laboratoire d'immunologie dès mon externat, qui a été aussi agréable qu'enrichissant, et de m'avoir transmis votre goût pour l'immunologie, qui m'a conduit à réaliser cette thèse.

Je vous remercie de m'avoir accordée votre confiance et de m'avoir accompagnée dans l'élaboration de ce travail. Au-delà du côté professionnel, je tiens à vous remercier pour votre soutien, votre enthousiasme et vos précieux conseils tout au long de mon internat.

Veuillez trouver ici le témoignage de ma sincère reconnaissance et de mon profond respect.

A Monsieur le Docteur Daniel BERTIN,

Pour l'honneur que vous me faites de participer à ce jury de thèse et de juger ce travail. Je vous remercie pour la richesse de votre formation au laboratoire d'immunologie, qui a toujours été rigoureuse et passionnante. Veuillez trouver ici mes respectueux remerciements.

A Monsieur le Docteur Robin ARCANI,

Vous me faites l'honneur d'avoir accepté de participer à ce jury et d'apporter votre expérience clinique à la critique de ce travail. Soyez assuré de ma profonde reconnaissance.

A ma famille,

A mes parents, pour la chance d'avoir une famille aussi merveilleuse. **A ma mère**, sans qui tout cela n'aurait pas été possible. Je ne te remercierai jamais assez pour ton soutien sans faille durant toutes ces années, pour ton amour et ton dévouement, sans oublier toutes les valeurs que tu nous as transmises. Merci d'avoir toujours cru en moi et d'être mon modèle au quotidien. A mon tour, je te dédie cette thèse. **A mon père,** pour ta patience, ton amour et ton soutien quand j'en ai eu besoin. Merci de toujours veiller sur nous.

A ma sœur, ma confidente, merci pour ton éternel soutien à toute épreuve et tous tes conseils de « grande sœur ». J'admire sincèrement la femme que tu es devenue.

A Julien, mon beau-frère préféré, pour ton soutien et pour ton humour dont je ne me lasse pas. Promis, je te ferai ces éclairs au chocolat !

A Louis, mon neveu d'amour, ma vedette, pour la joie et l'amour qu'il m'apporte.

A ma marraine et mon oncle, **ma cousine, mon cousin et leurs compagnons**, et **mes petits-neveux** pour ces agréables moments en famille.

A mes grands-parents, pour m'avoir transmis votre force à toute épreuve. A ma grand-mère qui aurait été si fière de mon parcours, comme l'est mon grand-père.

A ma belle-famille, **Valérie, Céline, René, Bertrand et Françoise, Marc et Manu et Jo'** pour m'avoir toujours si bien accueillie dans votre famille et me faire le grand plaisir d'être présent le jour de ma soutenance. Une pensée pour la **famille Wojciechowski** qui n'a pas pu faire le déplacement mais qui m'a toujours accueillie avec tant de générosité.

A mes amis et co-internes,

A Ludivine, sur qui je peux toujours compter. A notre belle amitié qui dure depuis plus de 10 ans et qui n'est pas prête de se terminer.

A mes gélules d'amour, pour ces années pharma qui ont été magiques à vos côtés. **A Caroline,** pour notre binôme de choc, le hasard fait si bien les choses. **A Christophe**, quand deux âmes italiennes se rencontrent, elles ne peuvent que s'entendre. Merci pour tous ces bons moments passés et ceux à venir, vous êtes des amis en or !

A Selim, alias le Toulousain, merci pour ta gentillesse, j'espère te revoir rapidement à Marseille !

A Marine, Maelle et Romane, pour nos journées révisions à la BU... et nos inoubliables soirées maltaises #salsabar.

A la team Delta, Marine, Maëlle, Laurine, Margaux, Inès et Nicolas que j'ai eu la chance de croiser sur mon chemin. Mille mercis pour cet internat de folie à vos côtés.

A Camille, je suis ravie de t'avoir rencontrée, merci pour nos interminables discussions et toutes nos histoires croustillantes.

A Sara, pour ce choix inoubliable rempli de fous rires, merci pour ta bonne humeur quotidienne et ton humour (vive les boby's), ne change surtout pas !

A Clara et Sara (la lyonnaise), pour ces déjeuners toujours très gourmands.

A tous les internes que j'ai eu la chance de rencontrer pendant mon internat. **A Samuel et Lylia**, merci pour tous vos conseils dans la préparation de cette thèse et pour ce début de semestre à l'EFS.

A tous les biologistes, techniciens et autres membres des laboratoires. Merci de m'avoir formée au monde de la biologie médicale.

A toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à l'élaboration de cette thèse.

Mention spéciale à toute l'équipe du laboratoire d'immunologie du CHU de Marseille :

A Xavier, je te remercie chaleureusement pour ton implication dans ma formation en immunologie depuis mon externat et de m'avoir initiée à la recherche.

A toutes les techniciennes du laboratoire d'immunologie, et surtout à **Laure, Hortensia (la fleur) et Joëlle** pour votre bonne humeur quotidienne pendant ces 6 derniers mois.

Sans oublier **Sandrine (le sang)**, merci pour ta gentillesse et ta bienveillance depuis mon externat.

A Franck, mon amour, mon pilier, je ne te remercierai jamais assez pour ton soutien si précieux et ton amour inconditionnel depuis le début de cet internat. Tu m'as appris à toujours voir le bon côté des choses et tu as toujours cru en moi. J'admire l'homme que tu es et je suis si fière que l'on ait réussi à se soutenir dans la préparation de nos thèses. A tous nos projets qui nous attendent désormais. Merci de me rendre heureuse chaque jour, et n'oublie jamais à quel point je t'aime.

« L'Université n'entend donner aucune approbation, ni improbation aux opinions émises dans les thèses. Ces opinions doivent être considérées comme propres à leurs auteurs. »

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES ILLUSTRATIONS **3**

LISTE DES ABRÉVIATIONS **6**

INTRODUCTION **8**

PREMIÈRE PARTIE : ETAT DES CONNAISSANCES **9**

1 LE SYNDROME DES ANTI-PHOSPHOLIPIDES 9

1.1 Historique 9

1.2 Définition 10

1.3 Épidémiologie 12

1.4 Manifestations cliniques du SAPL 13

1.4.1 Manifestations thrombotiques 13

1.4.2 Manifestations obstétricales 17

1.4.3 Autres manifestations 19

1.5 Anomalies biologiques du SAPL 21

1.5.1 Indications de recherche d'anti-phospholipides 21

1.5.2 Les anticorps anti-phospholipides 22

1.5.2.1 Définition 22

1.5.2.2 Les anti-phospholipides conventionnels 24

1.5.2.3 Les anti-phospholipides non conventionnels 33

1.6 Pathogénicité des anticorps anti-phospholipides dans le SAPL 35

1.6.1 Évènements thrombotiques 35

1.6.2 Complications obstétricales 39

1.7 Critères associés au risque thrombotique 40

1.7.1 Facteurs de risque surajoutés de thrombose 40

1.7.2 Facteurs de risque de thrombose liés au SAPL 42

1.7.2.1 D'après le score anti-phospholipides (aPL-S) 42

1.7.2.2 D'après le score global du syndrome des anti-phospholipides (GAPSS) 42

1.8 Traitement 44

1.8.1 Prise en charge des thromboses 45

1.8.1.1 Prévention primaire 45

1.8.1.2 Prévention secondaire de la récidive thrombotique 46

1.8.2 Prise en charge des manifestations obstétricales 47

1.8.2.1 Prévention primaire 47

1.8.2.2 Prévention secondaire 48

1.8.3 Prise en charge du syndrome catastrophique des anti-phospholipides 49

2 ÉVALUATION DE FACTEURS BIOLOGIQUES DE HAUT RISQUE DE RECIDIVE THROMBOTIQUE CHEZ DES PATIENTS PORTEURS D'UN SAPL 50

2.1 Profil immunologique : Type, titre et nombre d'anti-phospholipides 50

2.1.1.1 Type d'anti-phospholipides 51

2.1.1.2 Titre d'anti-phospholipides 54

2.1.1.3 Associations d'anti-phospholipides 56

2.2 La glycosylation des anti-phospholipides 59
2.2.1 Impact de la glycosylation sur les fonctions effectrices des anticorps 59
2.2.2 Pathogénicité de la glycosylation des anticorps dans le syndrome des anti-phospholipides 61
2.3 Les pièges extracellulaires des neutrophiles (NETs) dans le SAPL 64
2.3.1 Implication des NETs dans le processus d'immunothrombose lié au SAPL 64
2.3.2 Intérêt des NETs et auto-anticorps anti-NETs dans l'évaluation de la gravité du SAPL 68
2.4 Vers de nouveaux marqueurs de gravite du SAPL : les anticorps anti-acide lysobisphosphatidique (LBPA) 71
2.4.1 L'acide lysobisphosphatidique 71
2.4.2 Les auto-anticorps anti-acide lysobisphosphatidique 72
DEUXIÈME PARTIE : ÉVALUATION DES AUTO-ANTICORPS ANTI-LBPA DANS LA GRAVITÉ DU SAPL 76
1 INTRODUCTION 76
2 OBJECTIFS 76
3 MATERIELS ET METHODES 77
3.1 Population étudiée 77
3.2 Recueil des données 78
3.3 Méthodes de dosage 79
3.4 Analyse statistique 79
4 RESULTATS 80
4.1 Description de la cohorte 80
4.2 Analyse des caractéristiques cliniques de la cohorte 80
4.3 Analyse des caractéristiques biologiques de la cohorte 82
4.3.1 Répartition des patients en fonction du profil d'aCL 82
4.3.2 Répartition des patients en fonction du profil d'aLBPA 84
CONCLUSION 85
BIBLIOGRAPHIE 87

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1.1 Chronologie des évènements marquants dans la découverte du syndrome des anti-phospholipides[13]. 10

Figure 1.2 Caractéristiques cliniques cumulées au cours de l'évolution de la maladie chez 1 000 patients atteints du syndrome des anti-phospholipides[20] 14

Figure 1.3 Echocardiogramme bidimensionnel montrant une grande végétation au niveau des commissures entre la cuspide coronaire gauche et non coronaire de la valve aortique (flèche)[29] 15

Figure 1.4 Critères de classification du Syndrome Catastrophique des Anti-Phospholipides (CAPS), 2003. 17

Figure 1.5 Détails des complications obstétricales observées au cours de la dernière grossesse chez 247 femmes atteintes d'un syndrome des anti-phospholipides obstétrical pur[36]. 18

Figure 1.6 Livedo reticularis chez une femme atteinte d'un syndrome des anti-phospholipides[44] 20

Figure 1.7 Diversité des cibles antigéniques des anti-phospholipides[52]. 23

Figure 1.8 Représentation schématique de l'ELISA qui détecte les deux types d'aCL[60]. 25

Figure 1.9 Représentation schématique des étapes du dosage d'anticorps anti-cardiolipine[62]. 26

Figure 1.10 Représentation des cinq domaines de la β2-glycoprotéine-1[67]. 27

Figure 1.11 Mécanisme d'activation cellulaire par les anti-β2GP1[69] 28

Figure 1.12 Physiopathologie du syndrome des anti-phospholipides associée à la thrombose vasculaire[94]. 36

Figure 1.13 Représentation schématique de la voie de la NETose[97]. 37

Figure 1.14 Rôle des anti-LBPA dans la physiopathologie du SAPL[102]. 38

Figure 1.15 Physiopathologie des complications obstétricales dans le SAPL[106] 40

Figure 1.16 Facteurs de risque prédisposant les patients à la thrombose[113] 41

Figure 1.17 Le score global du syndrome des anti-phospholipides[115]. 43

Figure 1.18 Traitement du SAPL selon la présentation clinique[120] 44

Figure 2.1 Risque de thrombose veineuse ou artérielle selon le type d'aPL[79]. 52

Figure 2.2 Courbes de Kaplan-Meier représentant le délai médian de survenue d'un deuxième évènement thrombotique en fonction de la présence d'aB2GP1et de la présentation clinique initiale évoquant le SAPL... 54

Figure 2.3 Représentation du titre de LA (n=54) en unités arbitraires (AU/mL) et d'aB2GP1 (n = 52) en unités arbitraires IgG (GAU/mL) chez des patients avec ou sans complications thromboemboliques (TEC). 56

Figure 2.4 Variations de la moyenne géométrique des valeurs d'IgG aB2GP1-Dm1 exprimées en unités chimiluminescentes (CU) dans les groupes de patients porteurs d'un SAPL triple positif, double positif, simple positif et un groupe contrôle 57

Figure 2.5 Incidence annuelle de thrombose en fonction du profil des aPL[167]. 58

Figure 2.6 Structure de la partie glucidique attachée à l'Asn297 du fragment Fc de l'anticorps[173]. 60

Figure 2.7 Les glycoformes des IgG en lien avec leurs propriétés inflammatoires[169]. 61

Figure 2.8 Rapport SNA/ aB2GP1 chez des sujets atteints d'un PAPS (SAPL primaire), SAPS (SAPL secondaire à un LED), SLE + aPL (LED porteurs asymptomatiques d'aPL), aaPL (porteurs asymptomatiques d'aPL) et chez les enfants sains[183] 63

Figure 2.9 Quantités de galactose terminal chez des femmes saines (NHS), des femmes ayant des antécédents de complications obstétricales en l'absence de MAI (PM/aPL-), des femmes ayant un SAPL obstétrical séronégatif et des aPL non conventionnels persistants (SN-OAPS), des femmes porteuses d'aPL et ayant des antécédents de complications obstétricales et de thrombose vasculaire (PM/ VT)....63

Figure 2.10 Concentrations d'ADN extracellulaires (graphique A) et de complexes myéloperoxydase (MPO)-ADN en tant que marqueurs de NETs circulants (graphique B) dans les plasmas de patients atteints de SAPL (APS) par rapport au groupe contrôle....66

Figure 2.11 Détermination de la génération de thrombine (valeurs delta calculées par rapport à l'état initial qui comprend uniquement le plasma) du plasma de témoins sains (control plasma) ou de patients atteints de SAPL primaire (APS plasma) mélangé avec des neutrophiles de témoins sains seuls ou avec un traitement à la DNase....67

Figure 2.12 Concentrations d'ADN acellulaires (graphique A) et de complexes myéloperoxydase (MPO)-ADN en tant que marqueurs de NETs circulants (graphique B) dans les sérums de femmes enceintes atteintes de SAPL (APS) et de femmes enceintes témoins en bonne santé (HC) mesurés par ELISA....68

Figure 2.13 Production de ROS par les neutrophiles isolés à partir de sujets sains sans stimulation (NT) ou après stimulation avec des IgG aPL (15µg/ml), IgG de témoins sains (15µg/ml) ou PMA (50 nmol/L) à temps 0, 0,5, 1, 2, 3 et 4 heures, détecté par fluorescence grâce au DCFH-DA (dichlorodihydrofluorescein diacetate)....68

Figure 2.14 (A) Dégradation des NETs chez les patients atteints de sclérodermie (diffuse cutaneous SSc (dcSSc), limited cutaneous SSc (lcSSc)), SAPL primaire, SAPL secondaire et sujets sains ; (B) Corrélation entre la dégradation des NETs et la présence d'anticorps anti-NETs faiblement retrouvée dans le SAPL primaire mais fortement dans le SAPL secondaire....69

Figure 2.15 Niveaux d'anticorps anti-NET IgG (A) et IgM (B) chez les patients atteints de SAPL primaire, de LED sans aPL, de TVP non provoquée sans aPL et les témoins sains....70

Figure 2.16 Associations entre la positivité des anti-NET IgG et les manifestations cliniques chez 154 personnes présentant un SAPL primaire, un LED sans aPL, une TVP non provoquée sans aPL et les témoins sains....70

Figure 2.17 La reconnaissance de l'EPCR-LBPA par les aPLs favorise l'auto-immunité[100]....71

Figure 2.18 Quantification des auto-anticorps IgG se liant au LBPA par ELISA chez les patients atteints de SAPL, les patients atteints de LED, les patients porteurs du VHC et les témoins normaux (NHS)[93]....73

Figure 2.19 Quantification des auto-anticorps aCL, aLBPA et aB2GP1 par ELISA chez des patients regroupés selon la positivité du LA....73

Figure 2.20 Analyse de corrélation entre la réactivité des aB2GP1, aCL et aLBPA IgG dosés par ELISA chez les patients atteints de SAPL....74

Figure 3.1 Répartition des principaux services prescripteurs d'aPL....77

Figure 3.2 Organigramme de la sélection des patients constituant la cohorte....80

Figure 3.3 Répartition des profils cliniques symptomatiques ou asymptomatiques des patients de la cohorte (n=99) en fonction des profils biologiques SP (simple positif), DP (double positif) et TP (triple positif) des aCL. 82

Figure 3.4 Titres moyens d'aCL pour les isotypes IgM et IgG chez les patients de la cohorte (n=99) en fonction du profil biologique SP (simple positif), DP (double positif) et TP (triple positif) pour les aCL....84

Tableau 1.1 Critères de classification révisés du SAPL, Sydney (2006)....11

Tableau 1.2 Classification des patients porteurs d'un SAPL selon le type et le nombre d'APL présent(s)....12

Tableau 1.3 Recommandations pour la détection des anticoagulants lupiques d'après la Société Internationale de Thrombose et d'Hémostase[50]....22

Tableau 2.1 Stratification du risque thrombotique selon le profil d'aPL d'après l'EULAR, 2019[146]. 51

Tableau 3.1 Caractéristiques démographiques et cliniques de la cohorte (n=99) de patients porteurs d'un SAPL symptomatique ou asymptomatique et de témoins sains. 81

Tableau 3.2 Caractéristiques démographiques, cliniques et biologiques de la cohorte (n=99) en fonction du profil biologique SP (simple positif), DP (double positif) et TP (triple positif) pour les aCL. 83

LISTE DES ABRÉVIATIONS

aANV	Auto-Anticorps Anti-Annexine V
aB2GP1	Auto-Anticorps Anti-β2-GlycoProtéine-1
Ac	Anticorps
ACC	AntiCoagulant Circulant
aCL	Auto-Anticorps AntiCardiolipine
ADCC	Cytotoxicité à médiation Cellulaire Dépendante des Anticorps
AHAI	Anémie Hémolytique Auto-Immune
AIT	Accident Ischémique Transitoire
aLBPA	Auto-Anticorps Anti-Acide LysoBisPhosphatidique
AOD	Anticoagulant Oraux Directs
aPE	Auto-Anticorps Anti-PhosphatidylÉthanolamine
aPL	Auto-Anticorps Anti-Phospholipides
aPT	Auto-Anticorps Anti-ProThrombine
AVC	Accident Vasculaire Cérébral
AVK	Anti-Vitamines K
B2GP1	β2–Glycoprotéine–1
CAPS	Syndrome Catastrophique des Anti-Phospholipides
CE	Cellule endothéliale
CIVD	Coagulation IntraVasculaire Disséminée
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
DID	Diabète InsulinoDépendant
DMI	Démence Multi-Infarctus
DRVVT	Temps de Venin de Vipère Russell Dilué
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EPCR	Récepteur Endothélial à la Protéine C
EULAR	European Alliance of Associations for Rheumatology
FCS	Fausse Couche Spontanée
FT	Facteur Tissulaire
GPL	IgG PhosphoLipid Units
HBPM	Héparine de Bas Poids Moléculaire
HDL	High Density Lipoprotein
HELLP	Hemolysis, Elevated Liver enzyme, Low Platelets syndrome
HLA	Human Leucocyte Antigen
HNF	Héparine Non Fractionnée
HUVEC	Cellules Endothéliales de la Veine Ombilicale Humaine
ICAM	IntraCellular Adhesion Molecule
IFN	Interféron
Ig	Immunoglobuline
INR	International Normalized Ratio
ISTH	International Society on Thrombosis and Haemostasis
LA	Lupus Anticoagulant
LBPA	Acide LysoBisPhosphatidique
LDL	Low Density Lipoprotein
LED/ SLE	Lupus Erythémateux Disséminé/ Systemic Lupus Erythematosus
MAI	Maladie Auto-Immune
MAP Kinase	Mitogen-Activated Protein Kinase

MBL	Mannose Binding Lectin
MFIU	Mort Fœtale In Utero
MPL	IgM PhosphoLipid Units
MPO	Myéloperoxydase
MPR	Récepteur au Mannose-6-Phosphate
MTEV	Maladie ThromboEmbolique Veineuse
NADPH	Nicotinamide Adenine Dinucléotide Phosphate Hydrogéné
NET	Neutrophil Extracellular Traps
PAPS	Syndrome Primaire des Anti-Phospholipides
PAR	PolyArthrite Rhumatoïde
PE	PhosphatidylÉthanolamine
PT	ProThrombine
PTI	Purpura Thrombopénique Immunologique
PTT-LA	Partial Thromboplastin Time – Lupus Anticoagulant
RCIU	Retard de Croissance Intra-Utérin
ROS	Reactive Oxygen Species
SAPL	Syndrome des Anti-Phospholipides
SAPS	Syndrome Secondaire des Anti-Phospholipides
SDRA	Syndrome de Détresse Respiratoire Aiguë
SEP	Sclérose En Plaques
SGS	Syndrome de Gougerot-Sjögren
TCA	Temps de Céphaline Activée
TLR	Récepteur Toll-Like
TNF	Tumor Necrosis Factor
TPHA	Treponema Pallidum Hemagglutinations Assay
TVP	Thrombose Veineuse Profonde
VCAM	Vascular Cell Adhesion Molecule
VDRL	Venereal Disease Research Laboratory

INTRODUCTION

Le syndrome des anti-phospholipides (SAPL) est une maladie auto-immune (MAI) systémique caractérisée par la survenue de manifestations thrombotiques artérielles, veineuses et/ou obstétricales associée à la persistance d'auto-anticorps anti-phospholipides (aPL) dans le sang.

Les aPL constituent une famille très hétérogène d'anticorps pro-thrombogènes dirigés contre différents phospholipides (PL) anioniques membranaires et/ou des complexes protéines/phospholipides. Seulement trois aPL appartiennent aux critères de définition : les auto-anticorps dirigés contre la cardiolipine (aCL), les auto-anticorps dirigés contre la β2-glycoprotéine-1 (aB2GP1) et le lupus anticoagulant (LA).

La principale problématique de cette pathologie repose sur la difficulté à prédire une récidive thrombotique. C'est pourquoi, ce travail se propose de discerner de nouveaux marqueurs biologiques de gravité permettant d'identifier les patients à haut risque thrombotique, dans le but d'adapter leur prise en charge thérapeutique afin de limiter la survenue de récidives et de complications graves.

Dans une première partie, nous nous intéresserons aux critères de définition clinico-biologiques du SAPL, sa physiopathologie et son traitement en précisant les critères actuels associés au risque thrombotique. Dans une seconde partie, nous tenterons de répondre à une question récurrente des cliniciens portant sur l'identification des patients à haut risque thrombotique dans le SAPL. Pour cela, nous établirons une revue de la littérature sur divers marqueurs biologiques associés à la récurrence thrombotique et retrouvés chez ces patients ainsi que sur de nouveaux marqueurs potentiels de gravité n'ayant pas encore été explorés à ce jour.

Ce travail bibliographique constitue ma thèse de Docteur en Pharmacie. Il sera poursuivi par un mémoire de DES de Biologie Médicale portant sur l'évaluation de nouveaux marqueurs biologiques de gravité du SAPL, les auto-anticorps dirigés contre l'acide lysobisphosphatidique (LBPA), et l'analyse des dosages de ces auto-anticorps avec les évènements cliniques, recensés de manière rétrospective, dans une cohorte de patients porteurs d'un SAPL.

PREMIÈRE PARTIE : ETAT DES CONNAISSANCES

1 LE SYNDROME DES ANTI-PHOSPHOLIPIDES

1.1 HISTORIQUE

L'histoire des anticorps anti-phospholipides démarre au XXème siècle (Figure 1.1). En 1906, Bordet et Wassermann[1] découvrent les anticorps anti-phospholipides grâce à un test diagnostique de la syphilis qui reposait sur la réaction de fixation du complément. L'antigène utilisé était alors un extrait alcoolique de cœur de bœuf contenant principalement un phospholipide : la cardiolipine. Cet extrait antigénique fut, dès lors, utilisé durant plusieurs décennies dans des campagnes de dépistage de la syphilis au travers d'un test sérologique connu sous le nom de VDRL (Venereal Disease Research Laboratory).

Par la suite, dans les années 1950, Moore et Lutz[2] révèlent l'existence de sérologies syphilitiques faussement positives et persistantes chez des patients atteints de Lupus Érythémateux Disséminé (LED) avec un VDRL positif et un TPHA (Treponema pallidum Haemagglutination Assay) négatif, ce dernier détectant des anticorps spécifiques du *Treponema Pallidum*. Cette sérologie, dite dissociée, deviendra plus tard l'un des critères biologiques de diagnostic du LED établis par la Société Américaine de Rhumatologie. En parallèle, Conley et Hartmann[3] découvrent, dans le même temps, l'existence d'une activité plasmatique anticoagulante chez des patients lupiques, qu'ils dénomment « anticoagulant circulant ».

C'est en 1963 que Bowie[4] décrit l'association entre la présence d'un anticoagulant circulant et la survenue de thromboses veineuses ou artérielles chez des patients lupiques. Vingt ans plus tard, en 1980, Soulier et Boffa[5] constatent que ces anticoagulants circulants sont également associés à des pertes fœtales à répétition.

En 1983, Harris[6] met alors au point un nouveau dosage radio-immunologique à la recherche d'auto-anticorps anti-cardiolipine, largement plus sensible que le VDRL, qui sera remplacé, deux ans plus tard, par un test ELISA[7] (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay). Hughes[8] évoque la même année et pour la première fois l'existence d'un syndrome des anti-cardiolipine qui rassemble la présence d'anticorps anti-cardiolipine, de l'anticoagulant circulant, d'une thrombopénie et de la survenue de thromboses.

Finalement, Harris[9] montre en 1987 que le sérum de ces patients réagit avec différents types de phospholipides et introduit le nom de « syndrome des anti-phospholipides » qui désigne l'association de manifestations cliniques dues à des anticorps dirigés contre les phospholipides. En 1988, Asherson *et al.*[10] individualisent le syndrome primaire des anti-phospholipides chez des patients non lupiques.

Les années 1990 sont marquées par la découverte de cofacteurs, des protéines complexées aux phospholipides qui constitueraient en réalité la véritable cible antigénique des anticorps, en particulier la β2-glycoprotéine-1 (B2GP1)[11] et la prothrombine (PT)[12]. Il faudra attendre 1999 pour qu'un consensus international établisse les critères de classification du SAPL, qui seront révisés en 2006.

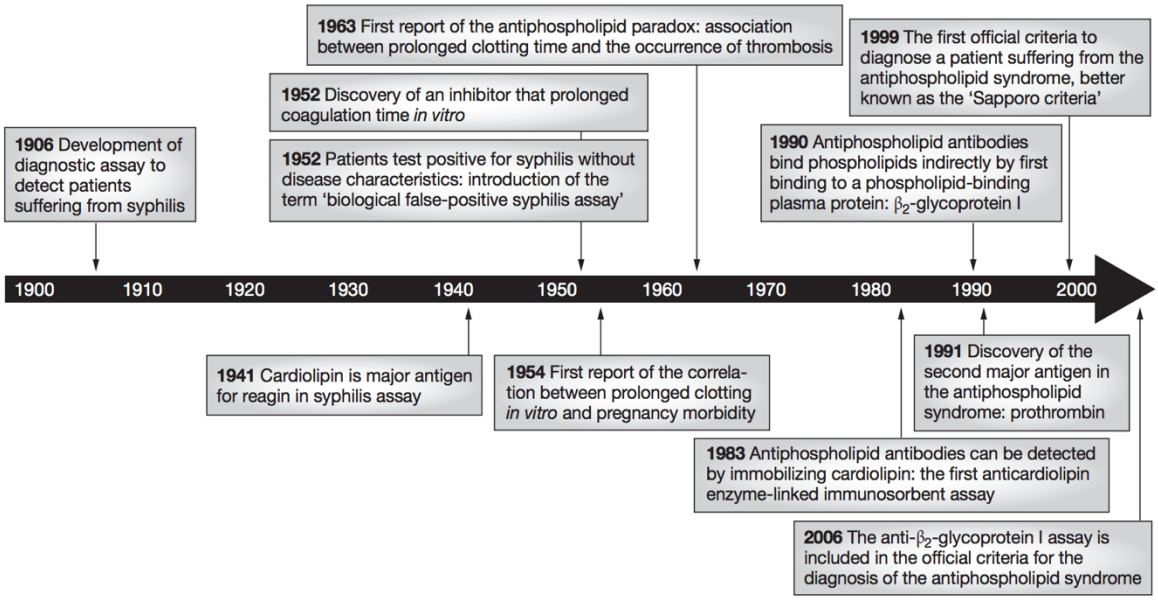


Figure 1.1 Chronologie des évènements marquants dans la découverte du syndrome des anti-phospholipides[13].

1.2 DEFINITION

Le syndrome des anti-phospholipides est une pathologie auto-immune définie par la survenue de manifestations thrombotiques artérielles, veineuses et/ou obstétricales associée à la persistance d'anticorps anti-phospholipides : présence d'un lupus anticoagulant, d'anticorps anti-cardiolipine d'isotype IgG et/ou IgM, d'anticorps anti-β2-glycoprotéine-1 d'isotype IgG et/ou IgM.

Les critères diagnostiques du SAPL ont été définis en 1999 lors du congrès de Sapporo[14] puis réévalués en 2006 à Sydney[15]. Cette classification repose sur la présence d'un critère clinique et d'un critère biologique, présentés dans le Tableau 1.1. En revanche, la classification du SAPL doit être évitée si moins de 12 semaines ou plus de 5 ans séparent le critère biologique et la manifestation clinique.

CRITERES CLINIQUES
• Au moins une thrombose vasculaire : artérielle, veineuse profonde ou capillaire confirmée par l'imagerie ou l'histologie
• Ou des complications obstétricales en lien avec des thromboses placentaires : - Au moins 3 fausses couches spontanées (FCS) successives avant la 10ème semaine d'aménorrhée (SA) - Ou un accouchement prématuré avant la 34ème semaine d'aménorrhée d'un nouveau-né morphologiquement normal, en raison d'une éclampsie, d'une pré-éclampsie ou d'une insuffisance placentaire - Ou une mort fœtale in utéro (MFIU) inexpliquée après la 10ème semaine d'aménorrhée avec un fœtus de morphologie normale.
CRITERES BIOLOGIQUES
• Détection sur 2 prélèvements à au moins 12 semaines d'intervalle d'au moins un anticorps anti-phospholipides conventionnel dans le sérum ou le plasma : - Un anticoagulant circulant de type lupique ou Lupus Anticoagulant, dépisté selon les recommandations de l'ISTH (International Society on Thrombosis and Haemostasis) - Un anticorps anti-cardiolipine IgG et/ou IgM à taux modéré ou élevé (> 40 unités GPL ou MPL ou titre > 99ème percentile) par un test ELISA standardisé pour la recherche d'anticorps anti-cardiolipine dépendants de la β2-GP1 - Un anticorps anti-β2-glycoprotéine-1 IgG et/ou IgM à taux modéré ou élevé (> 40 unités GPL ou MPL ou titre > 99ème percentile) par un test ELISA standardisé.

Tableau 1.1 Critères de classification révisés du SAPL, Sydney (2006).

Les critères révisés de Sydney ont permis d'introduire les aB2GP1 dans les critères biologiques du SAPL et d'allonger la durée d'intervalle témoignant de la persistance des aPL à 12 semaines, contre les 6 semaines qui avaient été définies dans les critères de Sapporo. Ce dernier changement permet d'améliorer la spécificité des tests diagnostiques en éliminant les

faux positifs liés à des aPL transitoires. De plus, ces critères révisés amènent une précision sur les valeurs seuils de détection des anomalies biologiques. Ils introduisent également une sous-classification des patients en quatre catégories selon le type et le nombre d'aPL présent(s), comme représenté dans le Tableau 1.2. Ceci suggère que la multiple positivité des aPL est associée à une évolution plus sévère de la maladie avec un risque significativement plus élevé de survenue de thrombose.

Type I : présence d'au moins 2 critères biologiques (toute combinaison)
Type II : présence d'un seul critère biologique - Type IIa : LA présent seul - Type IIb : aCL présent seul - Type IIc : antiβ2GPI présent seul.

Tableau 1.2 Classification des patients porteurs d'un SAPL selon le type et le nombre d'APL présent(s).

Le SAPL peut être primaire lorsqu'il n'est associé à aucune autre MAI, secondaire à une MAI (la plus fréquente étant le LED où les aPL sont présents dans 36% des cas[16]) ou s'aggraver en syndrome catastrophique des anti-phospholipides (CAPS) lorsqu'il est associé à l'infarctus de plusieurs organes en moins d'une semaine. Le CAPS est une complication grave du SAPL car il peut aboutir à une défaillance multiviscérale avec décès survenant dans 50% des cas[17]. Un SAPL primaire peut évoluer en SAPL secondaire dans 14% des cas après une durée moyenne de 8,2 ans[18].

Toutefois, du fait de la survenue de thromboses répétées chez le sujet jeune, le SAPL peut se confondre avec d'autres causes de thromboses. Notamment, il peut s'agir de déficits congénitaux en protéine C ou S, en antithrombine III, ou bien de mutation G1691A du gène du facteur V (Facteur V de Leiden) et de mutation G20210A du gène du facteur II (gène de la prothrombine), d'une hyperhomocystéinémie familiale, qui doivent donc être écartés par des tests biologiques adaptés.

1.3 ÉPIDEMIOLOGIE

Les aPL sont retrouvés dans 1 à 5% de la population générale à des taux généralement faibles[19] et leur fréquence augmente avec l'âge chez les sujets sains, sans manifestation clinique associée au SAPL. Le SAPL touche principalement les femmes avec un sex-ratio de 1 homme

pour 5 femmes. L'âge moyen au diagnostic est de 42 ans[20]. Le SAPL est une pathologie rare puisque l'incidence est de 5 nouveaux cas pour 100 000 habitants par an et sa prévalence est estimée à 40 à 50 cas pour 100 000 sujets[19]. Le SAPL primaire est majoritaire, chez 53% des patients, tandis que 36% des patients ont un SAPL secondaire, associé à un LED. La prévalence du CAPS est estimée à moins de 1% des SAPL[21] et 50% des CAPS sont révélateurs d'un SAPL[22].

Des études familiales ainsi que des études sur des modèles animaux suggèrent une prédisposition génétique au SAPL, en partie liée aux gènes du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Les allèles HLA (Human Leukocyte Antigen) les plus fréquemment associés avec le SAPL sont le HLA-DR4 et le HLA-DRw53. De plus, la présence d'anticorps anti-cardiolipine et de lupus anticoagulant semble elle aussi associée à ces mêmes antigènes HLA[23]. L'association du SAPL avec les allèles du système HLA est donc une conséquence de l'association de l'anti-phospholipide avec les allèles HLA. D'autres gènes, extérieurs au CMH, sont susceptibles de contribuer au développement d'un SAPL, notamment le gène IRF5 (codant pour le facteur de régulation de l'interféron 5) et le gène STAT4 (codant pour le transducteur de signal et activateur de la transcription 4).

1.4 Manifestations cliniques du SAPL

1.4.1 Manifestations thrombotiques

Le SAPL se manifeste par des thromboses spontanées qui peuvent toucher tous les organes, à distinguer des thromboses associées aux vascularites qui elles sont liées à une lésion de la paroi vasculaire. La clinique du SAPL dépend de la localisation des thromboses, ce qui explique le caractère hétérogène de ses manifestations cliniques. Les évènements thrombotiques peuvent toucher tout l'arbre vasculaire : artériel, veineux ou microcirculatoire, à la différence des thrombophilies congénitales qui sont responsables de maladie thromboembolique veineuse (MTEV). Les récidives thrombotiques en l'absence de traitement anticoagulant sont fréquentes et surviennent souvent sur le même territoire vasculaire que l'épisode révélateur[24].

D'après l'étude prospective menée par Cervera *et al.* sur 1000 patients atteints de SAPL (Figure 1.2), les localisations thrombotiques les plus fréquemment retrouvées sont les **thromboembolies veineuses des membres inférieurs** avec une prévalence de 38,9%[20]. Les

thromboses veineuses superficielles ne sont pas incluses dans les critères cliniques du SAPL. Des thromboses veineuses de localisation atypique sont également retrouvées telles que des thromboses de la veine cave supérieure ou inférieure, des veines rénales et surrénales, des veines mésentériques, ou encore des veines rétiniennes[24]. Le versant artériel est moins fréquent mais généralement plus grave et met en jeu le pronostic vital.

Table 3. Cumulative clinical features during the evolution of disease in 1,000 patients with antiphospholipid syndrome

Manifestation	No. (%) of patients
Peripheral thrombosis	
Deep vein thrombosis	389 (38.9)
Superficial thrombophlebitis in the legs	117 (11.7)
Arterial thrombosis in the legs	43 (4.3)
Venous thrombosis in the arms	34 (3.4)
Arterial thrombosis in the arms	27 (2.7)
Subclavian vein thrombosis	18 (1.8)
Jugular vein thrombosis	9 (0.9)
Neurologic manifestations	
Migraine	202 (20.2)
Stroke	198 (19.8)
Transient ischemic attack	111 (11.1)
Epilepsy	70 (7.0)
Multiinfarct dementia	25 (2.5)
Chorea	13 (1.3)
Acute encephalopathy	11 (1.1)
Transient amnesia	7 (0.7)
Cerebral venous thrombosis	7 (0.7)
Cerebellar ataxia	7 (0.7)
Transverse myelopathy	4 (0.4)
Hemiballismus	3 (0.3)
Pulmonary manifestations	
Pulmonary embolism	141 (14.1)
Pulmonary hypertension	22 (2.2)
Pulmonary microthrombosis	15 (1.5)
Fibrosing alveolitis	12 (1.2)
Other (adult respiratory distress syndrome, pulmonary hemorrhage, pulmonary artery thrombosis)	7 (0.7)
Cardiac manifestations	
Valve thickening/dysfunction	116 (11.6)
Myocardial infarction	55 (5.5)
Angina	27 (2.7)
Myocardiopathy	29 (2.9)
Vegetations	27 (2.7)
Coronary bypass rethrombosis	11 (1.1)
Intracardiac thrombus	4 (0.4)
Intraabdominal manifestations	
Renal manifestations (glomerular thrombosis, renal infarction, renal artery thrombosis, renal vein thrombosis)	27 (2.7)
Gastrointestinal manifestations (esophageal or mesenteric ischemia)	15 (1.5)
Splenic infarction	11 (1.1)
Pancreatic infarction	5 (0.5)
Addison's syndrome	4 (0.4)
Hepatic manifestations (Budd-Chiari syndrome, small hepatic vein thrombosis)	7 (0.7)
Cutaneous manifestations	
Livedo reticularis	241 (24.1)
Leg ulcers	55 (5.5)
Pseudovasculitic lesions	39 (3.9)
Digital gangrene	33 (3.3)
Cutaneous necrosis	21 (2.1)
Splinter hemorrhages	7 (0.7)
Osteoarticular manifestations	
Arthralgia	387 (38.7)
Arthritis	271 (27.1)
Avascular necrosis of bone	24 (2.4)
Ophthalmologic manifestations	
Amaurosis fugax	54 (5.4)
Retinal artery thrombosis	15 (1.5)
Retinal vein thrombosis	9 (0.9)
Optic neuropathy	10 (1.0)
Ear, nose, and throat manifestations	
Nasal septum perforation	8 (0.8)
Hematologic manifestations	
Thrombocytopenia (<100,000 platelets/μl)	296 (29.6)
Hemolytic anemia	97 (9.7)
Obstetric manifestations (n = 590 pregnant women)	
Preeclampsia	56 (9.5)
Eclampsia	26 (4.4)
Abruptio placentae	12 (2.0)
Postpartum cardiopulmonary syndrome	3 (0.5)
Fetal manifestations (n = 1,580 pregnancies)	
Early fetal loss (<10 weeks)	560 (35.4)
Late fetal loss (≥10 weeks)	267 (16.9)
Live birth	753 (47.7)
Premature birth, no. premature/no. live births	80/753 (10.6)

Figure 1.2 Caractéristiques cliniques cumulées au cours de l'évolution de la maladie chez 1 000 patients atteints du syndrome des anti-phospholipides[20].

L'accident vasculaire cérébral (AVC) est la manifestation **neurologique** la plus fréquente, retrouvée chez 30% des patients porteurs d'un SAPL, localisé le plus souvent dans le territoire de l'artère sylvienne. D'autres manifestations neurologiques telles que la migraine, l'épilepsie, l'accident ischémique transitoire (AIT) ou la démence à infarctus multiples (DMI) causée par la répétition d'AVC sont largement décrits.

Les épisodes de dyspnée, fièvre ou encore la présence d'un infiltrat sur la radiographie pulmonaire associés à la présence d'aPL sont des signes cliniques qui doivent faire suspecter une atteinte **pulmonaire** liée au SAPL. En effet, le spectre clinique des manifestations pulmonaires est large. Les atteintes les plus fréquentes regroupent la thromboembolie pulmonaire, qui peut occasionner une découverte inaugurale de la maladie ainsi que l'hypertension pulmonaire causée par des embolies pulmonaires récurrentes et qui peut s'accompagner, dans les cas graves, d'une insuffisance isolée de la valve tricuspide[25]. Plus rarement, des SDRA[26] (Syndrome Détresse Respiratoire Aigüe), des hémorragies intra-alvéolaires[27] et des thromboses des vaisseaux pulmonaires[28] ont été décrits.

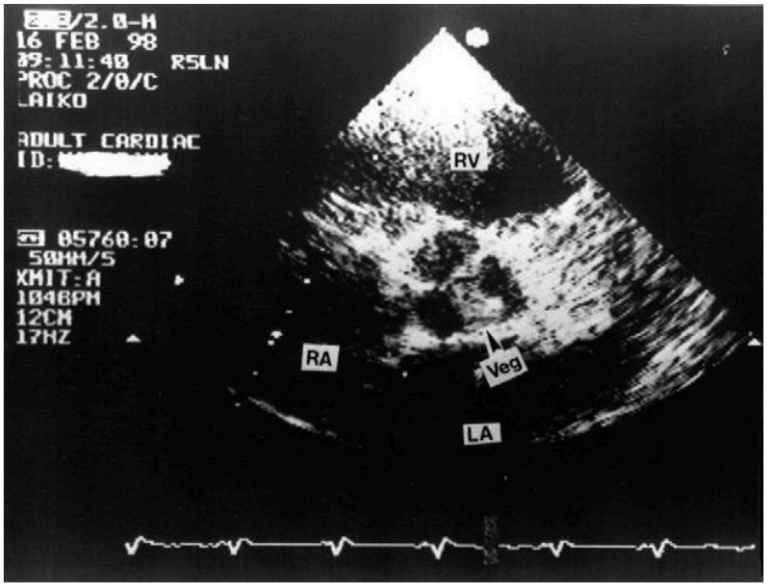


Figure 1.3 Echocardiogramme bidimensionnel montrant une grande végétation au niveau des commissures entre la cuspide coronaire gauche et non coronaire de la valve aortique (flèche)[29]. RV = Ventricule droit, LA = Oreillette gauche, RA = oreillette droite.

La présence d'aPL est également associée à la survenue de manifestations **cardiaques**, notamment des valvulopathies survenant dans 11,6% des cas[20]. Ces anomalies valvulaires, touchant principalement la valve mitrale, s'expliquent par un épaississement ou un dysfonctionnement valvulaire qui doit être affirmé par échographie en mesurant l'épaisseur de la valve et en recherchant des végétations. A noter que la présence de végétations valvulaires non infectieuses doit faire suspecter une endocardite de Libman-Sacks[30], représentée dans la Figure 1.3, qui peut entraîner des complications graves à type d'insuffisance valvulaire sévère, de surinfection menant à une endocardite infectieuse, ou encore d'évènements thromboemboliques. D'autres manifestations cardiaques telles que les thrombus intracardiaques, les cardiomyopathies et les dysfonctions diastoliques sont plus rarement

décrites[31]. Par ailleurs, une étude récente sur une cohorte serbe a montré que des patients porteurs d'aCL IgG positifs avaient une prévalence plus élevée de lésions valvulaires[32]. De plus, cette étude a montré que la survenue d'infarctus du myocarde et de cardiomyopathies est significativement associée à des titres plus élevés d'aCL IgG. A noter que, comme dans toute MAI, le SAPL s'accompagne d'une **athérosclérose dite « accélérée »**, à médiation immunitaire, qui conduit de ce fait à l'apparition de maladies cardiovasculaires[33].

L'atteinte **rénale** dans le SAPL peut être causée par une thrombose à n'importe quel niveau du système vasculaire du rein, telles que la sténose de l'artère rénale, l'infarctus rénal, la thrombose de la veine rénale, la microangiopathie thrombotique et l'hypertension[34]. La biopsie rénale permet de confirmer ce diagnostic.

Le **CAPS** est la forme la plus sévère, avec une mortalité dans la moitié des cas, mais heureusement peu fréquente (<1%) du SAPL. Elle se définit par une thrombose généralisée des petits vaisseaux avec une atteinte multi-organes affectant, par ordre de fréquence, les reins (73%), les poumons (60%), le cerveau (56%), le cœur (50%) et la peau (47%) d'après une cohorte de 500 patients du registre international CAPS[22]. Des facteurs déclenchants ont été recensés dans 65% des CAPS avec majoritairement la survenue d'infections dans 49% des cas, des voies respiratoires (33%), des infections urinaires (19%) et de la peau (13%) mais aussi d'autres causes déclenchantes telles que les chirurgies, les néoplasies, les contraceptifs oraux, les complications obstétricales, les médicaments (arrêt d'un traitement anticoagulant, instauration d'agonistes de la thrombopoïétine), les poussées lupiques, ou encore des traumatismes. Au niveau biologique, les LA (83%), les aB2GP1 IgG (81%) et les aCL d'isotype IgG (78%) sont le plus souvent retrouvés. On observe une CIVD (Coagulation Intra Vasculaire Disséminée) dans 11% des cas[22]. Le CAPS peut compliquer un SAPL ou survenir de manière inaugurale. Des critères diagnostiques du CAPS ont été proposés à l'occasion du 10ème congrès international sur les aPL en 2002, à Taormina. C'est en 2003 que Asherson *et al.*[35] établissent un consensus international sur les critères de classification et de recommandations thérapeutiques du CAPS (Figure 1.4).

Un CAPS est dit certain en présence des quatre critères suivants

1) Atteinte d'au moins 3 organes, systèmes ou tissus

2) Développement des symptômes simultanément ou en moins d'une semaine

3) Confirmation anatomopathologique d'une occlusion des petits vaisseaux dans au moins un organe ou tissu

4) Confirmation biologique de la présence d'anticorps anti-phospholipides (anticoagulant de type lupique, anticorps anti-cardiolipine ou anti-β2-glycoprotéine-1) persistants à 12 semaines d'intervalle.

Un CAPS est dit probable dans les cas suivants

- Présence des critères 2,3 et 4 mais de seulement 2 organes, systèmes ou tissus atteints

- Présence des critères 1, 2 et 3 mais absence de confirmation biologique des aPL à 12 semaines d'intervalle, due au décès précoce d'un patient jamais testé pour la présence d'aPL avant la survenue du CAPS

- Présence des critères 1, 2 et 4

- Présence des critères 1, 3 et 4 avec survenue d'un troisième évènement clinique à plus d'une semaine mais à moins d'un mois, en dépit du traitement anticoagulant.

Figure 1.4 Critères de classification du Syndrome Catastrophique des Anti-Phospholipides (CAPS), 2003.

1.4.2 MANIFESTATIONS OBSTETRICALES

Par définition, la grossesse est un état pro-thrombotique. En présence d'aPL circulants, le risque de thrombose placentaire augmente, causant de nombreuses complications obstétricales. Trois complications obstétricales appartiennent aux critères diagnostiques du SAPL :

- La survenue d'au moins 3 FCS successives avant la 10ème SA, après exclusion d'une cause anatomique ou hormonale maternelle ou d'une anomalie génétique maternelle ou paternelle.

- La survenue d'une MFIU inexpliquée au-delà de la 10ème SA avec un fœtus de morphologie normale établie par échographie ou par un examen macroscopique. Elles représentent la complication fatale la plus fréquente (17,8%) d'après le registre européen du syndrome obstétrical des anti-phospholipides (EUROAPS)[36] qui recense le suivi de 247 femmes enceintes porteuses d'un SAPL obstétrical pur (Figure 1.5).

- La survenue d'un accouchement prématuré avant la 34ème SA d'un nouveau-né morphologiquement normal, en raison d'une éclampsie, d'une pré-éclampsie sévère ou d'une insuffisance placentaire. La prématurité est la complication non fatale la plus fréquente, retrouvée dans 47,3% des cas. La pré-éclampsie est un syndrome défini par une hypertension et une protéinurie apparaissant après 20 semaines de grossesse. L'éclampsie est confirmée en présence de crises convulsives généralisées survenant au cours d'une pré-éclampsie.

Complications	N (%)
No	118 (47.8)
Yes	129 (52.2)
Prematurity	61 (47.3)
Stillbirth & Fetal Loss	29 (22.5)
Miscarriage (latest)	21 (16.3)
FGR early onset	18 (14.0)
Preeclampsia early onset	17 (13.2)
Preeclampsia late onset	16 (12.4)
Prematurity & Preeclampsia early onset/HELLP	15 (11.6)
Prematurity & FGR early onset	9 (7.0)
HELLP	7 (5.4)
Abnormal uterine blood flow	7 (5.4)
Cord blood flow restriction	4 (3.1)
Abruptio placentae	5 (3.8)
Prematurity & FGR & Preeclampsia/HELLP	4 (3.1)
Abnormal middle cerebral artery blood flow	4 (3.1)
FGR late onset	2 (1.6)
Placental haematoma	1 (0.8)

* Latest pregnancy. The majority of women were under any treatment.

Figure 1.5 Détails des complications obstétricales observées au cours de la dernière grossesse chez 247 femmes atteintes d'un syndrome des anti-phospholipides obstétrical pur[36].

La diminution du flux sanguin dans les artères utérines, mesurée par vélocimétrie Doppler, est un marqueur indirect d'insuffisance placentaire et/ou d'une pré-éclampsie. Par conséquent, depuis 2017, l'EULAR (European Alliance of Associations for Rheumatology)[37] recommande une surveillance fœtale chez les femmes enceintes atteintes d'un SAPL qui comprend une échographie Doppler des artères ombilicales et utérines au second trimestre (20-24 semaines de grossesse) afin d'évaluer les risques de l'issue fœtale tardive de la grossesse[38].

D'autres manifestations obstétricales plus anecdotiques peuvent également survenir dans le cadre d'un SAPL obstétrical :

- Un retard de croissance intra-utérin (RCIU)
- Un HELLP (Hemolysis, Elevated Liver enzymes, Low Platelet count) syndrome. C'est une complication grave de la grossesse associant une hémolyse, une élévation des

enzymes hépatiques et une thrombopénie, et qui survient le plus souvent dans un contexte de pré-éclampsie. Son diagnostic doit être évoqué devant tout tableau clinique digestif. Ces anomalies biologiques traduisent une micro-angiopathie disséminée résultant d'une maladie placentaire. Par conséquent, son évolution naturelle est brutale et sévère avec un risque de décollement placentaire, d'insuffisance rénale aiguë, d'hématome hépatique sous-capsulaire, d'accouchement prématuré voire même d'une mort fœtale ou maternelle[39].

- Un hématome rétro-placentaire.

Malgré le passage transplacentaire des aPL maternels, les enfants nés de mères porteuses d'un SAPL ne semblent pas souffrir de thrombose ou de LED, d'après une étude prospective européenne menée sur une cohorte multicentrique de 134 enfants[40].

Certaines hypothèses suggèrent que le SAPL obstétrical est une forme distincte du SAPL « classique », avec des manifestations cliniques, des résultats biologiques et un traitement différents. En effet, la thrombose veineuse ou artérielle ainsi que la présence d'un SAPL secondaire à un LED chez les femmes atteintes de SAPL obstétrical sont rares par rapport au SAPL classique. Toutefois, il semble exister un risque majoré de thrombose artérielle ou veineuse au cours du post-partum des femmes porteuses d'un SAPL obstétrical pur[41] par rapport à des femmes saines.

1.4.3 Autres manifestations

De nombreuses manifestations cliniques ou biologiques sont significativement associées au SAPL mais n'appartiennent pas aux critères diagnostiques :

- **Cutanées** : Le livedo reticularis est une altération rouge ou bleuâtre de la peau avec un motif en forme de filet, comme l'illustre la Figure 1.6, attribué à une stase sanguine. Il est observé chez 25% des patients et peut être un marqueur de patient à haut risque de thrombose artérielle[42]. Lorsqu'il est associé à une thrombose cérébrale, on parle de syndrome de Sneddon qui comporte de manière variable des aPL[43]. Des cas de nécrose cutanée, de gangrène digitale, de purpura nécrotique ont également été rapportés.

Figure 1.6 Livedo reticularis chez une femme atteinte d'un syndrome des anti-phospholipides[44].

- **Hématologiques** : Une thrombopénie se produit chez 30% des sujets atteints d'un SAPL et est d'autant plus fréquente chez les sujets présentant un SAPL secondaire à un LED[45]. Dans la plupart des cas, il s'agit d'un purpura thrombopénique immunologique (PTI) lié à des auto-anticorps anti-glycoprotéines plaquettaires. Une anémie hémolytique auto-immune (AHAI) avec un test de Coombs positif peut également être retrouvée chez 10% des patients[46].
- **Endocriniennes** : On peut principalement retrouver une insuffisance surrénalienne aigue[47] résultant d'un infarctus veineux surrénal bilatéral, ou encore une insuffisance hypophysaire.
- **Hépatiques** et **digestives** secondaires aux thromboses comme le syndrome de Budd-Chiari[48] qui est lié à une thrombose des veines sus-hépatiques, l'infarctus intestinal, l'infarctus splénique.
- **Ostéo-articulaires** : Les arthralgies sont assez fréquentes dans le SAPL. On peut aussi retrouver une ostéonécrose aseptique liée à une diminution du flux sanguin vers l'os par thrombose dans la microcirculation osseuse[49].

La mortalité à 10 ans évaluée sur une cohorte de 1000 patients par Cervera *et al.*[16] s'élève à 9,3%. Les causes de décès les plus fréquentes sont les thromboses sévères (36,5%), les infections (26,9%) et les hémorragies (10,7%). Par conséquent, l'identification de marqueurs biologiques de gravité du SAPL permettrait d'identifier les patients à haut risque thrombotique et ainsi de réduire ce taux de mortalité.

1.5 ANOMALIES BIOLOGIQUES DU SAPL

1.5.1 INDICATIONS DE RECHERCHE D'ANTI-PHOSPHOLIPIDES

La recherche d'anticorps anti-phospholipides doit être effectuée en présence d'un ou de plusieurs contextes cliniques ou biologiques évocateurs d'un SAPL, notamment dès lors qu'un diagnostic de LED est posé :

- Thrombose idiopathique retrouvée chez un sujet jeune (< 50 ans)
- Thromboses récidivantes
- Thromboses veineuses de localisation inhabituelle : mésentérique, hépatique, sous-clavière, oculaire, rénale
- Associations de thromboses artérielles et veineuses
- Complication obstétricale à type de pertes fœtales répétées précoces, d'éclampsie ou de pré-éclampsie sévère, d'un RCIU inexpliqué
- Thrombopénie périphérique persistante inexpliquée
- Signes associés de MAI
- Autres : sérologie syphilitique dissociée, un livedo reticularis, une végétation valvulaire aseptique, une microangiopathie thrombotique, des manifestations neurologiques inhabituelles (chorée, démence vasculaire précoce inexpliquée), une athérosclérose précoce et diffuse.

Concernant la pertinence de la recherche d'un LA, l'ISTH a publié en 2009 des recommandations spécifiques avec 3 niveaux de probabilité d'avoir un SAPL selon les caractéristiques cliniques du patient (Tableau 1.3) :

Probabilité faible	• Thromboembolie veineuse ou artérielle chez des patients âgés
Probabilité modérée	• TCA allongé de découverte fortuite chez des patients asymptomatiques • Fausses couches spontanées précoces et récurrentes • Thromboembolie veineuse provoquée chez des patients jeunes
Probabilité élevée	• Thromboembolie veineuse non provoquée ou artérielle inexpliquée chez des sujets jeunes (< 50 ans) • Thrombose dans des sites inhabituels • Mort fœtale intra-utérine • Toute thrombose ou morbidité obstétricale chez des patients atteints de maladie auto-immunes (LED, polyarthrite auto-immune (PAR), PTI, AHAI)

Tableau 1.3 Recommandations pour la détection des anticoagulants lupiques d'après la Société Internationale de Thrombose et d'Hémostase[50].

A noter que les aPL peuvent persister en l'absence d'antécédents de thrombose, classant cette population en « porteurs asymptomatiques ». Ces porteurs asymptomatiques d'aPL soulèvent dès lors la question de l'identification de marqueurs de gravité afin de prédire leur risque de thromboses et/ou de manifestations obstétricales et donc d'anticiper leur conversion en patients symptomatiques porteurs d'un SAPL.

1.5.2 Les anticorps anti-phospholipides

1.5.2.1 Definition

Les aPL constituent un groupe très hétérogène[51] d'auto-anticorps reconnaissant les phospholipides anioniques (tels que la cardiolipine) ou neutres (tels que la phosphatidyléthanolamine) des membranes cellulaires (plaquettes, vaisseaux sanguins), surnommés les « vrais aPL », et/ou leurs protéines associées, également appelées cofacteurs, ou encore les complexes protéines-phospholipides, comme le représente la Figure 1.7. Parmi ces cofacteurs de liaison aux phospholipides, on note la β2-glycoprotéine-1 (B2GP1), la

prothrombine (facteur II de la coagulation), les protéines S et C, l'annexine V, l'annexine II, les lipoprotéines de basse densité, l'acide lysobisphosphatidique (LBPA) et les sulfatides.

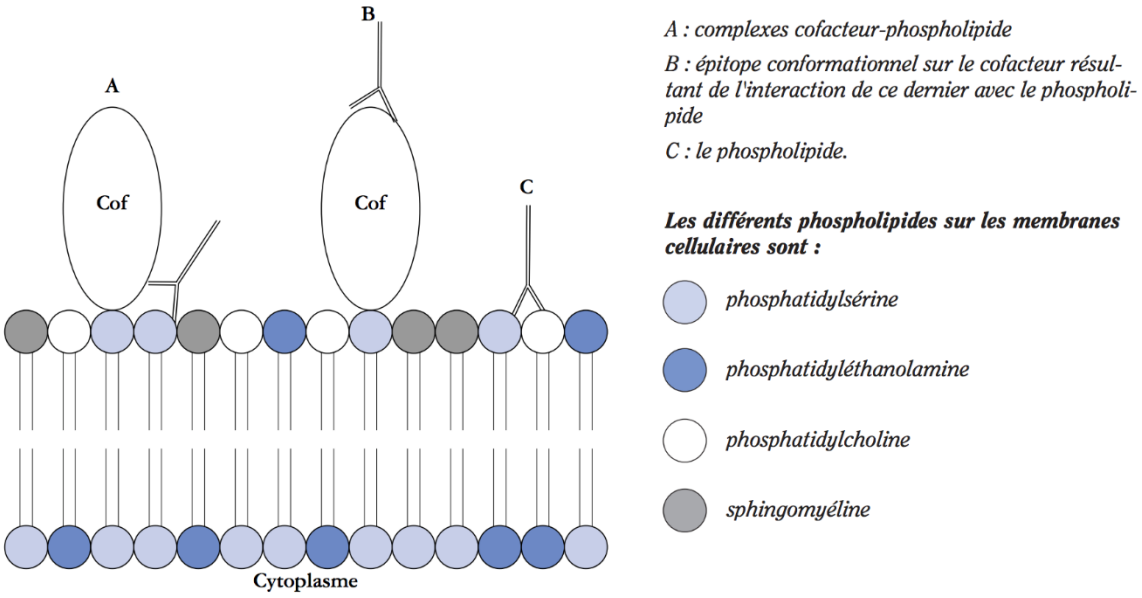


Figure 1.7 Diversité des cibles antigéniques des anti-phospholipides[52].

Ces anticorps peuvent être retrouvés de manière persistante dans la circulation sanguine, et soit isolée dans le cadre d'un SAPL primaire, ou associée à une ou plusieurs maladie(s) auto-immune(s) telles que le LED, les myasthénies, la sclérose en plaque (SEP), la polyarthrite rhumatoïde (PAR), le syndrome de Gougerot-Sjögren (SGS), la sclérodermie, les thyroïdites auto-immunes, le diabète insulino-dépendant (DID), le PTI, la maladie de Crohn, ou encore les vascularites. On parle ainsi de SAPL secondaire.

Toutefois, ces anticorps ne sont pas spécifiques du SAPL et peuvent être détectés de manière transitoire dans divers contextes[53] :

- Maladies infectieuses : syphilis, fièvre Q, Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH), hépatites virales, paludisme, infections bactériennes à *Staphylococcus aureus*, Streptocoques, endocardites infectieuses à *Escherichia Coli*
- Affections malignes : cancers solides, hémopathies malignes, syndromes lymphoprolifératifs
- Iatrogène : phénothiazines, hydantoïnes, pénicillines, quinine, β-bloquants, oestroprogestatifs, interféron-α, anti-TNFα, méthotrexate
- Idiopathique.

On différencie les aPL dits conventionnels, admis comme des critères biologiques de définition, des aPL non conventionnels selon leur cible antigénique et leur isotype. Actuellement, on compte trois types d'aPL conventionnels : les auto-anticorps anti-cardiolipine et les auto-anticorps anti-β2GP1 d'isotype IgG et/ou IgM mis en évidence par des techniques immunoenzymatiques, ainsi que le lupus anticoagulant révélé par des tests d'hémostase. Les isotypes IgA sont recherchés secondairement, il est en effet recommandé de les rechercher lorsque les aPL conventionnels sont négatifs. Il faudra ensuite contrôler tout résultat positif dans un intervalle de trois mois pour affirmer la persistance de l'aPL.

1.5.2.2 Les anti-phospholipides conventionnels

1.5.2.2.1 Les anti-cardiolipine

La cardiolipine est un phospholipide anionique (diphosphatidylglycérol) essentiellement retrouvé dans la membrane interne mitochondriale mais également complexé à des lipoprotéines circulantes[54] dans le sang.

Les aCL sont des anticorps anti-phospholipides qui ont été isolés pour la première fois à partir de cœur de bœuf[55], ce qui leur a donné leur nom. Dans les années 90, plusieurs équipes[56,57] observent une hétérogénéité clinique chez les patients présentant des aCL. En effet, les aCL étaient retrouvés chez certains patients lupiques alors que dans d'autres cas les aCL étaient détectés en dehors de toute manifestation thrombotique. Cette observation a permis de décrire plusieurs types d'aCL. Les aCL « vrais » se fixent directement à la cardiolipine seule, comme le représente la Figure 1.8. Ils sont associés à certaines infections telles que la syphilis, les hépatites virales et leur présence est transitoire. Ces anticorps dit B2GP1 indépendants seraient peu thrombogènes car la cardiolipine n'intervient pas dans la coagulation *in vivo*. Les aCL « B2GP1 dépendants » reconnaissent le complexe cardiolipine couplée à un cofacteur protéique libre dans le plasma. Le principal cofacteur des aCL est la β2-glycoprotéine-1[58], initialement retrouvée dans les sérums de veaux ou de bœufs et utilisée comme tampon de saturation des tests ELISA. Leur présence est durable et ce sont eux qui sont impliqués dans la survenue du SAPL. C'est pourquoi, il est recommandé d'utiliser des réactifs détectant des aCL B2GP1 dépendants. La Figure 1.8 montre que les aCL « B2GP1 dépendants » peuvent être spécifiques du domaine 1 de la B2GP1, ce sont les aCL les plus pathogènes, ou bien d'autres domaines de la B2GP1 dont la signification pathologique n'est pas élucidée.

Les aCL sont les aPL les plus fréquemment retrouvés (80% des patients porteurs d'un SAPL), d'où leur forte sensibilité[59]. En revanche, ils sont peu spécifiques. Par ailleurs, les taux d'aCL sont généralement plus élevés chez des patients ayant un SAPL, ce qui suggère qu'une augmentation du seuil de positivité peut augmenter la spécificité du test. La soustraction du « blanc sérum », correspondant à la fixation non spécifique des aCL, peut également augmenter la spécificité de ce test (comme réalisée dans le laboratoire d'Immunologie du Biogénopôle – Hôpital de la Timone, Marseille).

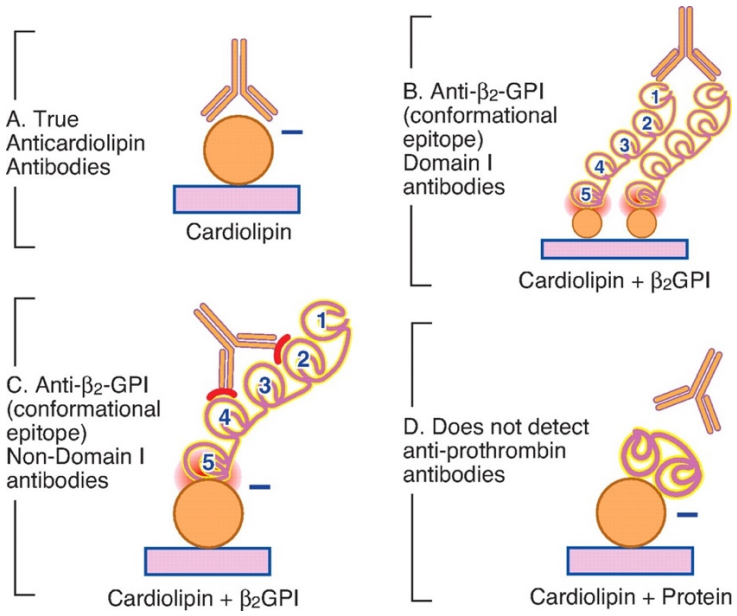


Figure 1.8 Représentation schématique de l'ELISA qui détecte les deux types d'aCL[60].

Les aCL sont dosés par un test ELISA indirect qui s'effectue en quatre étapes illustrées dans la Figure 1.9 :

1) Premièrement, la cardiolipine d'origine bovine est adsorbée sur un support solide constitué de micropuits (« coating »). La B2GP1, d'origine humaine et purifiée préférentiellement, est apportée par le tampon de saturation et de dilution des échantillons afin de détecter les aCL dépendants de la B2GP1.
2) Ensuite, les calibrateurs, contrôles et sérums préalablement dilués sont ajoutés dans les puits et incubent pendant 30 minutes afin que la liaison antigène-anticorps ait lieu en présence d'un aCL. Une première série de lavages permet d'éliminer les anticorps non fixés et non spécifiques.
3) La troisième étape consiste à ajouter un anticorps polyclonal anti-IgG ou anti-IgM humain conjugué à une enzyme, la peroxydase de Raifort, qui se fixe au complexe

antigène-anticorps précédemment formé. Après incubation, d'autres lavages sont réalisés afin d'éliminer l'excès d'antisérum non lié.

4) Pour finir, le substrat chromogène spécifique à l'enzyme est ajouté, déclenchant une réaction colorée mesurable par spectrophotométrie et stoppée par l'ajout d'acide sulfurique : l'intensité de coloration est alors proportionnelle à la quantité d'antisérum lié, elle-même proportionnelle à la quantité d'aCL du patient. Les aCL doivent être exprimés en unités GPL pour les IgG et MPL pour les IgM, déterminés à partir de courbes de calibration utilisant les standards de Harris[61] afin d'améliorer la comparabilité interlaboratoire. Une unité GPL ou MPL correspond à une concentration d'aCL de 1 µg/ml. Ainsi, des gammes d'étalonnage représentant la densité optique (DO) en fonction du titre en unités GPL/ml ou MPL/ml permettent, par interpolation, de déterminer le titre du sérum de l'échantillon.

Au laboratoire d'Immunologie du CHU de Marseille, tous les résultats positifs en dépistage sont contrôlés en double sur des puits coatés et des puits non coatés en antigène, afin de soustraire le « blanc sérum » qui correspond à la différence entre la DO du puit non coaté et la DO du puit coaté. Ceci permet de s'affranchir des accrochages non spécifiques liés au patient dans le but de réduire les faux-positifs. D'après les critères de Sydney, un résultat positif correspond à une valeur supérieure au 99ème percentile.

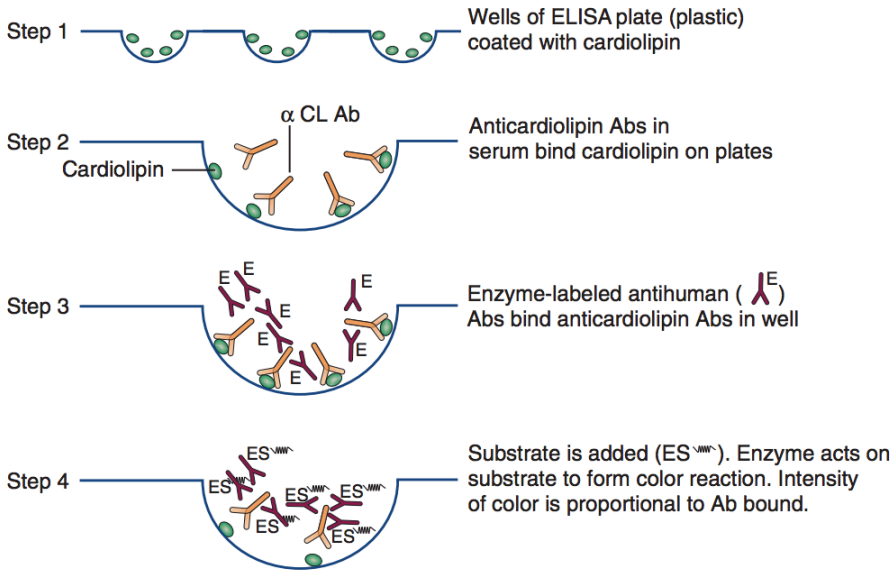


Figure 1.9 Représentation schématique des étapes du dosage d'anticorps anti-cardiolipine[62].

Plusieurs travaux ont montré que l'isotype IgG des aCL était plus fortement associé au SAPL, les IgM étant principalement secondaires à des infections et transitoires[63]. D'autres

études ont montré que l'aCL et/ou l'aB2GP1 IgM isolément positif était associé à des complications obstétricales dans le SAPL[64]. Les IgA sont plus rares et n'ont pas été significativement associées à la survenue de thromboses. Par ailleurs, il existe une corrélation entre un titre élevé d'aCL et le risque thrombo-embolique[65].

1.5.2.2.2 Les anti-β2 glycoproteine-1

La β2-glycoprotéine-1, aussi appelée apolipoprotéine H, est une protéine plasmatique synthétisée principalement par le foie. C'est un cofacteur qui se lie aux phospholipides anioniques, tels que la phosphatidylsérine ou la cardiolipine, par son cinquième domaine et aux aB2GP1 par son premier domaine[66], comme le montre la Figure 1.10.

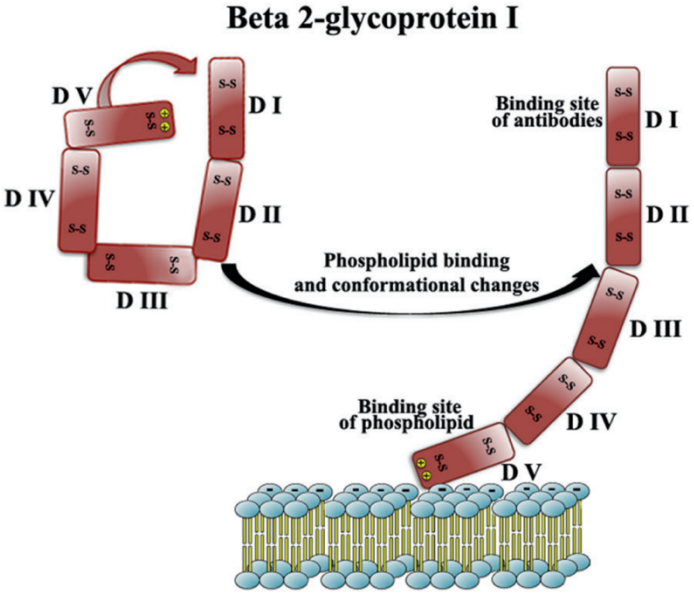


Figure 1.10 Représentation des cinq domaines de la β2-glycoprotéine-1[67].

Les anticorps anti-β2-glycoprotéine-1 sont dirigés contre cette protéine et non contre les phospholipides eux-mêmes. Ces anticorps se distinguent par leur grande hétérogénéité concernant leur cible antigénique. En effet, ils reconnaissent des épitopes présents sur la molécule native circulaire mais aussi des épitopes cryptiques, notamment situés dans le domaine I, qui apparaissent après modification conformationnelle de la B2GP1 induite par sa fixation aux phospholipides[68]. Les aB2GP1 pathogènes provoquent une dimérisation de la B2GP1, comme l'illustre la Figure 1.11, à l'origine d'une plus forte affinité de ce complexe antigène-anticorps pour les surfaces anioniques[69] et d'un allongement du temps de coagulation *in vitro*. Ainsi, des tests détectant uniquement les aB2GP1 dirigés contre le domaine 1 seraient

plus spécifiques et sont actuellement en cours d'étude[70,71]. *In vivo*, c'est cette dimérisation de la B2GP1 induite par les aPL qui serait responsable des complications thrombotiques du SAPL en perturbant l'activité des inhibiteurs physiologiques de la coagulation, en inhibant le système fibrinolytique et en activant des cibles cellulaires telles que les plaquettes, les cellules endothéliales et les monocytes.

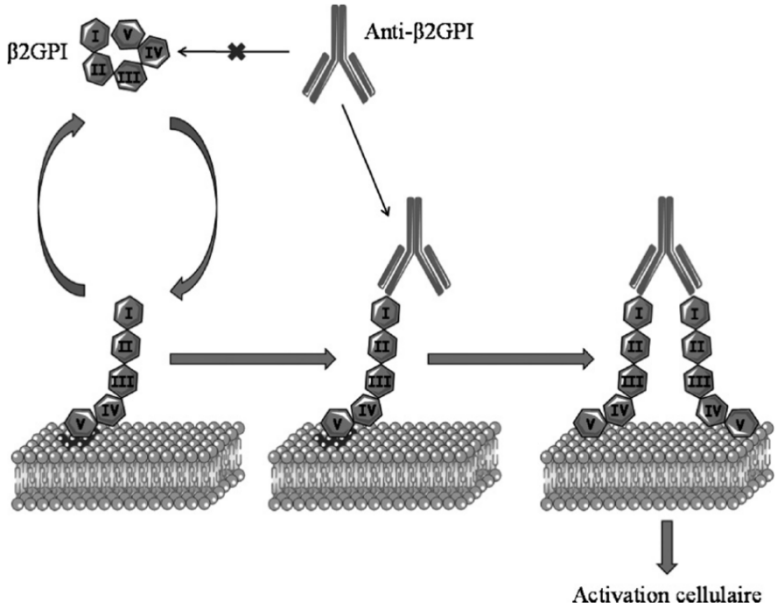


Figure 1.11 Mécanisme d'activation cellulaire par les anti-β2GP1[69].

Les aB2GP1 sont détectés par une technique ELISA, similaire aux aCL, grâce à des micropuits revêtus de B2GP1 humaine hautement purifiée. Cependant, contrairement aux tests ELISA de mesure des aCL, la recherche d'aB2GP1 ne fait pas intervenir de phospholipide. Un résultat est dit positif lorsque son titre est supérieur au 99ème percentile soit > 8 U/ml. Au laboratoire d'Immunologie du CHU de Marseille, tout résultat positif est systématiquement contrôlé en double avec soustraction du « blanc sérum ».

Ces aB2GP1 ont une très forte valeur prédictive pour le SAPL avec une meilleure spécificité que les aCL car les tests de dosage d'aB2GP1 ne détectent pas les aCL fréquemment retrouvés dans les infections, dits aCL « vrais ». En revanche, leur sensibilité est plus faible. De Groot *et al.* ont montré que les aB2GP1 sont associés à un risque accru d'un premier épisode de thrombose veineuse[72]. De plus, la plupart des études montrent une corrélation plus significative avec les complications thrombotiques pour l'isotype IgG que pour l'isotype IgM[73].

Afin de standardiser la recherche des aPL en général qui peut varier au niveau inter et intra-laboratoire selon les protocoles techniques, l'établissement des seuils de positivité ou encore selon les calibrateurs, l'ISTH a émis des recommandations pour une détection optimale en laboratoire des aPL par des tests en phase solide[74] :

- Sélectionner les patients pour éviter les découvertes fortuites
- Prélèvement sanguin : les dosages sont réalisés sur sérum (tube sec) ou plasma citraté pauvre en plaquettes. Les échantillons sont stockés à 2-8°C et testés dans les 2-3 jours ou à -20°C pour un stockage plus long
- Utiliser un test aCL dépendant du B2GP1 d'origine humaine purifié
- Imprécision entre les séries doit être < 20% (ELISA) et < 10% pour les systèmes automatisés
- Interférences possibles par le facteur rhumatoïde avec des IgM aCL et/ou aB2GP1 faussement positives. Il est également préférable d'éviter les prélèvements ictériques, hémolytiques et lipémiques
- Tests réalisés en double pour les techniques ELISA manuelles
- Une courbe d'étalonnage multipoints doit être réalisée pour chaque analyse ELISA
- Résultats exprimés selon la courbe de calibration du dosage
- Valeurs seuils établies par le calcul du 99ème percentile sur au moins 120 plasmas ou sérums de patients sains
- Interprétation des résultats : en fonction du contexte clinique, des résultats des trois aPL conventionnels et à confirmer après 12 semaines.

Afin d'améliorer la comparabilité interlaboratoires, l'European Forum on Antiphospholipid Antibodies a d'ailleurs proposé d'utiliser des anticorps monoclonaux humanisés anti-β2-glycoprotéine-1 et anti-cardiolipine comme calibrateurs : HCAL pour les IgG et EY2C9 pour les IgM[75].

1.5.2.2.3 Le lupus anticoagulant

Les anticoagulants circulants (ACC) de type lupique ou lupus anticoagulant se définissent *in vitro* par leur capacité à allonger les temps de coagulation dépendants des phospholipides. En effet, ces anticorps entrent en compétition avec les facteurs vitamine K dépendants au niveau de leurs sites de liaison aux phospholipides anioniques. Ils ne reconnaissent pas directement les phospholipides mais sont dirigés contre des cofacteurs

protéiques associés aux phospholipides : principalement la B2GP1[76] et la prothrombine[12]. Ce sont des inhibiteurs acquis de la coagulation qui, paradoxalement, sont pro-coagulants *in vivo*.

Les ACC sont dépistés en respectant les recommandations internationales de l'ISTH de 2009[50], selon quatre temps :

1) **<u>Dépistage du LA en présence d'une faible concentration en phospholipides :</u>**

Ce dépistage consiste à mettre en évidence un allongement des tests de coagulation faisant intervenir des phospholipides. Du fait de l'hétérogénéité des LA, aucun test disponible pour le LA n'est sensible à 100%. Par conséquent, il est recommandé d'utiliser au moins deux tests de dépistage reposant sur des principes différents. Ces deux tests peuvent être positifs de manière dissociée et la présence d'un LA est confirmée si l'un des deux tests donne un résultat positif.

Le TCA (Temps de Céphaline avec Activateur) est le test de coagulation utilisé en première intention car il permet de dépister 50 à 70% des LA[77]. Au laboratoire, une variante du TCA standard nommée le PTT-LA (Activated Partial Thromboplastin Time), commercialisée par STAGO, utilise un réactif sensibilisé à faible concentration de phospholipides dans le but d'accentuer l'allongement dû aux anticorps anti-phospholipides. Il s'agit d'un test chronométrique qui mesure, en présence de céphaline diluée, de phospholipides plaquettaires, de calcium et d'activateur du système contact, le temps de coagulation du plasma d'un patient par rapport à un temps témoin (déterminé sur n=30, à chaque changement de lot) servant de référence. Le dépistage est dit positif si la différence entre le temps patient et le temps témoin est supérieur à 8 secondes. En revanche, le PTT-LA détecte également des anticoagulants circulants anti-facteurs de la voie endogène (VIII, IX, XI, XII, Prékallicréine (PK), Kininogène de Haut Poids Moléculaire (KHPM)) et peut également être faussement positif en lien avec un déficit en facteurs.

En parallèle, un deuxième test connu pour détecter le LA est le temps de venin de vipère Russell dilué (dRVVT), fourni par STAGO. Dans ce cas, le venin de vipère Russel déclenche la coagulation par activation directe du facteur X en Xa en présence de phospholipides et de calcium, ce qui permet de court-circuiter la voie endogène. L'avantage est que cette activation est insensible aux déficits en facteurs VII, VIII, IX, XII, PK et KHPM et à leurs inhibiteurs. Le test est par contre sensible aux déficits en facteur X, V et II et à leurs inhibiteurs. Le principe

repose sur la recherche d'un allongement du temps de coagulation en présence d'un LA avec un réactif à faible concentration en phospholipides. Le résultat est rendu sous la forme d'un ratio « screen » (RS) du temps de coagulation du patient par rapport au témoin.

2) Mise en évidence d'une activité inhibitrice par un test de mélange :

Un test de confirmation par mélange à volume égal avec un plasma témoin permet de s'affranchir d'un déficit en facteur lorsque celui-ci se normalise. En effet, après mélange du plasma à tester avec un pool de plasma normal, l'absence de correction de l'allongement initial met en évidence la présence d'un inhibiteur, également appelé anticoagulant circulant, qui peut être un aPL ou un inhibiteur dirigé contre un facteur de la coagulation. L'interprétation du résultat du PTT-LA de mélange se base sur le calcul de l'indice de Rosner (IR) qui permet de standardiser les résultats. Lorsque l'IR est supérieur à 15, le temps du mélange reste allongé, ce qui fait suspecter la présence soit d'un anticorps anti-facteur soit d'un anticoagulant lupique.

$$Indice\ de\ Rosner = \frac{PTTLA_{mélange} - PTTLA_{témoin}}{PTTLA_{patient}} \times 100$$

3) Confirmation de la dépendance en phospholipides de l'inhibiteur :

L'anticoagulant circulant mis en évidence à l'étape précédente reste à caractériser. Pour cela, il faut prouver sa dépendance en phospholipides afin de distinguer un LA d'un anti-facteur de la coagulation. Ainsi, une correction au moins partielle de l'allongement du temps de coagulation en présence d'une grande quantité de phospholipides dans les réactifs du test prouve la neutralisation de l'activité du LA. Cette étape n'est réalisée que si le dRVVT dépistage ou mélange a un ratio positif, soit supérieur ou égal à 1,20. Le résultat est rendu sous la forme d'un ratio « confirm » (RC) du temps de coagulation du patient par rapport au témoin. Ainsi, le résultat final est exprimé en ratio normalisé (RN) qui est calculé de la manière suivante :

$$Ratio\ normalisé = \frac{RS_{patient\ ou\ mélange}}{RC_{patient\ ou\ mélange}} \times 100$$

Si le RN est strictement supérieur à 1,20, l'étape de confirmation a normalisé le test en présence d'une grande quantité de phospholipides, ce qui confirme la phospholipido-dépendance et donc la présence d'un LA. Le dRVVT est le test qui a la plus haute spécificité

pour la détection des LA et la meilleure valeur prédictive du risque thrombotique lié au LA[78]. Le résultat rendu est uniquement qualitatif, mentionnant la présence ou l'absence d'ACC, car aucun standard biologique existe, ce qui empêche d'étudier une éventuelle corrélation entre le titre du LA et les manifestations thrombotiques qui en découlent.

4) Exclusion d'une autre anomalie de la coagulation :

Il est nécessaire d'éliminer un déficit et/ou un anti-facteur spécifique masqués par la présence du LA et qui peuvent s'y associer. Pour cela, il est utile de réaliser des dosages des facteurs de la coagulation explorés par le TCA sur des dilutions croissantes de plasma du patient en appliquant au résultat le facteur de correction lié à la dilution. La présence d'une correction du temps de coagulation au fur et à mesure des dilutions signe l'absence de coagulopathie associée et est en faveur d'un LA.

Plusieurs règles pré-analytiques sont déterminantes pour l'interprétation des résultats. En effet, il est important de réaliser une double centrifugation afin de s'assurer que l'échantillon est pauvre en plaquettes car elles pourraient apporter des phospholipides et engendrer des faux négatifs par neutralisation de l'ACC. D'autre part, certains traitements anticoagulants comme les anti-vitamines K (AVK), les héparines et les AOD (Anticoagulants Oraux Directs) peuvent interférer avec les tests. Concernant la prise d'AVK, le dRVVT doit être conclu sur un mélange à parties égales du plasma témoin et du patient si l'INR (International Normalized Ratio) est compris entre 2 et 3 et que le taux de prothrombine (TP) est strictement inférieur à 50%. Un INR supérieur à 3 rend impossible la détermination précise de la présence d'un LA par PTT-LA ni dRVVT. Dans le cas des héparines, lorsque l'anti-Xa dans le plasma du patient est comprise entre 0,15 UI/ml et 0,8 UI/ml, le PTT-LA n'est pas interprétable et le diagnostic repose alors sur le dRVVT puisqu'il contient un inhibiteur d'héparine appelé le polybrène. Ceci permet de rechercher un LA même au début de l'instauration d'une héparinothérapie lors du diagnostic d'une thrombose aigüe. Toutefois, à partir d'une anti-Xa supérieure à 0,8 UI/ml, les deux tests PTT-LA et dRVVT sont ininterprétables. Les tests ne sont pas non plus réalisables en présence d'AOD, dans le risque de rendre des résultats faussement positifs.

De Laat *et al.*[79] ont démontré que le LA β2GP1-dépendant présentait une meilleure corrélation avec les antécédents d'évènements thrombo-emboliques que les LA indépendants de la β2GP1, ce qui appuie l'hypothèse selon laquelle la β2GP1 est l'antigène le plus pertinent dans le SAPL. De nombreuses études s'accordent quant au fait que les LA soient l'aPL le plus

thrombogène, que ce soit des thromboses veineuses (OR 6,55 ; IC 95% 2,36-18,17)[80,81] ou artérielle[82]. La recherche d'ACC est le test le plus spécifique parmi les critères biologiques du SAPL, cependant sa sensibilité est minime. C'est pourquoi, la recherche combinée des trois marqueurs conventionnels du SAPL est utile à la confirmation du diagnostic.

1.5.2.3 Les anti-phospholipides non conventionnels

D'autres aPL ont été décrits et des études récentes ont montré leur association significative avec une symptomatologie évocatrice d'un SAPL. Ces aPL dits « non conventionnels » ne font pas partie des critères diagnostiques de 2006. Ils peuvent être retrouvés isolément positifs, à l'origine d'un SAPL « séronégatif » c'est-à-dire en l'absence de marqueurs biologiques conventionnels, ou associés à d'autres aPL conventionnels. Il s'agit des isotypes IgA des aCL et des aB2GP1 ainsi que d'autres aPL dirigés contre des protéines de la coagulation d'isotype IgM et/ou IgG : les anticorps anti-phosphatidyléthanolamine (aPE), les anticorps anti-prothrombine (aPT) et les anticorps anti-annexine V (aANV).

La phosphatidyléthanolamine (PE) est un phosphoglycéride neutre constitutif des membranes biologiques, et principalement situé dans le feuillet interne, qui peut se retrouver dans une conformation hexagonale ou lamellaire en bicouches. Dans sa forme hexagonale, la PE est spécifiquement reconnue par les LA, ce qui inhibe leur activité anticoagulante[83]. La PE joue également un rôle important dans l'inhibition de l'activité anticoagulante de la protéine C activée[84], expliquant la survenue de thrombose. Les IgM aPE semblent être un facteur de risque de fausses couches précoces (OR = 6, IC 95% = 2,3-15,7)[85]. Quant aux IgG aPE, elles sont significativement associées à la thrombose veineuse (OR = 6, p = 0,005) d'après une étude cas-témoin[86]. A noter que dans cette même étude, 63% des sujets aPE positifs étaient négatifs pour les critères biologiques du SAPL. C'est pourquoi, la valeur d'un aPE chez les patients présentant un SAPL séronégatif est un sujet d'actualité. On peut dès lors imaginer que des patients présentant uniquement des aPE associés à une thrombose soient traités à long terme comme ayant un « vrai » SAPL. De plus, une étude récente[87] a montré pour la première fois une association entre la positivité des aPE et la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), suggérant un nouveau mécanisme d'action des aPE dans le processus thrombotique via une signalisation liée au stress oxydatif. A noter l'importance de l'utilisation de kits ELISA très spécifiques pour la détection des aPE, utilisant la PE comme seul antigène de revêtement,

puisqu'un grand nombre de patients positifs pour les aPE peut être attribué à la présence d'anticorps confondants dirigés contre la B2GP1.

La prothrombine correspond au facteur II de la coagulation. C'est un des cofacteurs du LA, ce qui explique son association fréquente avec la présence d'un LA. Il a été démontré que la liaison de la PT à la phosphatidylsérine (PS) améliore la sensibilité du dosage des aPT en phase solide. Les anticorps anti-PS/PT ont été retrouvés chez 74% des patients porteurs d'un SAPL, d'après une étude menée sur une cohorte italienne[88], et semblent représenter un facteur de risque plus important de thrombose (OR = 2,3, IC 95% = 1,72-3,5)[89]. Bertin *et al.*[90] ont montré que les aPT sont associées à la thrombose (p=0,035) et a démontré l'intérêt d'évaluer à la fois les aPT d'isotype IgG et IgM dans la thrombose, en particulier dans les thromboses veineuses (p=0,004), lorsque les marqueurs conventionnels du SAPL sont négatifs.

Les annexines font partie du groupe des protéines dépendantes du calcium qui lient les phospholipides anioniques, tel un « bouclier », afin d'éviter leur complexation avec les protéines de la coagulation, ce qui explique leur activité anti-coagulante. Par conséquent, la présence d'anticorps anti-annexine bloque son action, provoquant des thromboses et surtout des complications obstétricales[91]. En effet, l'annexine V est présente dans les syncytiotrophoblastes tapissant les villosités placentaires où elle joue un rôle dans le maintien de la fluidité sanguine intervilleuse. Cependant, la prévalence des aANV dans le SAPL est faible.

Du fait de leur absence de standardisation et d'un manque de certitudes quant à leur pathogénicité et leur intérêt diagnostique, les aPL non conventionnels ne sont pas encore recherchés en routine dans les laboratoires classiques. Au laboratoire d'immunologie de l'Hôpital de la Conception de Marseille, ces aPL non conventionnels sont recherchés et leur technique de détection repose sur un test ELISA « maison » indirect.

Plus récemment, une nouvelle cible antigénique des aPL a été découverte : l'acide lysobisphosphatidique (LBPA)[92]. Ce phospholipide, apparenté à la cardiolipine, est localisé dans la membrane interne des endosomes tardifs. Ces endosomes tardifs jouent un rôle important dans le tri et le trafic approprié du récepteur multifonctionnel IGF2/MPR pour les ligands portant du mannose-6-phosphate (MPR) et le facteur de croissance analogue à l'insuline 2 (IGF2). Kobayashi *et al.* ont montré en 1998 que le LBPA est un antigène reconnu par les sérums de patients atteints du syndrome des anti-phospholipides et que ces auto-anticorps jouent un rôle dans la pathogénèse du SAPL. Les auto-anticorps dirigés contre le LBPA

(aLBPA) affichent une spécificité plus élevée mais une sensibilité plus faible pour le SAPL que les aCL. De plus, l'aLBPA est étroitement corrélé à l'aCL et à l'aB2GP1 chez des patients atteints de SAPL et est strictement associé à la positivité du LA[93].

1.6 PATHOGENICITE DES ANTICORPS ANTI-PHOSPHOLIPIDES DANS LE SAPL

1.6.1 ÉVENEMENTS THROMBOTIQUES

La physiopathologie du SAPL n'est pas encore complètement élucidée. Le rôle de la B2GP1 semble prépondérant. En effet, cette protéine plasmatique a la capacité de se lier aux phospholipides membranaires des cellules endothéliales, des plaquettes et des monocytes, via son domaine V, déclenchant une modification conformationnelle de la B2GP1 qui expose ainsi un épitope cryptique comprenant l'arginine 39-arginine 43 présent sur son domaine I. Cet épitope lui permet alors de se lier aux anticorps aB2GP1 de haute affinité, entrainant la dimérisation de la B2GP1, qui serait responsable du pouvoir thrombogène de ces aPL.

La liaison des aPL perturbe l'activité des inhibiteurs physiologiques de la coagulation dont l'activité est liée aux phospholipides membranaires. Parmi eux, la protéine C activée a pour rôle de protéolyser les facteurs Va et VIIIa de la coagulation afin de réguler la génération de thrombine. Ainsi, les aPL entrent en compétition avec les PL utilisés par la protéine C activée, à l'origine d'une résistance acquise à la protéine C activée.

Par ailleurs, les aPL en présence de B2GP1 peuvent activer des cellules cibles impliquées dans la coagulation, telles que les cellules endothéliales (CE), les plaquettes et les monocytes, à l'origine d'un état pro-inflammatoire et procoagulant responsable de l'expression clinique. Comme l'illustre la Figure 1.12, l'activation des différents types cellulaires est médiée par l'interaction des aPL avec des récepteurs différents selon la cible cellulaire, tels que l'annexine A2 ou les Toll Like Receptor (TLR-4) présents sur l'endothélium et les monocytes ou bien les récepteurs au LDL (Low Density Lipoprotein Receptor Related Protein 8, Apolipoprotein E Receptor 2 plaquettaire) présents sur les plaquettes. Il s'en suit une transduction intracellulaire du signal médiée par des facteurs transcriptionnels NF-kB et la voie des MAP kinase 38. Au niveau des cellules endothéliales, les aPL induisent de ce fait l'expression du facteur tissulaire (FT), des molécules d'adhésion leucocytaire (E-sélectine, Vascular Celle Adhesion Molecule 1 (VCAM-1), Intercellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-

1) ainsi que la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (IL1, IL6, IL8), ce qui favoriserait le risque thrombotique. Concernant les monocytes, les aPL sont responsables d'une augmentation de l'expression du FT. Quant à la fixation des aPL sur les plaquettes, ils induisent la sécrétion de thromboxane A2, déclenchant l'adhésion et l'agrégation plaquettaire.

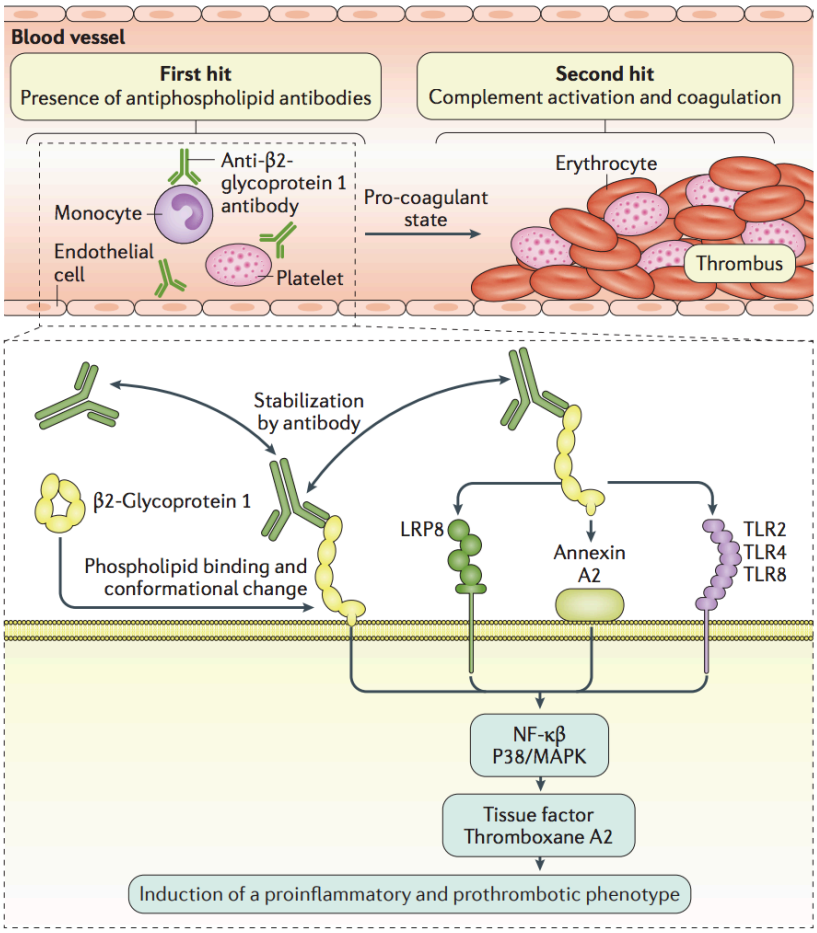


Figure 1.12 Physiopathologie du syndrome des anti-phospholipides associée à la thrombose vasculaire[94].

De plus, il a été démontré que les polynucléaires neutrophiles (PNN) jouent un rôle dans l'induction de la thrombose dans le SAPL. Les PNN sont des cellules de l'immunité innée qui ont un rôle essentiel dans la défense antimicrobienne par différents mécanismes tels que la phagocytose, l'exocytose des granulations bactéricides et plus récemment, la NETose, qui est un mécanisme de mort cellulaire différent de la nécrose et de l'apoptose, conduisant à la libération de pièges extracellulaires des neutrophiles (NETs)[95]. Décrits pour la première fois par Brinkmann *et al.*[96] en 2004, les NETs correspondent à des structures en filets de chromatine décondensée recouverte de protéines antimicrobiennes issues de leur granules qui aboutissent à l'élimination des pathogènes par des mécanismes oxydatifs et non oxydatifs. Comme l'illustre la Figure 1.13, après stimulation des récepteurs (A), les neutrophiles adhèrent au substrat (B) et

mobilisent les composants des granules, représentés par des cercles rouges, à savoir l'élastase (NE) et la myéloperoxydase (MPO) (C). Les histones du noyau sont citrullinées par activation de la peptidyl arginine déiminase 4 (PAD4) via les espèces réactives de l'oxygène (ROS) produites par la NADPH oxydase, à l'origine d'une décondensation de la chromatine, et les membranes intracellulaires se désintègrent. Enfin, la membrane cellulaire se rompt, et le mélange de cytoplasme et de nucléoplasme est expulsé pour former des NETs (D).

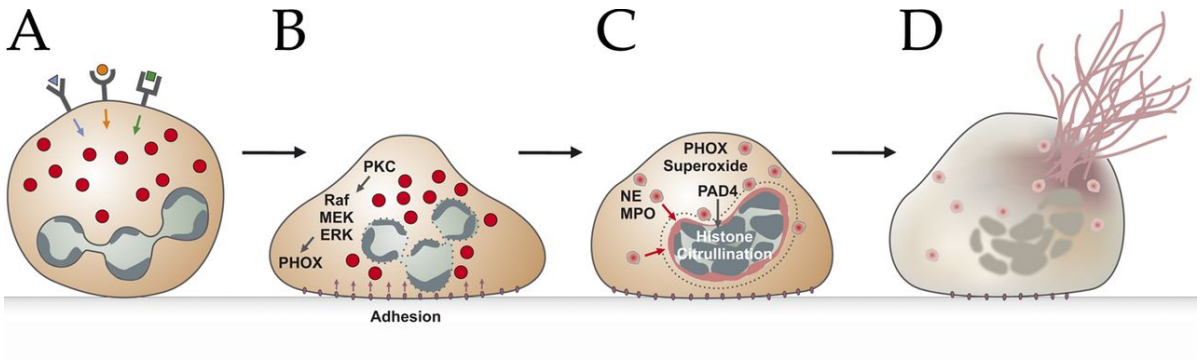


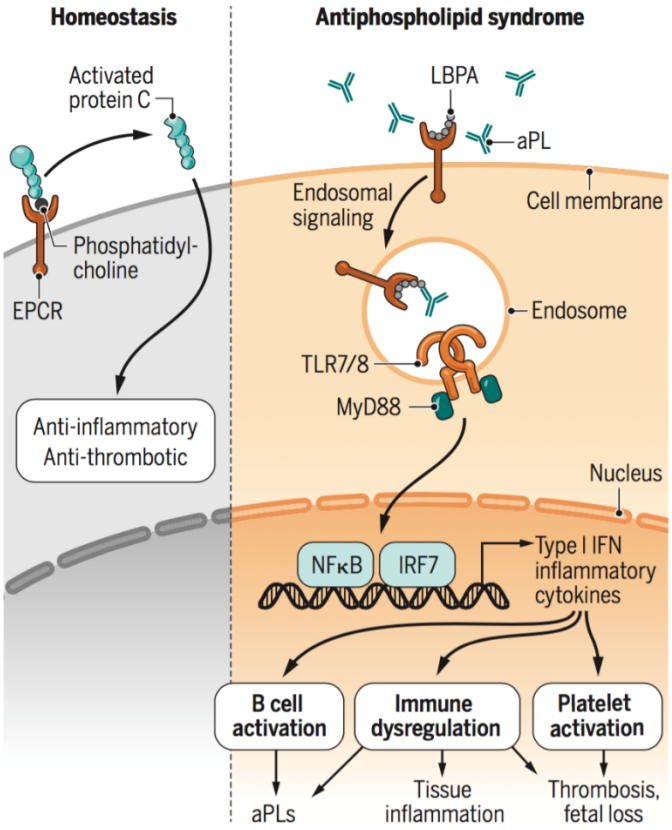
Figure 1.13 Représentation schématique de la voie de la NETose[97].

Outre les pathogènes, d'autres stimuli comme les aPL, déclenchent la NETose. Dans le SAPL, les PNN présentent un phénotype activé par rapport aux neutrophiles de témoins sains, aboutissant à une NETose accrue et à une altération de la clairance des NETs, impliquées dans la physiopathologie de la thrombose. De plus, les NETs constituent une source d'autoantigènes, qui peuvent être la cible d'auto-anticorps dirigés contre les NETs, notamment retrouvés dans le SAPL.

Les aPL interfèrent aussi avec l'activation du complément. En effet, Pierangeli *et al*. ont montré une réponse thrombotique réduite chez des souris déficientes en fractions du complément C3, C5 et C6 après l'administration d'aPL par rapport aux souris témoins[98].

Bien que les aPL soient présents de manière persistante, les évènements thrombotiques ne se produisent qu'occasionnellement, ce qui suggère que le développement d'aPL est une étape nécessaire mais insuffisante dans le développement du SAPL. C'est pourquoi une théorie du « double hit »[99], illustrée dans la figure Figure 1.12, est avancée dans la physiopathologie du SAPL. En effet, les aPL constituent le « first hit » qui prédispose à un environnement pro-coagulant mais ce n'est qu'à la suite d'un « second hit » que les aPL déclenchent la formation d'un thrombus. Cet évènement déclencheur correspond à l'exposition prolongée des PL membranaires à la fixation de la B2GP1 circulant librement dans le plasma, ce qui entraine

l'activation du complément puis la thrombose. Parmi ces évènements déclencheurs, on retrouve les infections, les néoplasies, les réactions inflammatoires, la consommation d'agents prothrombotiques (tabac ou médicaments comme les oestro-progestatifs), la génétique (thrombophilie), la chirurgie ou l'immobilité.



aPL, phospholipid antibody; EPCR, endothelial protein C receptor; IFN, interferon; IRF7, interferon regulatory factor 7; LBPA, lysobiphosphatidic acid; MyD88, myeloid differentiation primary response protein 88; NFκB, nuclear factor κB; TLR 7/8, Toll-like receptor 7 and 8.

Figure 1.14 Rôle des anti-LBPA dans la physiopathologie du SAPL[102].

Très récemment, une autre cible antigénique des aPL, composée de l'acide lysobiphosphatidique présenté par le récepteur endothélial de la Protéine C (EPCR), a fait sa place dans la pathogénèse du SAPL puisqu'elle relie la coagulation à l'auto-immunité. Comme l'illustre la Figure 1.14, l'EPCR est physiologiquement lié à un phospholipide comme la phosphatidylcholine, ce qui favorise l'activité anticoagulante et anti-inflammatoire de la protéine C. Cependant, l'EPCR peut se lier à d'autres ligands tels que le LBPA, un PL principalement exprimé dans les endosomes tardifs, favorisant ainsi l'activation des cellules trophoblastiques embryonnaires, des monocytes et des cellules dendritiques. Müller-Calleja *et al.*[100] ont rapporté que l'EPCR présent à la surface des monocytes sert de récepteur pour le trafic endosomal des aPL lorsqu'il est complexé au LBPA. Il s'en suit une endocytose du complexe

EPCR-LBPA avec l'aPL qui active les TLR7, dont le rôle dans la différenciation des cellules B productrices d'auto-anticorps a bien été défini dans la pathogénèse du LED[101], et les TLR8, ce qui déclenche la cascade de coagulation médiée par l'activation du FT et une signalisation IFN de type 1. La production d'IFNα par les cellules dendritiques provoque alors l'expansion des cellules B1a productrices d'aPL, favorisant ainsi l'auto-immunité. L'étude de la présence d'aPL dirigés contre ce complexe EPCR-LBPA dans de grandes cohortes cliniques permettra d'évaluer si la spécificité des auto-anticorps EPCR-LBPA peut améliorer le diagnostic du SAPL ainsi que ses complications.

1.6.2 Complications obstetricales

La pathogénicité du SAPL obstétrical repose sur plusieurs mécanismes encore mal connus. D'après la théorie du double hit, la grossesse constituerait une situation à risque thrombotique en tant que « second hit », ce qui explique pourquoi la présence d'aPL seuls suffit à engendrer des complications obstétricales.

Parmi eux, des mécanismes similaires à ceux décrits dans la survenue d'une thrombose vasculaire avec l'implication des CE, des monocytes, des plaquettes et des composants de la cascade de coagulation pourraient expliquer que les aPL induisent une thrombose placentaire (Figure 1.15). Cette thrombose est principalement liée à une perturbation du bouclier anticoagulant de l'annexine A5[103] qui protège les PL présents à la surface des trophoblastes et des cellules endothéliales des facteurs de la coagulation.

Par ailleurs, d'autres études[104,105] ont montré que des mécanismes non thrombotiques joueraient un rôle important dans l'induction d'une placentation défectueuse, qui est considérée comme l'une des principales causes de complications obstétricales. En effet, les aPL peuvent se lier à la B2GP1 exprimée par les trophoblastes et l'endothélium, ce qui réduit leur prolifération et leur migration via le LRP8, déclenche la sécrétion de cytokines inflammatoires (IL-8, IL-1β) via le TLR-4 et active le complément à la surface de la cellule. L'ensemble de ces mécanismes aboutit à l'activation des neutrophiles et monocytes avec libération d'espèces réactives de l'oxygène, de TNF (Tumeur Necrosis Factor), de facteurs anti-angiogéniques (soluble Vascular Growth Factor Receptor) et de facteur tissulaire, aboutissant finalement à une insuffisance placentaire[94].

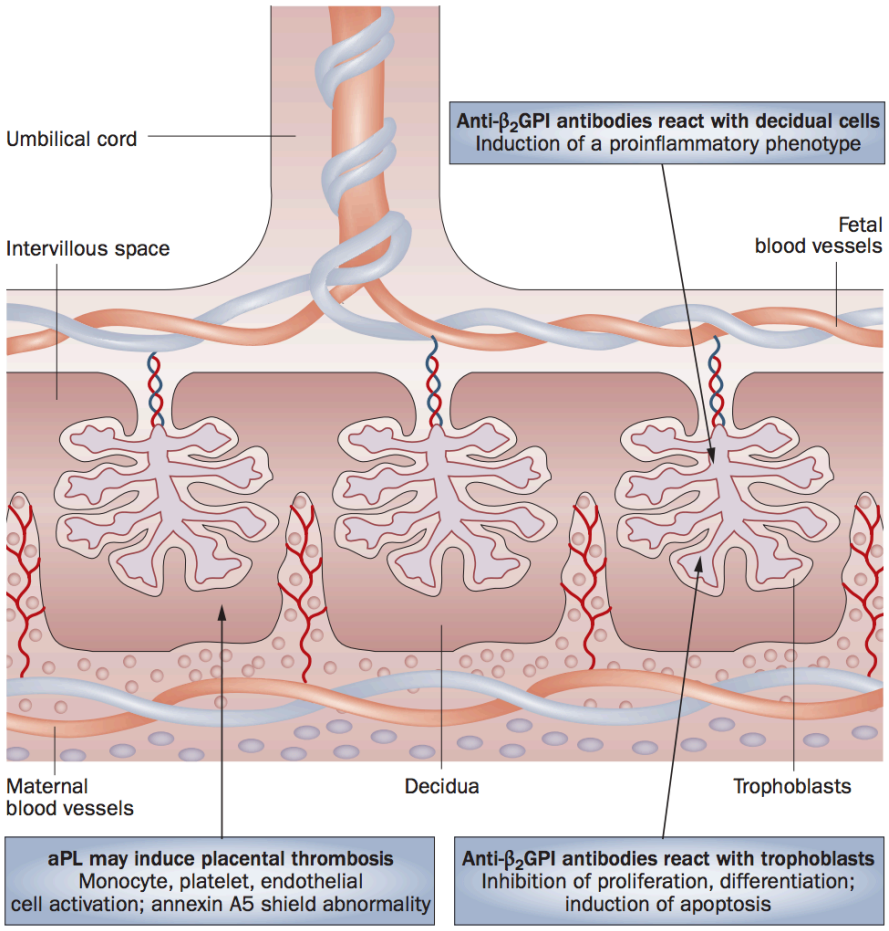


Figure 1.15 Physiopathologie des complications obstétricales dans le SAPL[106].

1.7 CRITERES ASSOCIES AU RISQUE THROMBOTIQUE

1.7.1 FACTEURS DE RISQUE SURAJOUTES DE THROMBOSE

D'après la littérature[107], les sujets porteurs d'aPL ont un risque élevé de développer une thrombose. Un deuxième évènement déclencheur peut être nécessaire pour qu'un patient présentant des aPL développe pour la première fois un évènement thrombotique, on parle alors de facteur de risque thrombotique additif dont les principaux sont représentés dans la Figure 1.16. En effet, l'hypertension artérielle, l'hyperlipidémie et l'hyperhomocystéinémie augmentent le risque de thrombose chez les patients porteurs d'aPL[108]. Ces facteurs de risque diffèrent pour la thrombose veineuse et artérielle dans le SAPL. Hansen *et al*. ont montré que l'hypertension, le tabagisme, l'hyperlipidémie et le diabète sucré sont les facteurs prédictifs les plus importants de thrombose artérielle[109]. A l'inverse, l'hypertriglycéridémie est associée à une augmentation de 6,4 fois et la thrombophilie héréditaire à une augmentation de 7,3 fois le risque de thrombose veineuse[110]. Une autre étude a montré qu'une chirurgie antérieure et une

immobilisation prolongée étaient significativement associées à la survenue d'une thrombose veineuse chez des sujets auparavant asymptomatiques[111]. Par ailleurs, une étude a démontré que plus un individu est jeune, plus il faut de facteurs de risque pour déclencher une thrombose, par conséquent le vieillissement lui-même semble être un facteur de risque important de thrombose[112].

Abnormality	Affected Vascular Beds		
	Venous	Venous and Arterial	Arterial
Defects in coagulation factors	Resistance to activated protein C (factor V Leiden) Deficiency of protein C Deficiency of protein S Deficiency of antithrombin III Mutation of prothrombin		
Defects in clot lysis	Deficiency of plasminogen Deficiency of tissue plasminogen activator	Dysfibrinogenemia* Deficiency of plasminogen-activator inhibitor type 1*	
Metabolic defects		Homocysteinemia	
Platelet defects		Heparin-induced thrombocytopenia and thrombosis Myeloproliferative disorders Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria* Polycythemia vera (with thrombocytosis)	
Stasis	Immobilization Surgery Congestive heart failure		
Hyperviscosity		Polycythemia vera Waldenström's macroglobulinemia Sickle cell anemia Acute leukemia	
Defects in vessel walls		Trauma Vasculitis	Atherosclerosis Turbulence
Other	Cancer (Trousseau's syndrome) Use of oral contraceptives Estrogen therapy Pregnancy or puerperium Nephrotic syndrome	Antiphospholipid syndrome Foreign bodies Cyclooxygenase-2 inhibitors†	Hypertension Diabetes Smoking Atrial fibrillation Hyperlipidemia Chronic inflammation Systemic lupus erythematosus‡

Figure 1.16 Facteurs de risque prédisposant les patients à la thrombose[113].

De la même manière, lors de la survenue de pertes fœtales récurrentes, il est important de rechercher des anomalies génétiques, des malformations utérines ou des défauts de la phase lutéale. Danowski *et al*. ont démontré que les fausses couches sont plus fréquentes chez les patientes atteintes de SAPL secondaire à un LED que chez les femmes atteintes de SAPL primaire[110].

Depuis 2006, les critères de Sydney permettent de classer les patients porteurs d'un SAPL en deux groupes selon la présence (type a) ou non (type b) de facteurs de risque surajoutés de thrombose tels que : l'âge (> 55 ans chez l'homme et > 65 ans chez la femme), les facteurs de risque cardio-vasculaire (hypertension artérielle, diabète sucré, taux élevé de LDL-cholestérol ou faible taux de HDL-cholestérol, tabagisme, antécédents familiaux de maladie cardiovasculaire prématurée, obésité (indice de masse corporelle ≥ 30 kg/m^2), microalbuminurie, débit de filtration glomérulaire < 60 ml/min), thrombophilies héréditaires,

prise d'oestroprogestatifs, syndrome néphrotique, cancer, immobilisation et chirurgie. A noter que la présence de facteurs thrombophiliques héréditaires ou acquis n'élimine pas le diagnostic de SAPL.

Ainsi, il est important d'étayer l'anamnèse lors de la survenue de thromboses multiples afin de prendre en compte tous les facteurs de risques associés à la présence d'aPL. Ces facteurs de risque supplémentaires peuvent être considérés comme un marqueur dans l'évaluation des risques et peut aider les cliniciens à décider de l'instauration d'un traitement prophylactique, en particulier chez des patients asymptomatiques porteurs d'aPL.

1.7.2 Facteurs de risque de thrombose lies au SAPL

1.7.2.1 D'apres le score anti-phospholipides (aPL-S)

Bien que la présence d'aPL soit significativement associée à un sur-risque de thrombose et de complications obstétricales, la stratification de ce risque n'est pas encore entièrement maîtrisée. C'est pourquoi, Otomo *et al.* proposent en 2012 le premier score biologique pronostique de thrombose basé sur le profil des aPL[114], nommé le « score anti-phospholipides » (aPL-S). Ces profils d'aPL ont été déterminés de manière rétrospective sur une cohorte japonaise atteinte de MAI systémique par cinq tests de coagulation pour tester le LA et 6 tests immunoenzymatiques pour détecter les aCL, les aB2GP1 et les aPS/PT d'isotype IgG et IgM. Les scores d'aPL ont été calculés pour chaque test de détection d'aPL et pondérés par les odds ratios calculés selon la présence ou non de manifestations cliniques du SAPL. Le score aPL-S de chaque patient est calculé par la somme des points attribués à chaque test positif. En analyse multivariée, un aPL-S supérieur à 30 semble constituer un facteur de risque indépendant de thrombose (hazard ratio = 3,144, IC 95% 1,383-7,150). L'aPL-S pourrait ainsi représenter un indice quantitatif utile dans la prédiction du risque thrombotique dans le SAPL. En revanche, l'aPL-S ne tient pas compte des facteurs de risque surajoutés de thrombose précédemment décrits.

1.7.2.2 D'apres le score global du syndrome des anti-phospholipides (GAPSS)

En 2013, Sciascia *et al.* ont proposé un nouveau score pronostique de risque, le GAPSS[115] (Global Antiphospholipid Syndrome Score) qui est un score global clinico-biologique prenant en compte le profil d'aPL, les facteurs de risque cardiovasculaires

conventionnels et le profil d'anticorps auto-immuns. L'intérêt de cet outil est de prédire le risque de survenue d'un premier évènement clinique ou d'une récurrence thrombotique et ainsi de guider les décisions thérapeutiques en pratique clinique. Initialement, ce score a été élaboré sur une cohorte anglaise de 106 patients atteints de LED puis il a été validé sur d'autres cohortes, en particulier des patients porteurs de SAPL primaire[116]. Le GAPSS a été réalisé en attribuant aux facteurs de risques identifiés par l'analyse multivariée des points pondérés proportionnels aux valeurs du coefficient de régression β, allant de 1 à 5 comme représenté dans la Figure 1.17. Un score peut alors être calculé pour chaque patient en additionnant les points correspondants aux six facteurs de risque indépendants de thromboses et/ou de pertes fœtales comprenant : l'hypertension artérielle, l'hyperlipidémie, l'aCL, le LA, l'aB2GP1 et l' aPS/PT. Le score varie de 0 à 20 points et d'après l'étude de la courbe ROC (Receiver Operating Characteristic), une valeur seuil du score de 10 a la meilleure précision diagnostique. Zuily *et al*. ont montré au cours d'une étude prospective multicentrique[117] qu'un score supérieur à 16 est un marqueur prédictif significatif de la survenue d'évènements thrombotiques (hazard ratio = 6,17, IC 95% 1,70-22,40). L'inconvénient majeur de ce score est qu'il impose la recherche d'aPS/PT qui ne sont pas des aPL dépistés en routine, c'est pourquoi une version complémentaire nommée le GAPSS ajusté (aGAPSS) qui exclut l'aPS-PT a également été conçue. Par ailleurs, le GAPSS a également fait ses preuves pour évaluer la récurrence des évènements cliniques liés au SAPL car les patients avec une récidive thrombotique ont montré des valeurs GAPSS plus élevées que ceux sans récidive et les valeurs GAPSS ≥ 11 étaient fortement associées à un risque plus élevé de récidive (OR = 18,27 ; IC 95% 3,74-114,5)[116].

	β-coefficient	GAPSS[a]
Hyperlipidaemia	1.73	3
Arterial hypertension	0.54	1
aCL IgG/IgM	2.63	5
Anti-β2GPI IgG/IgM	2.02	4
aPS/PT IgG/IgM	1.78	3
LA	2.35	4

Figure 1.17 Le score global du syndrome des anti-phospholipides[115].

1.8 TRAITEMENT

L'élimination des aPL pathogènes est possible par diverses thérapeutiques (fortes doses de glucocorticoïdes, traitements immunosuppresseurs, échanges plasmatiques). En revanche, cette disparition n'est que transitoire et les anticorps réapparaissent dans les trois semaines post-traitement. C'est pourquoi, l'enjeu du traitement du SAPL repose sur la prévention des effets thrombotiques délétères induits par les aPL et de leur récidive grâce à des traitements anticoagulants au long cours qui peuvent s'associer à un antiagrégant plaquettaire tel que l'aspirine (acide acétylsalicylique), en fonction du contexte clinique. Parmi les traitements anticoagulants, on distingue les héparines administrées par voie injectable et qui sont utilisées en phase aiguë de la thrombose, les AVK qui prennent le relais des héparinothérapies par voie orale et les AOD tels que le Rivaroxaban. De nouvelles molécules ont fait leurs preuves dans le traitement du SAPL : l'hydroxychloroquine (Plaquenil®) et le Rituximab (MabThera®), un anticorps monoclonal anti-CD20 qui réduit le titre des aPL. Le traitement du SAPL doit s'associer à une prévention et un traitement des facteurs de risques de thrombose coexistants dont les facteurs de risques cardiovasculaires, notamment par l'arrêt du tabagisme et de la contraception oestro-progestative, la prise en charge de l'hypertension artérielle, de l'obésité, du diabète et de la dyslipidémie, ainsi que l'éviction des médicaments inducteurs d'aPL précédemment décrits.

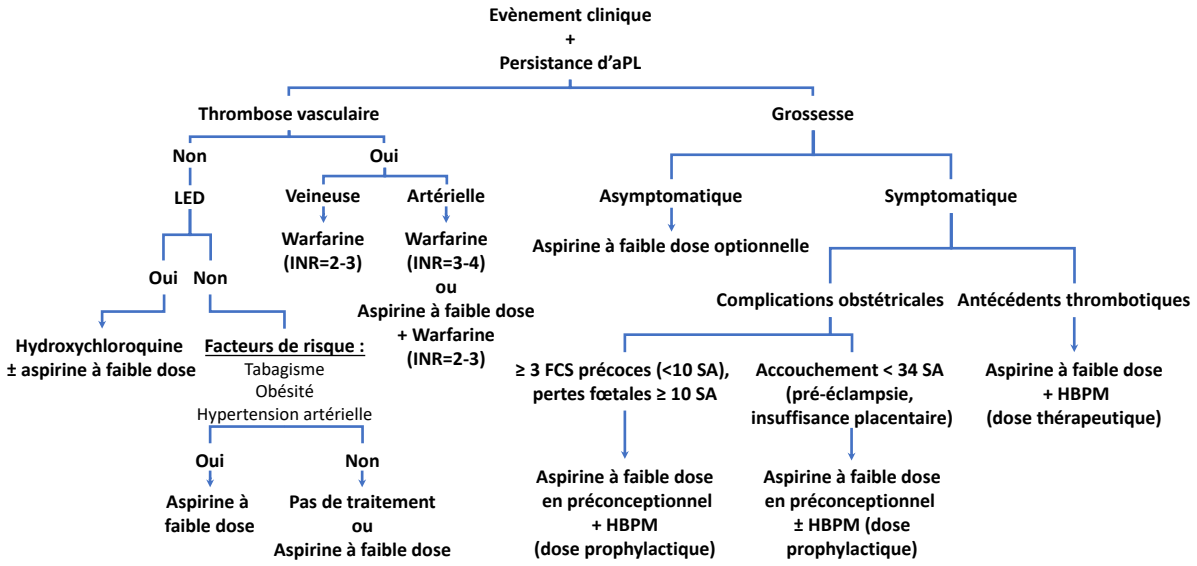


Figure 1.18 Traitement du SAPL selon la présentation clinique[120].

Des recommandations concernant la prise en charge du SAPL ont été émises lors du 13ème congrès international des aPL en 2011[118] puis ont été réactualisées par l'EULAR en 2019[119], comme représentées dans la Figure 1.18.**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**

1.8.1 PRISE EN CHARGE DES THROMBOSES

1.8.1.1 PREVENTION PRIMAIRE

La thromboprophylaxie primaire n'est pas indiquée chez tous les porteurs d'aPL asymptomatiques. La meilleure stratégie dans le traitement des porteurs d'aPL commence par l'évaluation du profil de risque individuel, en tenant compte de la présence d'autres facteurs de risques cardiovasculaires. En effet, l'étude multicentrique APLASA[121] (Antiphospholipid Antibody Acetylsalicylic Acid) a montré que les taux d'incidence de thrombose étaient de 2,75 pour 100 personnes-années pour les sujets traités par l'aspirine en prévention primaire et de 0 pour 100 personnes-années pour les sujets traités par placebo. De même, tous les patients atteints de thrombose présentaient des facteurs de risque concomitants de thrombose et/ou une MAI systémique associée. Ces résultats suggèrent l'absence de bénéfice de l'aspirine en prophylaxie primaire et l'importance d'une prévention des facteurs de risque de thrombose supplémentaires présents. La prescription systématique d'héparine de bas poids moléculaire (HBPM) à dose prophylactique est de ce fait recommandée chez les porteurs d'aPL dans les situations à haut risque thrombotique comme l'alitement, l'immobilisation prolongée ou le post-partum[118].

En revanche, les sujets porteurs d'aPL sont dits à haut risque de thrombose s'ils présentent un LA, des titres élevés d'aPL, une double ou triple positivité, c'est-à-dire à la fois un aCL, un aB2GP1 et un LA, ou un LED associé. Dans ce cas, un traitement prophylactique par de l'aspirine à faible dose (75-100 mg/jour) est recommandé. L'utilisation de cette prophylaxie primaire est soutenue par les résultats d'une méta-analyse de sept études observationnelles portant sur 460 porteurs asymptomatiques d'aPL qui a montré que le risque de premier évènement thrombotique était réduit de moitié chez les porteurs d'aPL ayant reçu de l'aspirine à faible dose par rapport à ceux qui ne l'ont pas reçue[122]. Cependant, la prise d'aspirine augmente le risque annuel de développer une hémorragie majeure[123]. L'hydroxychloroquine a été suggérée comme une alternative à l'aspirine[114] dans le cadre de la prévention primaire mais aucun essai randomisé contrôlé n'a été réalisé correctement.

1.8.1.2 PREVENTION SECONDAIRE DE LA RECIDIVE THROMBOTIQUE

En prophylaxie secondaire, le traitement du SAPL repose sur une anticoagulation au long cours par AVK, en particulier ceux à demi-vie longue comme la warfarine (Coumadine®) qui est recommandée en première intention. L'utilisation d'AOD en médecine vasculaire a suscité beaucoup d'espoir pour la prévention des évènements thrombotiques dans le SAPL. Toutefois, d'après les recommandations européennes 2019 de l'EULAR, les AOD n'ont pas encore leur place dans la prise en charge du SAPL en raison d'un bénéfice inférieur aux AVK, notamment chez les patients porteurs d'un profil dit « triple positif ».

Dans le cas d'un antécédent de thrombose veineuse, un traitement par AVK avec un INR cible de 2 à 3 est recommandé après une initiation par de l'héparine non fractionnée (HNF) ou de bas poids moléculaire avec une période de chevauchement de 4 à 5 jours afin d'atteindre l'INR cible mesuré sur deux jours consécutifs. Les HBPM sont généralement préférées aux HNF de par leur risque de saignement plus faible mais leur utilisation est contre-indiquée chez les insuffisants rénaux et il n'existe pas d'antidote efficace en cas de surdosage. Les AOD peuvent être envisagés chez les patients ayant des difficultés à atteindre l'INR cible malgré une bonne observance ou ceux qui présentent des contre-indications aux AVK (allergie ou intolérance) mais ne doivent pas être utilisés chez les patients présentant une triple positivité d'aPL, en raison du risque plus élevé d'évènements récurrents. En effet, un essai randomisé contrôlé récent sur le Rivaroxaban versus la Warfarine chez des patients triples positifs a été prématurément stoppé en raison d'un excès de survenue d'évènements thromboemboliques dans le groupe traité par Rivaroxaban[125]. L'efficacité de l'hydroxychloroquine à réduire le risque thrombotique a été rapportée pour la première fois chez des patients atteints de LED[126]. En effet, cette molécule a des propriétés immunomodulatrices et pourrait également modifier l'expression du facteur tissulaire.

Chez les patients présentant un SAPL artériel, le traitement par AVK est recommandé par rapport au traitement par aspirine à faible dose. La cible de l'INR est de 2 à 3 ou 3 à 4 selon le risque individuel hémorragique et le risque de récurrence thrombotique. En effet, les patients avec une thrombose artérielle ont un risque plus élevé de récidive que ceux avec une thrombose veineuse et ont une tendance à la récidive dans le même lit vasculaire[127]. Pour les mêmes raisons que dans le cas de thrombose veineuse, le Rivaroxaban ne doit pas être utilisé chez les patients triple positifs ayant présenté une thrombose artérielle. De plus, un essai en cours sur l'Apixaban

dans la prévention secondaire du SAPL a été récemment modifié afin d'exclure les patients présentant une thrombose artérielle car les données ont rapporté des récidives de thrombose artérielle chez des patients traités par AOD[128].

En cas de récurrence des évènements thrombotiques veineux ou artériels chez un patient traité par AVK, une enquête et une éducation thérapeutique du traitement par AVK avec des mesures fréquentes d'INR doivent être envisagées. Si l'INR cible à 2-3 est atteint, l'EULAR recommande d'augmenter l'INR cible à 3-4 ou d'ajouter de l'aspirine à faible dose ou bien de passer à une HBPM. Un traitement d'appoint par des antipaludéens tels que l'hydroxychloroquine ou des statines[129] est également recommandé. En effet, Meroni *et al*. ont montré que l'activation endothéliale médiée par les aB2GP1 peut être inhibée par les statines en altérant la liaison de NF-kB à l'ADN et donc l'expression des molécules d'adhérence à la surface de l'endothélium[130], prédisposant à un risque thrombotique.

Par ailleurs, les femmes ayant déjà eu des complications obstétricales associées aux aPL ont un risque plus élevé de thrombose future. Aucune recommandation de traitement spécifique pour la prévention de thrombose existe. Cependant, une cohorte rétrospective a montré que l'incidence d'un évènement thrombotique chez des patientes avec un SAPL obstétrical est de 7,4 cas pour 100 personnes-années dans le groupe non traité et dans 1,3 pour 100 personnes-années dans le groupe ayant reçu de l'aspirine à faible dose[131].

Il n'existe pas de consensus concernant la durée de traitement. Néanmoins, l'utilisation de l'anticoagulation à long terme chez les patients porteurs de SAPL est soutenue par deux études qui ont montré un risque plus faible de thrombose veineuse récidivante chez les patients atteints de SAPL sous anticoagulation orale à long terme par rapport à un traitement sur une durée de 3 à 6 mois[132133].

1.8.2 Prise en charge des manifestations obstetricales

1.8.2.1 Prevention primaire

Chez les femmes enceintes présentant un profil d'aPL à haut risque mais sans antécédents de thrombose ou de complications obstétricales, un traitement par aspirine à faible dose pendant la grossesse doit être envisagé.

1.8.2.2 PREVENTION SECONDAIRE

Les AVK ne pouvant être prescrits au cours de la grossesse du fait de leur tératogénicité, il convient d'effectuer avant la sixième semaine de grossesse[134] un relais par de l'héparine à dose prophylactique (une HBPM de préférence pour des raisons pratiques), associée à l'aspirine à faible dose pour prévenir les complications gravidiques. L'aspirine sera interrompue au plus tard à la 35 ou 36ème SA, les HBPM étant poursuivies et une fenêtre la plus courte possible d'anticoagulation sera réalisée lors de l'accouchement. La poursuite de l'aspirine et de l'HBPM à dose prophylactique pendant 6 semaines après l'accouchement permet de réduire le risque de thrombose maternelle. Par la suite, un traitement par aspirine à faible dose au long cours après une évaluation adéquate des risques/ bénéfices est habituellement recommandé en prévention du risque thrombotique.

Chez les femmes ayant un SAPL uniquement obstétrical en lien avec des antécédents de FCS avant la 10ème SA et/ou de perte fœtales après la 10ème SA, un traitement combiné par de l'aspirine à faible dose et de l'HBPM à dose prophylactique pendant la grossesse a été associé à une probabilité plus élevée de naissance vivante que par aspirine seule[135]. L'aspirine doit être commencée de préférence avant la conception et l'héparine doit être ajoutée dès que la grossesse est confirmée. Chez les femmes ayant des antécédents d'accouchement avant la 34ème SA en raison d'une pré-éclampsie ou d'une insuffisance placentaire, des études rétrospectives ont montré que la probabilité de naissance vivante ne différait pas entre les femmes traitées par aspirine et HBPM prophylactique et celles traitées par aspirine seule[136137]. Les cliniciens doivent adapter leur thérapeutique en fonction de l'évaluation du risque individuel prenant en compte le profil d'aPL et les autres facteurs de risque surajoutés de thrombose.

Chez les femmes enceintes ayant des antécédents de SAPL thrombotique, un traitement combiné d'aspirine et d'HBPM à dose thérapeutique pendant la grossesse est recommandé. Une étude observationnelle a montré que cette bithérapie était associée à des naissances vivantes dans 79% des grossesses[138].

En cas de complications obstétricales récurrentes malgré un traitement combiné par aspirine et héparine à dose prophylactique, l'augmentation de la dose d'héparine jusqu'à la dose thérapeutique ou l'ajout d'hydroxychloroquine[139] ou d'une faible dose de prednisolone[140] au

premier trimestre peuvent être envisagés. Des immunoglobulines intraveineuses (IgIV)[141] peuvent également être utilisées dans des cas particuliers.

1.8.3 Prise en charge du syndrome catastrophique des anti-phospholipides

La prise en charge du CAPS est spécifique et urgente. Le traitement repose sur une combinaison de trois thérapeutiques permettant d'éliminer les aPL pathogènes : les corticostéroïdes, une héparine à dose curative et des échanges plasmatiques ou des Ig IV[35]. Pour les CAPS réfractaires, la déplétion des lymphocytes B par anticorps monoclonaux anti-CD20 de type Rituximab ou l'inhibition du complément par anticorps monoclonal humanisé recombinant qui se lie à la fraction C5 du complément tel que l'Eculizumab, peuvent être envisagés. En parallèle, la prévention des facteurs déclenchants (infection, chirurgie, arrêt du traitement anticoagulant) est primordiale, ce qui souligne l'importance de l'éducation thérapeutique afin d'éviter toute récidive.

Pour conclure, le SAPL est un syndrome hétérogène de par la diversité de ses auto-anticorps et des cibles antigéniques impliquées et donc des mécanismes physiopathologiques qui peuvent être mis en jeu. Il s'agit d'une thrombophilie acquise responsable de tout type de thromboses. Le diagnostic repose sur la survenue d'un évènement clinique qualifiant associée à la persistance, à au moins 12 semaines d'intervalles, d'un ou de plusieurs anti-phospholipides conventionnels parmi le LA, les aB2GP1 et les aCL. Le traitement de référence repose sur l'anticoagulation curative, le plus souvent par Warfarine. La prise en charge des facteurs de risque cardiovasculaire est impérative. En revanche, les récidives sont fréquentes et constituent la principale cause de décès du SAPL. C'est pourquoi, les perspectives reposent sur une meilleure définition du profil d'aPL à haut risque et le développement de nouveaux marqueurs biologiques afin d'identifier les patients les plus à risque de récidive thrombotique. L'enjeu de ces nouveaux marqueurs est de guider les cliniciens dans le choix d'une thérapeutique et d'une durée de traitement adaptées au risque individuel de thrombose. Cette perspective sera abordée dans une deuxième partie.

2 ÉVALUATION DE FACTEURS BIOLOGIQUES DE HAUT RISQUE DE RECIDIVE THROMBOTIQUE CHEZ DES PATIENTS PORTEURS D'UN SAPL

Le taux de récidive de thrombose chez les patients porteurs d'un SAPL non traité est élevé, soit 19 à 29% par an[142]. De plus, une étude observationnelle et multicentrique portant sur 177 patients présentant un SAPL thrombotique avec un suivi médian de 5 ans a montré que le taux de récidive thrombotique du SAPL était de 7,5% par an dans les 5 premières années après le premier événement, et ce, malgré un traitement anticoagulant approprié en cours[143]. Dans le cadre du SAPL, la récidive se traduit par la réapparition d'un évènement clinique, chez des patients ayant déjà présenté un évènement thrombotique ou obstétrical. Elle peut être liée à un déséquilibre du traitement anticoagulant (arrêt du traitement, sous dosage de l'anticoagulant, interactions médicamenteuses) mais également à la présence de facteurs de gravité dont certains ont été élucidés. Ces facteurs de gravité pourraient permettre d'établir une sous-classification du SAPL et une meilleure caractérisation du risque de récidive thrombotique afin de contrôler et de prédire ces récidives par l'adaptation du traitement anticoagulant instauré par les cliniciens. Par conséquent, l'identification des patients porteurs d'un SAPL à haut risque de récidive thrombotique reste un enjeu majeur dans la prise en charge de cette pathologie.

2.1 PROFIL IMMUNOLOGIQUE : TYPE, TITRE ET NOMBRE D'ANTI-PHOSPHOLIPIDES

Le concept des profils d'aPL a été introduit il y a plus de 20 ans où plusieurs études ont montré que les tests d'aPL à but diagnostique pouvaient également être utilisés pour établir un pronostic du risque clinique chez les patients porteurs d'un SAPL. En 2005, Pengo *et al.*[144] ont proposé une classification du risque thrombotique qui prend en compte le type et le nombre de tests positifs pour les aPL : triple positivité, double positivité de l'aCL et de l'aB2GP1 en l'absence de LA, simple positivité de l'aPL. En 2006, les critères de Sydney catégorisent les patients en fonction de leur positivité pour les aPL, multiple ou unique, suggérant que la multiple positivité des aPL est associée à un risque thrombotique plus élevé. De plus, de nombreuses études épidémiologiques ont démontré que le type, le nombre d'aPL positifs et le titre de ces auto-anticorps sont déterminants dans la stratification du risque. C'est pourquoi, l'EULAR a publié en 2019 une stratification du risque thrombotique chez les patients porteurs

d'aPL selon deux niveaux représentés dans le Tableau 2.1. La positivité pour le LA, la triple positivité isolée, la positivité persistante d'aCL à taux moyen à élevé sont associés à une augmentation du risque thrombotique[145].

Titres d'aPL moyens à élevés	• Anticorps anticardiolipine (aCL) d'isotype IgG et/ou IgM dans le sérum ou le plasma présents à des titres > 40 GPL ou MPL ou > 99e percentile mesurés par un test ELISA standardisé • Anticorps anti-β2-glycoprotéine-I (aβ2GP1) d'isotype IgG et/ou IgM dans le sérum ou le plasma à un titre > 99e percentile mesurés par un test ELISA normalisé
Profil aPL à faible risque	aCL ou aβ2GP1 isolés à des titres faibles ou moyens, en particulier s'ils sont positifs de façon transitoire
Profil aPL à haut risque	Présence (en 2 occasions ou plus, à au moins 12 semaines d'intervalle) d'un LA mesuré conformément aux directives de l'ISTH, ou d'une double positivité d'aPL (toute combinaison de LA, d'aCL ou d'aβ2GP1) ou d'une triple positivité d'aPL (les trois sous-types), ou la présence de titres d'aPL élevés et persistants.

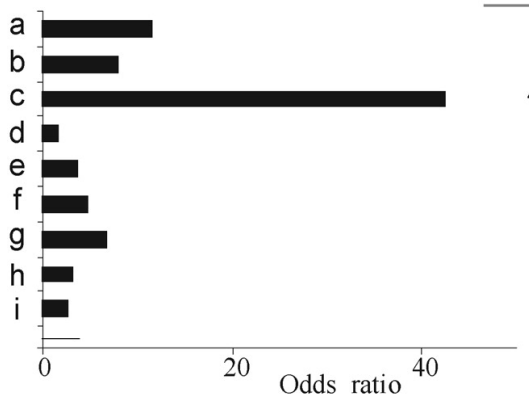
Tableau 2.1 Stratification du risque thrombotique selon le profil d'aPL d'après l'EULAR, 2019[146].

2.1.1.1 Type d'anti-phospholipides

L'interprétation du profil d'aPL dépend de la cible antigénique des aPL, voire même d'un épitope en particulier, et de l'isotype de l'anticorps.

Parmi les tests diagnostiques du SAPL, le LA est un prédicteur de risque plus fort[147] que les aCL et les aB2GP1 pour la thrombose artérielle et veineuse ainsi que pour les complications obstétricales[148]. Ce LA peut être médié par des aB2GP1 et des aPT. Une méta-analyse portant sur 1650 patients a montré que le risque de thrombose veineuse profonde (TVP) est multiplié par 6,14 (IC 95% 2,74-13,8) chez les patients porteurs d'un LA par rapport aux patients LA négatif[149]. En revanche, la signification clinique de la positivité isolée du LA est débattue. Plusieurs études ont révélé que le LA isolément positif n'était significativement pas associé à la survenue de manifestations cliniques du SAPL (OR = 1,3 ; IC 95% 0,30-6,0) par rapport à

un LA associé à un aPT ou un aB2GP1 (OR = 10,1 ; IC 95% 1,3-79,8)[72]. La Figure 2.1 montre que la présence d'un LA B2GP1-dépendant est très fortement associée à des antécédents de complications thromboemboliques (OR = 42) par rapport à la présence d'un LA B2GP1 indépendant (OR = 1,6). De plus, des études ont montré que le LA dépendant du domaine I de la B2GP1 s'est avéré être un facteur de risque plus important de thrombose veineuse ou artérielle et de fausse couche que le LA dépendant de la PT[150,151]. Ces résultats suggèrent que les LA aB2GP1 dépendants sont des facteurs de risque importants de thromboses dans le SAPL.



	Odds ratio	95% confidence interval (upper limit – lower limit)
a	11.4	23.1 – 5.6
b	7.9	15.6 – 4.0
c	42.3	194.3 – 9.9
d	1.6	3.9 – 0.8
e	3.6	7.9 – 1.9
f	4.6	10.5 – 2.0
g	6.7	13.5 – 3.4
h	3.1	6.2 – 1.5
i	2.5	4.7 – 1.4

a: Classic LAC (PTT-LA and/or dRVVT)
b: Original PTT-LA
c: β_2GPI dependent LAC
d: β_2GPI independent LAC
e: aCL
f: Anti-β_2GPI IgM antibodies
g: Anti-β_2GPI IgG antibodies
h: Anti-prothrombin IgM antibodies
i: Anti-prothrombin IgG antibodies

Figure 2.1 Risque de thrombose veineuse ou artérielle selon le type d'aPL[79].

En ce qui concerne la positivité isolée de l'aCL, les données de la littérature sont controversées. Les aCL ne sont pas des facteurs de risque de thrombose aussi forts que le LA et seulement 50% de leurs associations avec la thrombose ont atteint une signification statistique. En revanche, les isotypes et les titres des aCL sont à prendre en compte puisque plusieurs associations significatives avec le risque de thrombose, en particulier avec la survenue d'AVC, d'infarctus du myocarde ou de thrombose veineuse, ont été trouvées pour les aCL IgG avec un titre élevé, supérieur à 33 ou 40 unités GPL selon les études[147]. Schulman *et al.* ont montré qu'à l'arrêt de la Warfarine après six mois de traitement pour une TVP, les patients porteurs d'un aCL par rapport aux patients négatifs avaient un risque de récidive plus élevé (29% vs 14%, p = 0,0013). De même, le taux de mortalité à 4 ans était de 15% chez les patients

porteurs d'un aCL contre 6% pour ceux n'ayant pas d'aCL[152]. Ceci suggère que la présence de titres élevés d'aCL six mois après un épisode de thromboembolie veineuse est prédicteur d'un risque accru de récidive et de décès, d'où l'intérêt d'une anticoagulation orale prolongée. Cependant, le débat actuel quant à la place des aCL est lié au fait que les tests de laboratoire ne distinguent pas les aCL dépendants de la B2GP1, à pouvoir thrombogène, des aCL associés à un contexte infectieux dits B2GP1 indépendants. Ainsi, la mesure des aCL B2GP1 dépendants pourrait permettre de mieux étudier le poids des aCL dans la stratification du risque clinique du SAPL.

Concernant les porteurs d'un aB2GP1 dont le rôle pathogénique a bien été démontré, Tektonidou *et al*. ont montré grâce à une étude prospective sur 4 ans de 842 patients ayant présenté un premier évènement évocateur d'un SAPL (livedo reticularis, thrombopénie, anémie hémolytique auto-immune, thrombose, fausses couches récurrentes) que le risque de développer un deuxième évènement était plus élevé chez les patients présentant à la fois des aB2GP1[127] et une AHAI comme premier évènement (HZ = 2,70, p = 0,018). La Figure 2.2 montre les courbes de Kaplan-Meier, relatives à cette même étude, qui suggèrent qu'un deuxième événement s'est produit plus précocement chez les patients présentant des aB2GPI (HR 1,48, p = 0,14), et ce, d'autant plus lorsque le premier évènement clinique évocateur du SAPL était une AHAI (0,93 ans), par comparaison à un délai médian de survenue d'un deuxième évènement de 13,6 ans pour les patientes ayant présenté des fausses couches récurrentes en l'absence d'aB2GP1. Par ailleurs, un sous-groupe d'IgG aB2GP1 dirigées contre le domaine 1 (épitope comprenant Gly40 et Arg43) a été associé à une activité anticoagulante lupique et est fortement associé à la thrombose[153]. Une grande étude rétrospective internationale et multicentrique sur 442 patients avec un aB2GP1 positif a rapporté une prévalence de 55% d'IgG dirigés contre le premier domaine de la β2GP1. La présence de ces anticorps était associée à un risque accru de thrombose (OR = 3,5 ; IC à 95% 2,3–5,4) et de complication obstétricale (OR = 2,4 ; IC à 95% 1,4-4,3)[154].

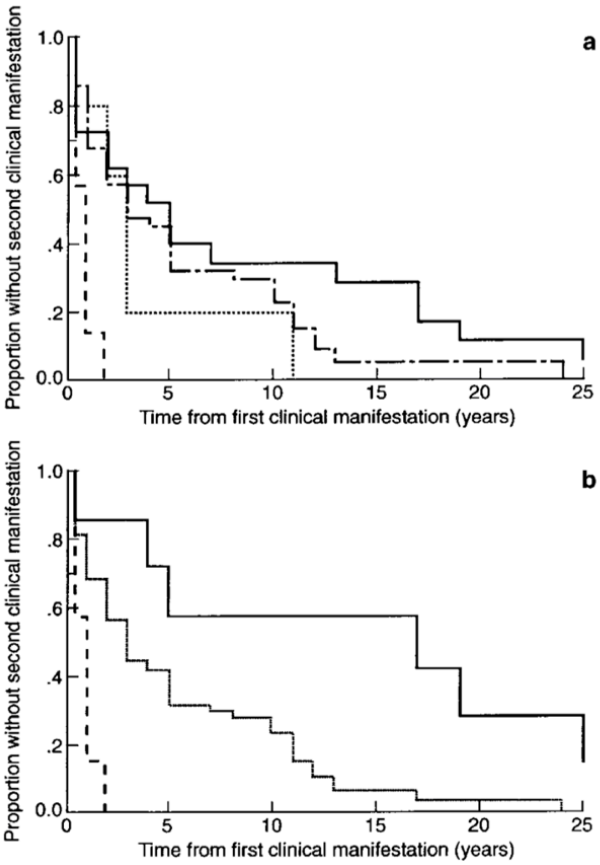


Figure 1. Kaplan-Meier plots for the time to second clinical manifestation from the time of first clinical event suggestive of antiphospholipid syndrome. **a** Classification according to initial presenting clinical manifestation (haemolytic anaemia or other) and anti-β2 glycoprotein I antibodies (log-rank $p = 0.0019$): haemolytic anaemia with anti-β2 glycoprotein I antibodies (----) ($n = 7$), haemolytic anaemia without anti-β2 glycoprotein I (. . .)($n = 5$), anti-β2 glycoprotein I antibodies without haemolysis (–-–-–)($n = 43$), no anti-β2 glycoprotein I and no haemolytic anaemia (__)($n = 22$). **b** Classification showing interactions of initial clinical manifestations and anti-β2 glycoprotein I response (log-rank $p = 0.0001$): haemolytic anemia with anti-β2 glycoprotein I antibodies (- - - -)($n = 7$), recurrent abortions without anti-β2 glycoprotein I antibodies (__)($n = 7$), all other patients (----)($n = 63$). Five patients who presented immediately with two different clinical manifestations are not included.

Figure 2.2 Courbes de Kaplan-Meier représentant le délai médian de survenue d'un deuxième évènement thrombotique en fonction de la présence d'aB2GP1et de la présentation clinique initiale évoquant le SAPL.

Concernant les aPL non conventionnels, les taux d'aPE d'isotype IgG ont été associés de manière significative à la récidive des évènements thrombotiques (p=0,02), d'après une étude rétrospective menée sur une cohorte de 1131 patients[87]. De la même manière, la quantification de l'aPT pourrait prédire la récidive thrombotique puisque Bertin *et al.*[90] ont montré des taux plus élevés d'aPT d'isotype IgG dans les thromboses récurrentes que dans les thromboses isolées (p=0,013).

L'isotype de l'aPL semble également jouer un rôle puisqu'un patient porteur d'un aCL et/ou d'un aB2GP1 d'isotype IgG est plus à risque qu'un patient porteur d'un aCL et/ou d'un aB2GP1 d'isotype IgM[155]. On pense que la concordance d'isotype entre l'aCL et l'aB2GP1 permet d'identifier les patients à plus haut risque[156].

2.1.1.2 TITRE D'ANTI-PHOSPHOLIPIDES

En plus de la spécificité de l'aPL, des études ont montré que la concentration de celui-ci dans le sérum est corrélée avec le risque de survenue d'une manifestation clinique du SAPL.

Un consensus international a établi que la présence d'aCL à des titres moyens ou élevés est un critère de certitude du SAPL et une étude prospective sur 5 ans a montré que les patients avec des niveaux d'IgG aCL supérieurs à 40 U GPL avaient une incidence plus élevée de nouveaux évènements thrombotiques (43,3%) que ceux avec des niveaux inférieurs à 40 U GPL (7,7%)[157]. Néanmoins, les titres d'aCL pour un même sérum peuvent être sous-estimés en fonction de la technique de dosage puisque certains laboratoires, tel que le laboratoire d'Immunologie du Biogénopôle (Hôpital de la Timone, Marseille), soustraient le « blanc sérum », obtenu par mesure de la DO du sérum sur un puit non coaté de cardiolipine, à la DO obtenue sur le puit coaté afin d'améliorer la spécificité du dosage des aCL.

Pengo *et al.* ont montré qu'un titre élevé d'IgG aB2GP1 dirigées contre le domaine 1 (p=0,001) identifie les patients à haut risque de récidive thromboembolique, ce qui pourrait devenir un outil supplémentaire utile dans la prise de décision clinique et thérapeutique[158]. Par ailleurs, De Craemer *et al.* ont suggéré que les titres d'anti-domaine 1 de la B2GP1 sont corrélés avec la triple positivité des aPL et l'aPL-S[159], ce qui corrobore la place de l'anti-domaine 1 de la B2GP1 dans la stratification du risque thrombotique.

Quant au LA, les tests de coagulation ne sont pas adaptés à l'évaluation de sa puissance. Il est donc difficile d'évaluer si un titre élevé de LA est un facteur à risque d'événements cliniques plus important qu'un LA à faible titre. La quantification du LA pourrait aider à stratifier les patients en groupes de risque. Devreese *et al.* ont mesuré des titres de LA par un test de génération de thrombine (ou thrombinographie) qui consiste à diluer les plasmas des patients dans un pool de plasma témoins qui contient des anticorps monoclonaux aB2GP1 (nommés 23H9) aux propriétés LA connues. Les résultats du thrombinogramme de patients porteurs d'aPL montre un allongement significatif du temps de latence (temps pour arriver au pic de thrombine) et une diminution de la hauteur du pic. Des courbes d'étalonnage du ratio entre la hauteur du pic et le temps de latence en fonction de la concentration en anticorps monoclonaux dans les plasmas d'étalonnage permettent ainsi de quantifier l'activité du LA. Comme l'illustre la Figure 2.3, cette étude a montré l'intérêt de la quantification du LA dans l'évaluation pertinente du risque thrombotique[160], en plus du titre d'IgG aB2GP1 déjà rapporté par de nombreuses autres études.

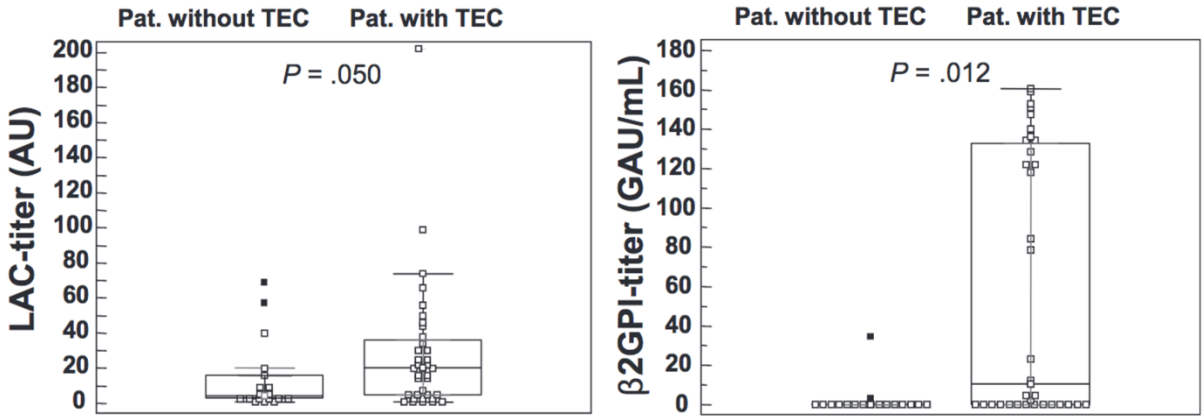


Figure 2.3 Représentation du titre de LA (n=54) en unités arbitraires (AU/mL) et d'aB2GP1 (n = 52) en unités arbitraires IgG (GAU/mL) chez des patients avec ou sans complications thromboemboliques (TEC).

2.1.1.3 Associations d'anti-phospholipides

Le nombre d'aPL parmi le LA, les aCL et les aB2GP1 définit la triple ou la double positivité, quelle que soit la combinaison de ces aPL conventionnels. Des travaux dans la littérature ont démontré que cette positivité multiple d'aPL, chez les porteurs d'un SAPL symptomatique ou asymptomatique, est corrélée à l'augmentation significative du risque de thrombose[65] et de complication obstétricale[161], le risque le plus élevé correspondant à la triple positivité (TP).

En réalité, la triple positivité est dérivée d'un anticorps unique aB2GP1 qui est capable de reproduire la positivité dans les trois tests de dépistage des aPL conventionnels[162]. Cet anticorps est dirigé contre le domaine 1 de la β2GP1 (aB2GP1-Dm1). En effet, une étude récente[163] a observé que 52 des 53 patients atteints de SAPL avec une triple positivité présentaient un titre élevé d'anticorps dirigés contre les épitopes Arg39-Val43 situés dans le domaine 1 de la β2GP1. Le seul patient TP restant pourrait posséder des anticorps ayant une spécificité d'épitope différente que le domaine 1. De même, Pengo *et al.*[164] ont observé la présence d'aB2GP1-Dm1 (valeur seuil fixée à 14,2 UC) chez 97% des TP, avec des valeurs moyennes d'IgG aB2GP1-Dm1 significativement plus élevées chez les TP (Figure 2.4), ainsi qu'une association significative entre la présence d'IgG aB2GP1-Dm1 et les évènements thromboemboliques.

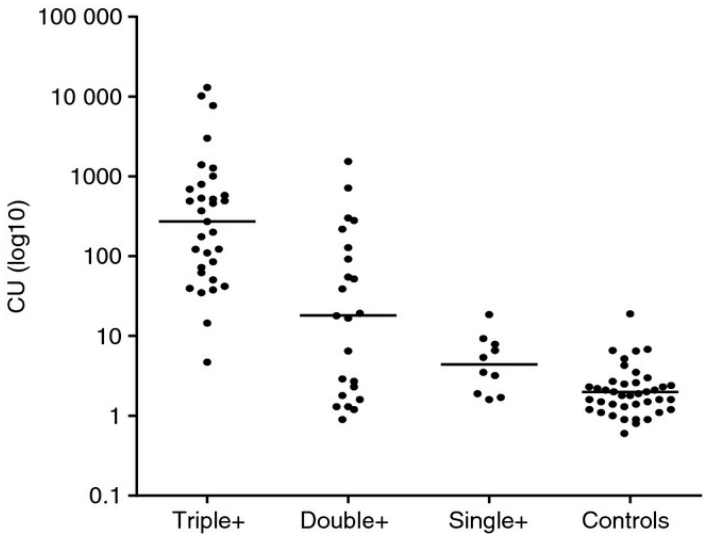


Figure 2.4 Variations de la moyenne géométrique des valeurs d'IgG aB2GP1-Dm1 exprimées en unités chimiluminescentes (CU) dans les groupes de patients porteurs d'un SAPL triple positif, double positif, simple positif et un groupe contrôle.

Plusieurs études rétrospectives et prospectives ont montré que la TP des aPL est plus fortement corrélée avec la thrombose et la morbidité de la grossesse que la présence d'une positivité simple ou double. Une vaste étude prospective multicentrique sur des patients atteints de SAPL triple positif a rapporté une incidence cumulative de thromboses de 12,2,% (IC 95% 9,6-14,8), 26,1% (IC 95% 22,3-29,9) et 44,2% (IC 95% 38,6-49,8) après respectivement 1, 5 et 10 ans de suivi[165], ce qui démontre que les patients TP sont les plus exposés aux risques de récidive. En ce qui concerne les complications obstétricales, Ruffatti *et al*. ont montré que la TP chez les femmes porteuses d'un SAPL conférait un OR de 16,2 (IC 95 % 0,9-292) pour les pertes de grossesse tardives et un OR de 34,4 (IC 95 % 3,5-335,1) pour une perte de grossesse ultérieure[166].

Dans une étude rapportée par Pengo *et al*.[107], les porteurs asymptomatiques d'un profil TP ont connu une plus grande incidence d'événements thrombotiques, soit 5,3 % par an (Figure 2.5), les classant dans un profil à haut risque. Par ailleurs, les récidives restent fréquentes chez les TP malgré l'utilisation d'anticoagulants oraux instaurés suite à un premier évènement clinique et le risque de thrombose récurrente est encore plus élevé chez les patients TP qui ne sont pas sous anticoagulation orale.

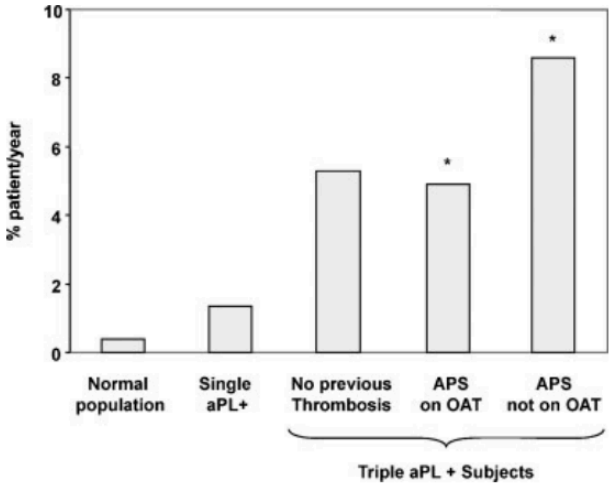


Figure 2.5 Incidence annuelle de thrombose en fonction du profil des aPL[167].

Toutefois, la classification des patients porteurs d'un profil TP dans une catégorie dite à haut risque est à nuancer. Dans une étude rétrospective menée au sein du laboratoire d'immunologie de l'hôpital de la Conception[168], nous avons comparé les données cliniques et biologiques de patients TP pour les aPL, considérés comme à plus fort risque d'évènement clinique, avec des patients simple positif (SP) exprimant des aCL, considérés comme les moins à risque de thrombose d'après la littérature. La cohorte était constituée de 161 patients avec un suivi de 5 ans pour 121 d'entre eux et divisée en deux groupes selon la survenue ou non d'un critère clinique du SAPL, classant les patients en porteurs symptomatiques et en porteurs sains d'aPL. Tout d'abord, dans cette étude nous avons montré une prévalence élevée de patients porteurs sains (43%) quelle que soit la positivité triple ou simple des aPL, ce qui remet en question la pertinence clinique de la TP. De plus, un profil dit à très haut risque de thrombose a été mis en évidence pour les patients TP porteurs d'une combinaison d'IgG aCL et d'IgG aB2GP1 avec deux tests positifs pour les LA ou bien d'une combinaison d'IgG aCL et d'IgG aB2GP1 avec un indice de Rosner supérieur à 27. En outre, la comparaison entre les patients symptomatiques TP et SP en l'absence de traitement n'a montré aucune différence significative en termes de nombre d'évènements thrombotiques (OR = 1,01 ; IC 95 % 0,88-1,17) ou obstétricaux (OR = 0,94 ; IC 95 % 0,83-1,06), du type ou de la localisation de la thrombose ou encore de la récidive, ce qui fait reconsidérer la place de la TP comme étant le principal marqueur de sévérité du SAPL. Ainsi, ces nouvelles données soulèvent la question d'une prise en charge thérapeutique similaire des patients quel que soit le nombre d'aPL. Ceci nous incite à rechercher d'autres facteurs de gravité du SAPL afin de discriminer par d'autres outils les patients à haut risque de récidive thrombotique.

2.2 LA GLYCOSYLATION DES ANTI-PHOSPHOLIPIDES

En accord avec la théorie du « double hit », il est possible que d'autres facteurs soient impliqués dans le développement de la thrombose. Les immunoglobulines étant des glycoprotéines, la pathogénicité du SAPL pourrait dépendre de la glycosylation du fragment cristallisable (Fc) des aPL. Cette modification post-traductionnelle, qui se déroule dans l'appareil de Golgi, peut effectivement influencer les fonctions effectrices des IgG. Si les modifications du profil de glycosylation concernent toutes les classes d'Ig, le site de glycosylation CH2-84.4 de la région Fc des IgG reste le mieux caractérisé[169]. A notre connaissance, il n'existe effectivement pas de données concernant les modifications de la glycosylation des aPL d'isotype IgM et des IgA. De ce fait, seule la glycosylation des aPL d'isotype IgG sera abordée.

2.2.1 IMPACT DE LA GLYCOSYLATION SUR LES FONCTIONS EFFECTRICES DES ANTICORPS

La glycosylation des IgG joue un rôle majeur sur leurs fonctions effectrices médiées par les récepteurs pour le fragment Fc des IgG (FcγR). Ces récepteurs représentent une famille de glycoprotéines membranaires largement exprimées sur les cellules de la réponse immunitaire innée (mastocytes, basophiles, neutrophiles, lymphocytes, monocytes et macrophages) et assurent ainsi un lien entre l'immunité humorale du système immunitaire adaptatif et les fonctions effectrices déclenchées par les cellules de l'immunité innée. Les FcγR se distinguent selon leur affinité pour les sous-classes d'IgG et selon leur transmission de signaux activateurs (récepteurs IA, IIA, IIIA) ou inhibiteurs (récepteurs IIB)[170]. Parmi les fonctions effectrices des IgG, les FcγR sont essentiels dans la phagocytose, la dégranulation, la libération de médiateurs pro-inflammatoires et dans les réactions de cytotoxicité cellulaire dépendantes des anticorps (ADCC). De nombreuses études ont montré que le N-glycane présent sur l'azote de l'asparagine en position 297 (N297) du domaine CH2 de chaque chaine lourde des IgG est crucial pour son interaction *in vivo* avec les FcγR[170]. Ce N-glycane est composé d'un heptapolysaccharide bi-antennaire constant comprenant des résidus de N-acétylglucosamine (GlcNAc) et de mannose avec 2 bras liés en α(1,6) et α(1,3), comme l'illustre la Figure 2.6. Des arborisations de N-acétyl-glucosamine greffées en β(1-4) (bissection à la position 4 du mannose de la structure centrale), de galactose (galactosylation), de fucose (fucosylation) ou encore d'acide sialique

(sialylation) sont ajoutées de manière variable, dépendants de l'âge et du contexte clinique. En moyenne, les N-glycanes des IgG sériques totales sont composés de niveaux élevés de fucose (95%), de niveaux intermédiaires de galactose (45%), d'une faible teneur en N-acétylglucosamine bissectrice (attachée au mannose primaire) (15%) et d'une faible sialylation (10%) sur les antennes[171]. L'hétérogénéité des motifs glucidiques de la partie variable du N-glycane modifie de ce fait la conformation spatiale des IgG, leur stabilité et leur affinité, et influence directement leur liaison aux récepteurs FcγR et à la protéine C1q du complément[172]. Ainsi, la partie sucrée des IgG est l'une des cibles les plus prometteuses pour moduler l'activité pro-inflammatoire et anti-inflammatoire de ces Ig[170].

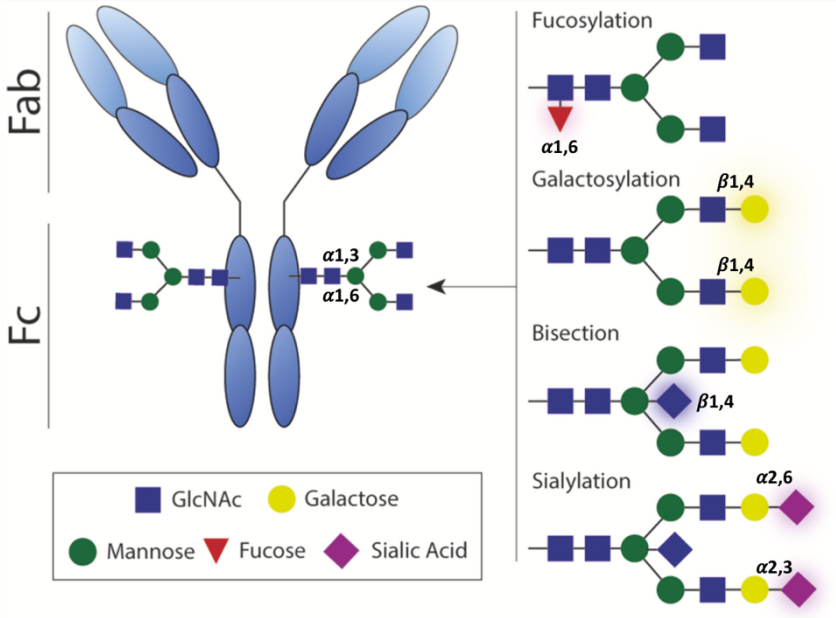


Figure 2.6 Structure de la partie glucidique attachée à l'Asn297 du fragment Fc de l'anticorps[173].

Parmi les glycovariants des IgG, certains augmentent l'activité pro-inflammatoire tandis que d'autres sont anti-inflammatoires, comme l'illustre la Figure 2.7. L'absence totale de glycosylation des IgG conduit à un état conformationnel empêchant leur liaison au FcγR ou au complément, ce qui explique l'incapacité des **IgG déglycosylées** à médier *in vivo* les réponses inflammatoires[174]. Outre la suppression de l'activité de l'IgG par l'élimination du N-glycane en position N297, plusieurs études suggèrent que la présence ou l'absence de résidus de sucre sur les IgG affecte leur affinité avec les FcγR et donc l'ampleur de l'inflammation. Plus précisément, la présence d'un fucose créant un encombrement stérique qui empêche le N-glycane des IgG d'interagir avec le FcγR, les glycoformes d'IgG dépourvues de fucose présentent une affinité supérieure pour le FcγRIIIA activateurs chez l'homme[175176]. En plus des

IgG afucosylées, Malhotra *et al*. ont suggéré que l'absence de galactoses terminaux (**glycoformes IgG-G0**) rend les résidus N-acétyl-glucosamines plus accessibles pour la liaison aux lectines liant le mannose (Mannose Binding Lectin, MBL), ce qui accroit l'activité pro-inflammatoire par l'activation du complément[177] via la voie des lectines. Une autre modification biologiquement importante du N-glycane est la **sialylation**. Plusieurs études ont mis en évidence que le défaut de sialylation[178] des IgG augmente directement l'ADCC en renforçant l'affinité pour le FcγRIIIA, ce qui permet de maintenir un état pro-inflammatoire. De la même manière, Kaneko *et al*.[179] ont montré que la présence d'acide sialique serait responsable de l'activité anti-inflammatoire des IgIV chez la souris par réduction de l'affinité des IgG avec les FcγRIII. Ainsi, l'oligosaccharide lié à l'IgG apparait comme un commutateur moléculaire qui fait passer l'activité des IgG d'une voie pro-inflammatoire à une voie anti-inflammatoire.

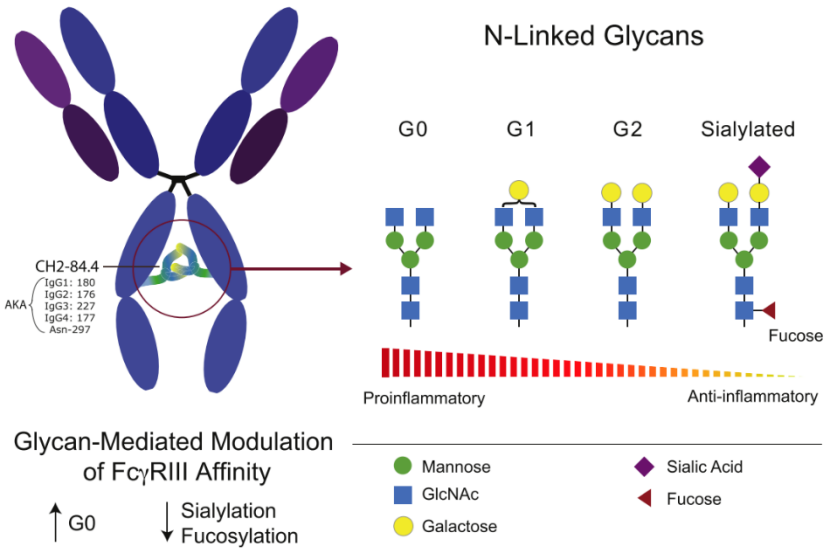


Figure 2.7 Les glycoformes des IgG en lien avec leurs propriétés inflammatoires[169].

2.2.2 Pathogenicite de la glycosylation des anticorps dans le syndrome des anti-phospholipides

Dès 1985, Parekh *et al*. ont émis l'idée selon laquelle les N-glycanes sont exprimés de manière différente sur les IgG sériques de patients atteints de polyarthrite rhumatoïde comparativement à des individus sains et à des sujets atteints d'arthrose primaire. La région CH2 des IgG demeure à ce jour le site de glycosylation le plus décrit dans la littérature. En effet, Albert *et al*.[180] montrent sur des modèles auto-immuns de souris que le clivage *in vivo* du N-glycane accroché à l'IgG sur l'Asn297 entraine la perte de l'activité pro-inflammatoire

médiée par les auto-anticorps. Ceci explique ainsi le rôle de la N-glycosylation des auto-anticorps dans leur interaction avec les FcγR des cellules immunitaires innées, à l'origine de l'induction d'une réponse pro-inflammatoire et des lésions tissulaires observées dans les maladies auto-immunes. Parmi les diverses glycoformes d'IgG, celles augmentant l'activité pro-inflammatoire sont majoritairement retrouvées dans le sérum de patients atteints de maladie auto-immune. Les glycanes G0, sans résidus galactose, ont une affinité plus élevée pour le FcγRIII et sont les plus associés aux maladies auto-immunes[181]. Des niveaux accrus de glycanes G0 sont également en corrélation avec l'activité de la maladie[182]. De la même manière, la sialylation et la fucosylation des IgG sont souvent diminuées dans les MAI puisque les IgG hyposialylées et afucosylées favorisent un état pro-inflammatoire par augmentation de l'affinité des IgG avec les FcγR.

Dans le SAPL, plusieurs travaux attestent du rôle de la glycosylation des IgG dans les effets pathogènes des aPL. Fickentscher *et al*. ont mis en évidence que le facteur pathogène de l'aB2GP1 pouvait être lié à la sialylation de cet auto-anticorps. Pour cela, ils ont analysé la sialylation de l'aB2GP1 par mesure de la liaison spécifique de la lectine de Sambucus nigra (SNA) à l'acide sialique de l'aB2GP1. Le calcul du rapport SNA/IgG a permis de comparer les niveaux de sialylation des aB2GP1 entre les sérums de patients atteints d'un SAPL symptomatique et les sujets asymptomatiques porteurs d'aPL. La Figure 2.8 montre une sialylation significativement plus élevée de l'aB2GP1 IgG isolé à partir de sujets sains et/ou asymptomatiques porteurs d'aPL par rapport à celle des patients symptomatiques atteints d'un SAPL. De plus, l'aB2GP1 IgG sialylé est incapable de se lier aux plaquettes et de les activer via le FcγRIIA. Ainsi, l'hypersialylation des aB2GP1 IgG conduit à une faible pathogénicité de ces aPL et empêcherait le développement de manifestations cliniques du SAPL. A l'inverse, l'hyposialylation des IgG favoriserait l'inflammation et précipiterait la formation du thrombus dans le SAPL.

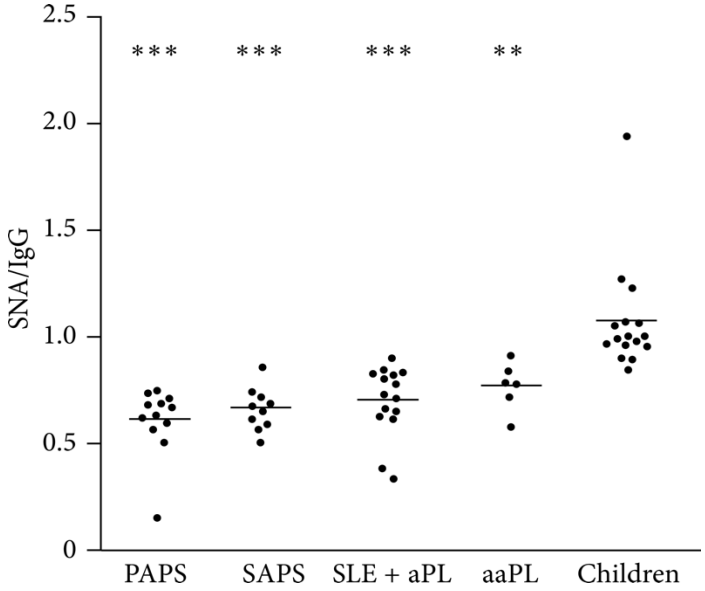


Figure 2.8 Rapport SNA/ aB2GP1 chez des sujets atteints d'un PAPS (SAPL primaire), SAPS (SAPL secondaire à un LED), SLE + aPL (LED porteurs asymptomatiques d'aPL), aaPL (porteurs asymptomatiques d'aPL) et chez les enfants sains[183].

Par ailleurs, Alvarez *et al*.[184] ont remarqué très récemment que la quantité de galactose β1-4 N-acétylglucosamine est significativement diminuée sur les IgG des femmes ayant un SAPL obstétrique séronégatif, porteuses d'aPL non conventionnels, par rapport à un groupe témoin de femmes en bonne santé (Figure 2.9). Par conséquent, les manifestations obstétriques du SAPL pourraient être liées au profil glycane spécifique des aPL non conventionnels. Toutefois, l'étude de la sialylation α2,6 n'a montré aucune différence significative entre les groupes.

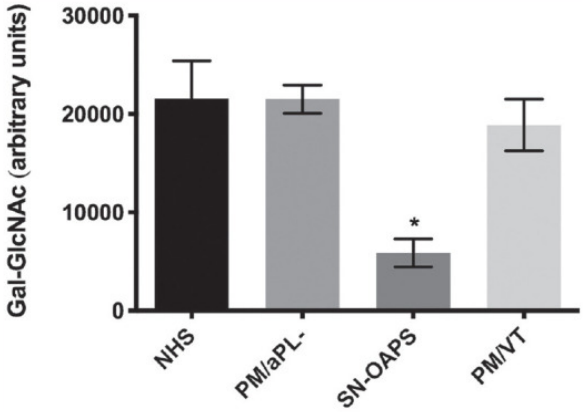


Figure 2.9 Quantités de galactose terminal chez des femmes saines (NHS), des femmes ayant des antécédents de complications obstétricales en l'absence de MAI (PM/aPL-), des femmes ayant un SAPL obstétrical séronégatif et des aPL non conventionnels persistants (SN-OAPS), des femmes porteuses d'aPL et ayant des antécédents de complications obstétricales et de thrombose vasculaire (PM/ VT).

De plus, une étude récente a observé qu'une faible galactosylation de toutes les sous-classes d'IgG aB2GP1, une augmentation de la bissection et de la fucosylation des IgG1 et IgG2 aB2GP1 étaient fortement associées aux CAPS et à la triple positivité des aPL[185].

De la même manière, l'analyse des glycoformes pourrait faire partie intégrante du pronostic du SAPL. On peut donc supposer que la N-glycosylation des apL puisse être un marqueur biologique associé aux risques de thrombose ou de complication obstétricale. Par exemple, l'analyse en routine du calcul du rapport entre le taux de sialylation des aPL IgG par rapport à celui des IgG totales pourrait constituer un outil précieux pour prédire le passage de l'état asymptomatique à l'apparition de manifestations cliniques.

2.3 Les pieges extracellulaires des neutrophiles (NETs) dans le SAPL

2.3.1 Implication des NETs dans le processus d'immunothrombose lie au SAPL

La production de pièges extracellulaires des neutrophiles (NETs, Neutrophil Extracellular Traps) est un mécanisme cellulaire consécutif à l'activation des polynucléaires neutrophiles (PNN) qui aboutit à la libération, dans l'espace extracellulaire, d'un maillage constitué d'ADN, d'histones et de protéines bactéricides issues de leurs granulations : l'élastase (NE), la myéloperoxydase (MPO) ou encore la protéinase 3 (PR3). Cette NETose joue un rôle dans l'immunité anti-infectieuse en détruisant les agents pathogènes extracellulaires via les espèces réactives de l'oxygène (ROS) et les protéines antimicrobiennes. Toutefois, les NETs contribuent également aux processus d'immunothrombose, impliquant une réponse immunitaire innée à l'origine de thromboses vasculaires, que l'on retrouve dans le cancer, la COVID-19[186] ainsi que le SAPL. En effet, les aPL ont la capacité de se lier à la surface des neutrophiles et de déclencher la libération de NETs, qui ont récemment été incriminés dans le dysfonctionnement de l'endothélium, la formation de la plaque d'athérosclérose et la survenue de thrombose[187]. Plus précisément, les histones potentialisent l'activation et l'agrégation plaquettaire, l'ADN extracellulaire chargé négativement active la voie intrinsèque de la coagulation via le facteur XII et les protéases inactivent certains facteurs anticoagulants. De plus, les NETs peuvent être une source importante de FT, générant de la thrombine par la voie extrinsèque de la coagulation, et confèrent au caillot une résistance à la fibrinolyse[188]. Dans le sérum, les NETs sont dégradés par l'endonucléase sérique DNase 1[189].

En pratique, la quantification des NETs pourrait constituer un moyen de mesurer l'immunothrombose. Le gold standard de la quantification des NETs repose sur la **microscopie à fluorescence**. Pour cela, les neutrophiles sont ensemencés sur des lames de verre avec des chambres et incubés avec divers stimulis (PMA (Phorbol-12-Myristate-13-Acétate), le lipopolysaccharide de *E. Coli*), divers Ac humains comme les IgG aPL) pendant plusieurs heures à 37°C. Après fixation des PNN, une étape d'immunomarquage par des anticorps dirigés contre les composants des NETs, tels que la MPO, la NE, la PR3 et les histones, suivie d'anticorps anti-IgG liés à un fluorochrome est réalisée. En colorant simultanément l'ADN par un agent intercalant, la co-localisation des protéines dérivées des neutrophiles et de l'ADN extracellulaire suggère la **présence de NETs**. La quantification des NETs est alors réalisée au microscope à fluorescence en calculant le pourcentage de neutrophiles en NETose. Bien que le comptage des NETs au microscope présente l'avantage de la visualisation directe, la quantification de ces images est fastidieuse et soumise à d'éventuels biais spécifiques à l'opérateur. Par la suite, plusieurs systèmes automatisés pour faciliter la quantification des résultats obtenus par microscopie à fluorescence ont été élaborés[190]. Par ailleurs, plusieurs études ont démontré que les reliquats de NETs solubles circulent dans le sang périphérique[191,192] et peuvent servir de biomarqueurs de NETs. En effet, en plus de l'évaluation visuelle de la formation de NETs par microscopie à fluorescence, une méthode spectrofluorométrique[193] est souvent utilisée pour quantifier les NETs dans une application à plus haut débit. Pour cela, un colorant nucléique fluorescent ultrasensible qui se lie à **l'ADN extracellulaire** double brin (dsDNA), tel que le PicoGreen (Invitrogen), est utilisé afin de le quantifier. Malgré le fait que cette méthodologie soit hautement objective, peu coûteuse et plus simple, cette technique manque de spécificité puisque l'ADN extracellulaire ne provient pas exclusivement des neutrophiles et n'est pas assez sensible pour détecter une faible quantité d'ADN (< 20% 1h après la stimulation). Ainsi, une confirmation microscopique des résultats est nécessaire pour exclure la libération nécrotique de l'ADN cellulaire et confirmer ainsi la spécificité du test[193]. Les autres formes plus spécifiques de reliquats de NETs reposent sur des complexes d'ADN et de protéines granulaires, tels que les **complexes MPO-ADN** et NE-ADN ainsi que **l'histone H3 citrulliné**. Ces composants de NETs circulants peuvent être déterminés dans des échantillons de plasma par dosage immuno-enzymatique (ELISA)[194]. Cependant, la MPO est une protéine fortement chargée positivement, qui peut se lier à l'ADN extracellulaire chargé négativement libéré dans le plasma suite à une lésion tissulaire, remettant ainsi en question sa spécificité en tant que marqueur de NETs[195]. Quant à l'histone H3 citrulliné (H3Cit), c'est un indicateur de la décondensation de la chromatine par conversion de l'arginine en citrulline dans

les histones H3 grâce à la peptidylarginine déiminase 4 (PAD4) au début de la NETose. L'H3Cit est ainsi considérée comme un biomarqueur spécifique des NETs[196]. Enfin, la détection des NETs peut également reposer sur la mesure des **espèces réactives de l'oxygène (ROS)** puisque ces dernières participent à la translocation de PAD4 du cytoplasme vers le noyau, à l'origine de la génération des NETs. Toutefois, l'implication systématique des ROS au cours de la NETose est discutée. En effet, certaines équipes[197] ont démontré l'existence d'une NETose vitale, différente de la NETose suicidaire, indépendante de la voie des ROS[198], ce qui limite l'intérêt de leur dosage dans la quantification des NETs à visée pronostique.

Plusieurs études ont récemment rapporté un certain nombre d'observations importantes sur les neutrophiles de patients atteints d'un SAPL. Premièrement, Yalavarthi *et al.*[199] ont constaté que les NETs, mesurés par les concentrations de complexes MPO-ADN, et l'ADN extracellulaire circulent à des niveaux élevés dans le plasma et le sérum de patients porteurs d'un SAPL primaire par rapport à des volontaires sains (Figure 2.10). De même, les neutrophiles de patients atteints de SAPL sont plus sujets à la NETose que les neutrophiles de volontaires sains. Cette étude a également prouvé que les plasmas de patients atteints d'un SAPL stimulent les neutrophiles de témoins sains pour libérer des NETs et que les NETs favorisent ensuite la génération de thrombine (Figure 2.11). De la même manière, Meng *et al.*[200] ont mis en évidence le rôle *in vivo* des NETs dans la thrombose veineuse médiée par les aPL. En effet, les thrombi de patients SAPL ont présenté un enrichissement significatif en histone H3 citrullinée, quantifiée par western blot, par rapport aux témoins. Ainsi, ces travaux révèlent que les neutrophiles circulants sont activés par les aPL et accélèrent la thrombose.

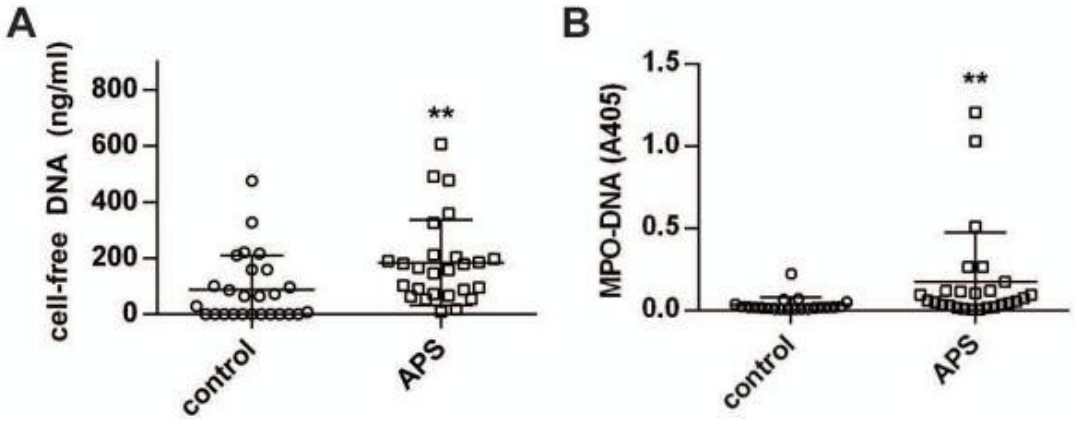


Figure 2.10 Concentrations d'ADN extracellulaires (graphique A) et de complexes myéloperoxydase (MPO)-ADN en tant que marqueurs de NETs circulants (graphique B) dans les plasmas de patients atteints de SAPL (APS) par rapport au groupe contrôle.

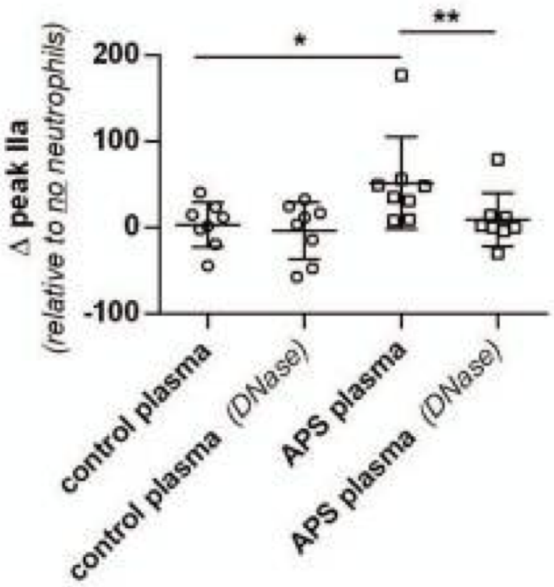


Figure 2.11 Détermination de la génération de thrombine (valeurs delta calculées par rapport à l'état initial qui comprend uniquement le plasma) du plasma de témoins sains (control plasma) ou de patients atteints de SAPL primaire (APS plasma) mélangé avec des neutrophiles de témoins sains seuls ou avec un traitement à la DNase. ***Le plasma de patients porteurs d'un SAPL stimule la génération de thrombine de manière dépendante des neutrophiles et de l'ADN.***

Lu *et al.*[201] ont également montré l'implication des NETs dans des lésions de trophoblastes et de cellules endothéliales dans le cadre du SAPL obstétrical. La Figure 2.12 montre que les concentrations d'ADN extracellulaire (graphique A) et de NETs (graphique B) dans le sérum de femmes enceintes atteintes de SAPL étaient élevées par rapport à celles de femmes enceintes témoins appariées à la semaine d'aménorrhée. De plus, les IgG aPL stimulent de manière significative la libération de NETs chez les neutrophiles de sujets sains par rapport à celle des IgG isolés à partir de témoins sains. La Figure 2.13 prouve que les IgG aPL accélèrent la NETose par la génération de ROS médiée par la NADPH oxydase, de manière temps-dépendante et similaire à celui du PMA. Enfin, cette étude a mis en évidence les effets néfastes des NETs induits par les IgG aPL sur l'invasion et la migration des trophoblastes, indispensables à une placentation normale, ainsi que sur la capacité de migration et de formation de tubes des HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells, les cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine). Ainsi, la mesure des NETs via la quantification d'ADN extracellulaire ou de complexes MPO-ADN dans le sérum pourrait servir de marqueur prédictif de thrombose dans le SAPL obstétrical.

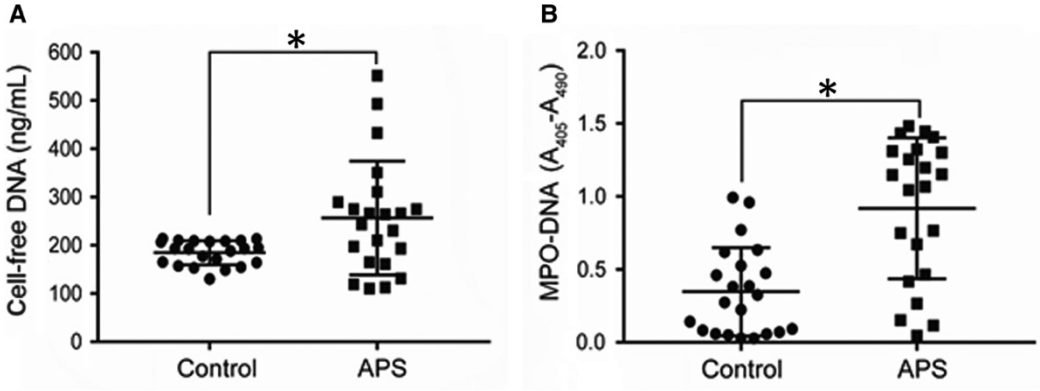


Figure 2.12 Concentrations d'ADN acellulaires (graphique A) et de complexes myéloperoxydase (MPO)-ADN en tant que marqueurs de NETs circulants (graphique B) dans les sérums de femmes enceintes atteintes de SAPL (APS) et de femmes enceintes témoins en bonne santé (HC) mesurés par ELISA.

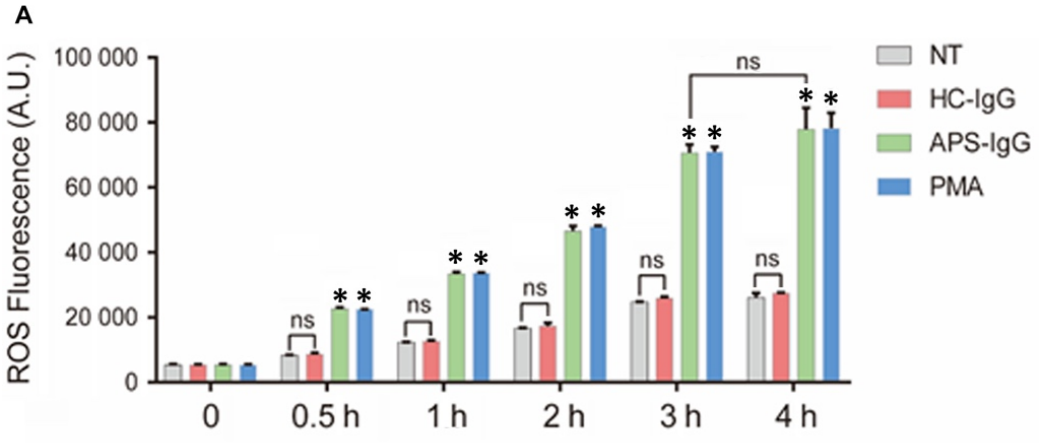


Figure 2.13 Production de ROS par les neutrophiles isolés à partir de sujets sains sans stimulation (NT) ou après stimulation avec des IgG aPL (15µg/ml), IgG de témoins sains (15µg/ml) ou PMA (50 nmol/L) à temps 0, 0,5, 1, 2, 3 et 4 heures, détecté par fluorescence grâce au DCFH-DA (dichlorodihydrofluorescein diacetate).

2.3.2 Interet des NETs et auto-anticorps anti-NETs dans l'evaluation de la gravite du SAPL

L'association des NETs avec la gravité de la maladie a été montrée dans le LED[202]. En effet, les niveaux de NETs ont identifié des patients avec un phénotype de maladie grave caractérisé par une néphrite induite par les complexes immuns. De plus, les niveaux de NETs étaient significativement associés à une augmentation future de l'activité du LED dans les trois mois (OR = 1,75 ; p = 0,01) ainsi qu'à une augmentation globale de l'activité de la maladie sur un an (p < 0,01). Ainsi, les niveaux de NETs offrent une valeur clinique significative pour identifier les patients à risque de maladie grave dans le LED. Plus récemment, dans la COVID-19, plusieurs études ont témoigné que les NETs circulants, quantifiés par le dosage de l'ADN

extracellulaire, des complexes MPO-ADN et de l'H3Cit[203] dans des échantillons de sérum, ont une valeur pronostique car ils sont associés à la gravité de la maladie[204].

Dans le SAPL, plusieurs études ont suggéré que les patients atteints de forme primaire ont des IgG circulantes qui se lient aux NETs eux-mêmes, en dehors des aPL qui se lient aux neutrophiles. Cependant, la quantification des NETs et de leurs auto-anticorps, leur fonction et leur intérêt pronostique dans le SAPL n'ont pas été étudiés de manière approfondie.

Lefflet *et al.*[205] ont découvert que les patients atteints de SAPL ont une réduction de la dégradation des NETs médiée par la DNase-1 par rapport à des témoins sains, sans différence entre le SAPL primaire et secondaire (Figure 2.14A). Ceci suggère un cercle prothrombotique vicieux dans lequel le seuil de NETose des neutrophiles dans le SAPL est diminué, accompagné d'une formation exagérée de ces NETs. Cette diminution de la dégradation des NETs est corrélée de manière significative à des niveaux accrus d'autoanticorps contre les NETs, surtout chez les patients atteints d'un SAPL secondaire (Figure 2.14B). Ces IgG anti-NET, qui ont été confirmés par microscopie confocale, pourraient affecter la dégradation des NETs en empêchant l'accès de la DNase-1 aux NETs, par des mécanismes différents selon la forme primaire ou secondaire du SAPL.

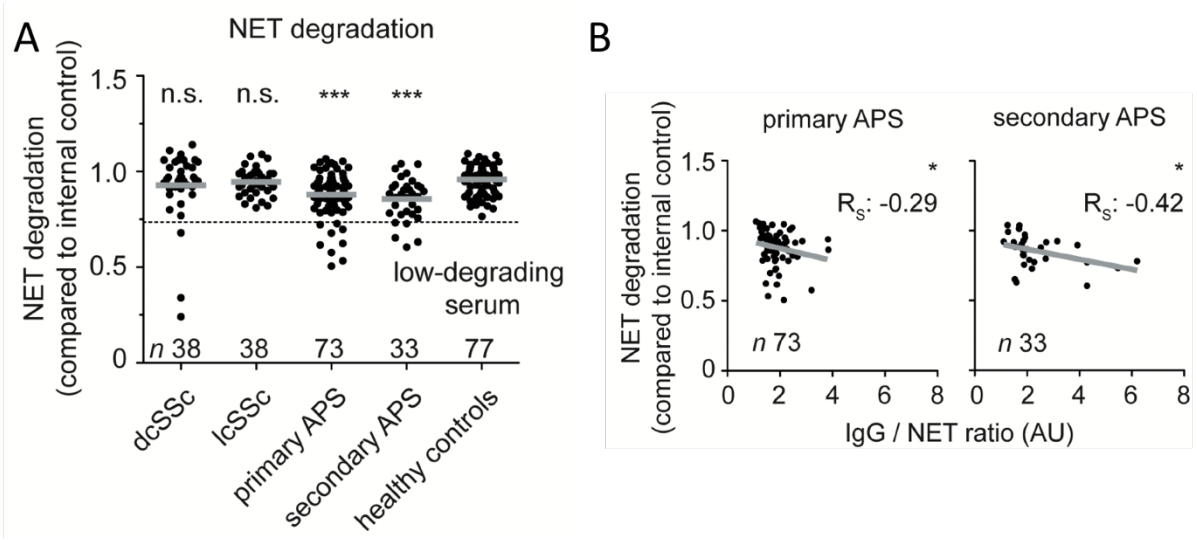


Figure 2.14 (A) Dégradation des NETs chez les patients atteints de sclérodermie (diffuse cutaneous SSc (dcSSc), limited cutaneous SSc (lcSSc)), SAPL primaire, SAPL secondaire et sujets sains ; (B) Corrélation entre la dégradation des NETs et la présence d'anticorps anti-NETs faiblement retrouvée dans le SAPL primaire mais fortement dans le SAPL secondaire.

Une étude plus récente[206] a évalué les associations cliniques des auto-anticorps ciblant les NETs. Celle-ci a rapporté des taux nettement élevés d'IgG et d'IgM anti-NETs chez les patients atteints de SAPL primaire par rapport à des témoins sains (Figure 2.15). Cette activité anti-NET n'était pas corrélée avec le taux d'aB2GP1. Les anti-NETs ont altéré la capacité des sérums de patients à dégrader les NETs. Cliniquement, les anti-NET IgG sont associés à certaines manifestations cliniques du SAPL et en particulier à des thromboses veineuses récidivantes (OR = 4,3 ; p = 0,002, Figure 2.16). Ainsi, des niveaux élevés d'auto-anticorps anti-NETs dans le SAPL primaire peut altérer la clairance des NETs et activer la cascade du complément. A terme, ces résultats pourraient permettre une stratification plus efficace des risques.

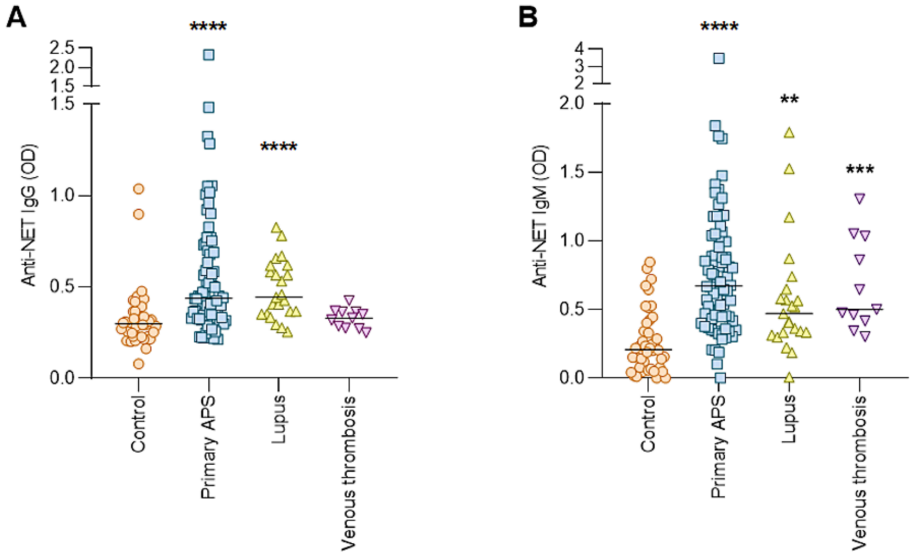


Figure 2.15 Niveaux d'anticorps anti-NET IgG (A) et IgM (B) chez les patients atteints de SAPL primaire, de LED sans aPL, de TVP non provoquée sans aPL et les témoins sains.

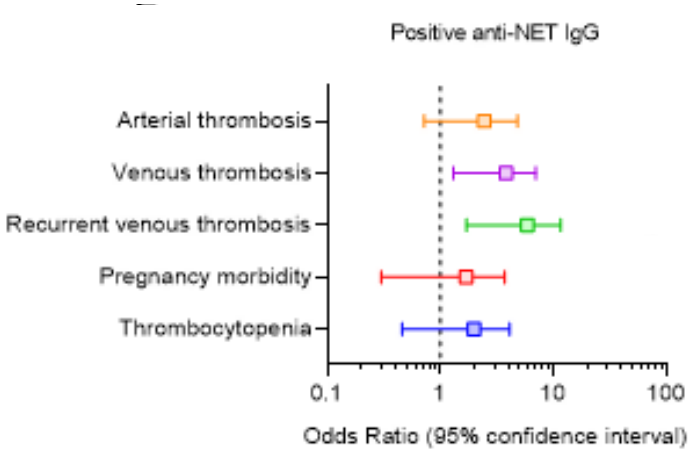


Figure 2.16 Associations entre la positivité des anti-NET IgG et les manifestations cliniques chez 154 personnes présentant un SAPL primaire, un LED sans aPL, une TVP non provoquée sans aPL et les témoins sains.

En perspective, les NETs pourraient être considérés comme un bon candidat biomarqueur de risque thrombotique dans le phénomène d'immunothrombose au cours du SAPL. L'exploration des NETs par la mesure des complexes MPO-ADN ou de l'HCit3, qui constituent les marqueurs spécifiques des NETs, et des auto-anticorps anti-NETs pourrait permettre de classifier les patients à haut risque de thrombose et ainsi d'aider les cliniciens à la prise de décision thérapeutique lors de la prophylaxie primaire et secondaire.

2.4 Vers de nouveaux marqueurs de gravite du SAPL : les anticorps anti-acide lysobisphosphatidique (LBPA)

2.4.1 L'acide lysobisphosphatidique

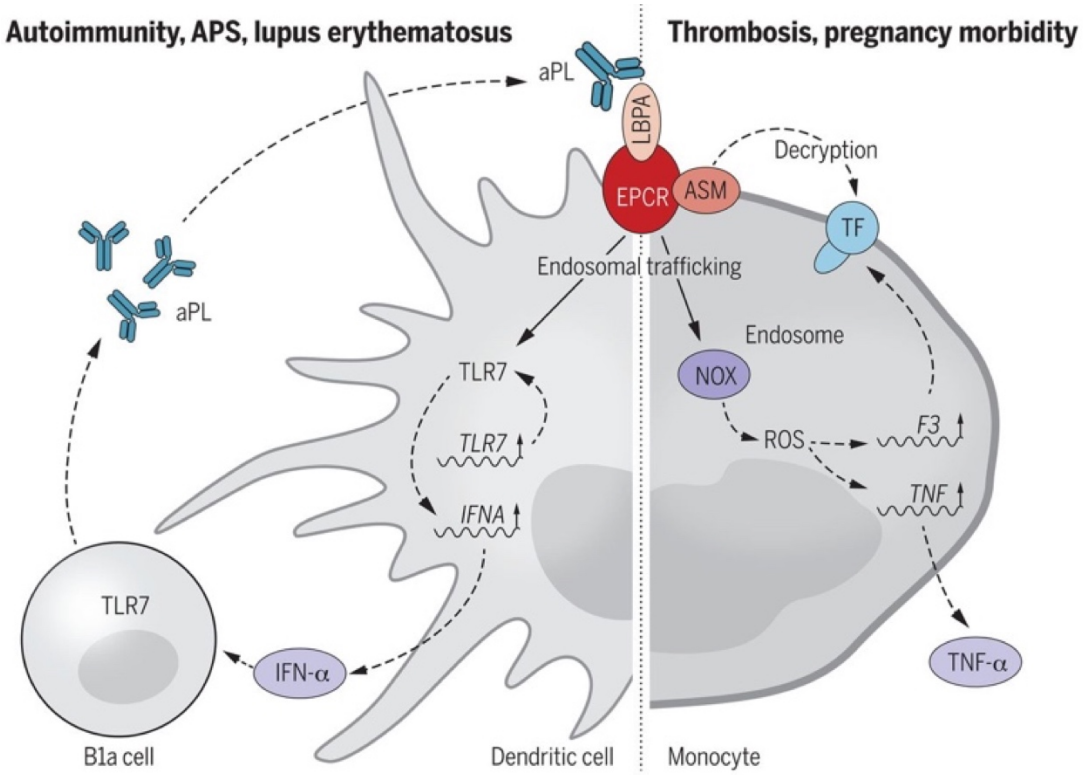


Figure 2.17 La reconnaissance de l'EPCR-LBPA par les aPLs favorise l'auto-immunité[100].

Le récepteur de la protéine C endothéliale (EPCR) reconnaissant des lipides comme l'acide lysobisphophatidique (LBPA) a récemment été identifié comme une cible cellulaire des aPL. Comme l'illustre la Figure 2.17, la fixation des aPL au LBPA entraine le recrutement de la sphingomyélinase acide (ASM) à la surface cellulaire des monocytes, suivi de l'internalisation de ces aPL dans les endosomes tardifs et de la dissociation du complexe FT-TPFI (Tissue Factor of Pathway Inhibitor), induisant l'activation de la coagulation. Cette voie de signalisation est responsable du développement de l'auto-immunité puisqu'elle déclenche la

sécrétion d'interféron α dépendante des TLR7 dans les cellules dendritiques qui, à leur tour, favorisent l'expansion des cellules B1a productrices d'aPL. Ainsi, la signalisation de l'EPCR contribue aux évènements thrombotiques ainsi qu'au développement de l'auto-immunité dans le SAPL.

In vivo, des modèles murins ProcrC/S caractérisés par une mutation du résidu cystéine intracellulaire de l'EPCR ont montré l'abolition du trafic endosomal de l'aPL et de la signalisation proinflammatoire via l'IFNα dans les cellules immunitaires innées. En effet, cette mutation est à l'origine d'un défaut dans la capacité d'échange de la phosphatidylcholine, structurellement liée à l'EPCR, avec le LBPA. Les souris ProcrC/S ou les souris traitées avec un anticorps bloquant l'EPCR-LBPA sont protégées contre la thrombose induite par l'aPL et les pertes fœtales[100]. De plus, un modèle expérimental de SAPL représenté par des souris TLR7(-/-) et ProcrC/S atteintes d'un LED a montré que le blocage de la signalisation EPCR-LBPA est suffisant pour empêcher la prolifération des cellules B1a à l'origine de la synthèse d'aPL et d'autres auto-Ac associés au lupus. Ces premières données indiquent que les aLBPA sont des marqueurs biologiques qui pourraient permettre de mieux évaluer le risque thrombotique dans le SAPL.

2.4.2 Les auto-anticorps anti-acide lysobisphosphatidique

Alessandri *et al.*[93] ont montré pour la première fois que les taux d'auto-anticorps aLBPA sont significativement plus élevés chez les patients atteints d'un SAPL par rapport aux patients porteurs d'un LED et aux sujets témoins (Figure 2.18). Une autre étude[207] portant sur l'évaluation de la valeur diagnostique des aLBPA chez les patients atteints de SAPL primaire a montré une prévalence significative des IgG aLBPA dans le SAPL primaire par rapport à un groupe contrôle, avec une sensibilité de 58,6% et une spécificité de 92,9%. De même, les IgM aLBPA ont montré une association significative avec le groupe de patients porteurs d'un SAPL primaire par rapport au groupe contrôle, bien qu'ils aient une sensibilité plus faible de 28,6% mais une spécificité très élevée de 97,1%. De ce fait, les aLBPA ont une spécificité pour le SAPL similaire à celle des aB2GP1 mais inférieure au LA. En revanche, leur sensibilité est meilleure que le LA mais est plus faible que celle des aCL et des aB2GP1, limitant l'utilisation de l'aLBPA comme un outil diagnostique biologique supplémentaire dans le SAPL. Concernant l'utilité clinique de la détection de l'aLBPA dans le pronostic du SAPL, celle-ci reste à analyser dans de larges études longitudinales. En effet, comme l'indique la Figure 2.19, une association

étroite entre la positivité du LA, constituant un profil à haut risque de thrombose, et l'aLBPA a été détectée (p=0,0018)[93].

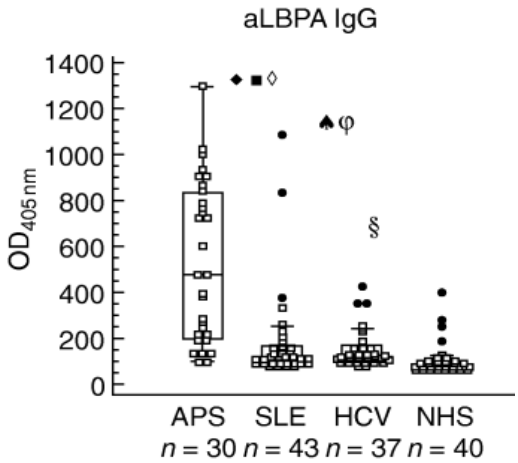


Figure 2.18 Quantification des auto-anticorps IgG se liant au LBPA par ELISA chez les patients atteints de SAPL, les patients atteints de LED, les patients porteurs du VHC et les témoins normaux (NHS)[93].

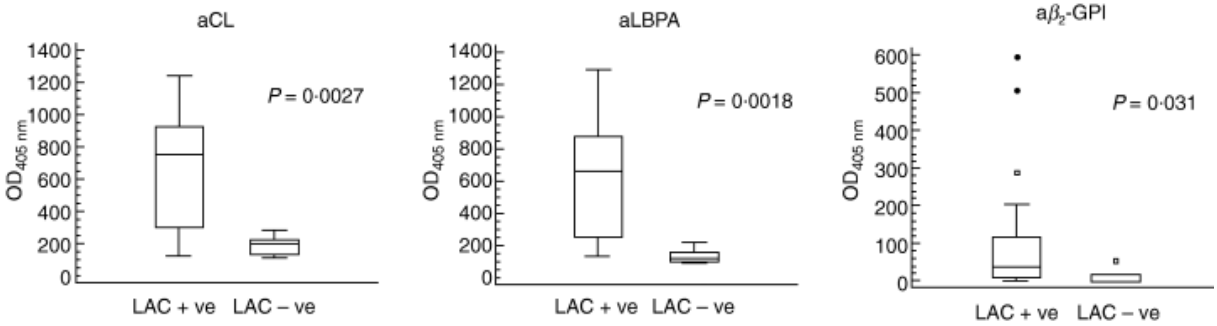


Figure 2.19 Quantification des auto-anticorps aCL, aLBPA et aB2GP1 par ELISA chez des patients regroupés selon la positivité du LA.

Alessandri *et al*. ont également mené une étude de liaison comparative pour rechercher si les cofacteurs protéiques tels que la B2GP1 intervenaient, au moins en partie, dans la liaison des anticorps au LBPA. Les résultats ont montré que la B2GP1 se lie au LBPA avec une affinité seulement quatre fois inférieure à celle obtenue pour la liaison de la B2GP1 à la cardiolipine[208]. Ceci rend compte qu'il existe, de manière similaire aux aCL, des aLBPA capables de réagir avec le LBPA seul ou complexé à la B2GP1. La Figure 2.20 montre une corrélation positive significative entre la réactivité des aB2GP1 et des aCL avec les aLBPA d'isotype IgG. Ceci explique que les anticorps qui se fixent directement ou indirectement à la cardiolipine se lient également au LBPA et prouve que la β2GP1, une protéine fondamentale dans le déclenchement de la thrombose, peut médier la liaison des aLBPA. Ces observations permettent de supposer que certains aCL reconnaissent ou pas le LBPA, expliquant la plus faible sensibilité des aLBPA

par rapport aux aCL et soulevant la question d'une pathogénicité des aCL dépendante de leur cible antigénique, le LBPA.

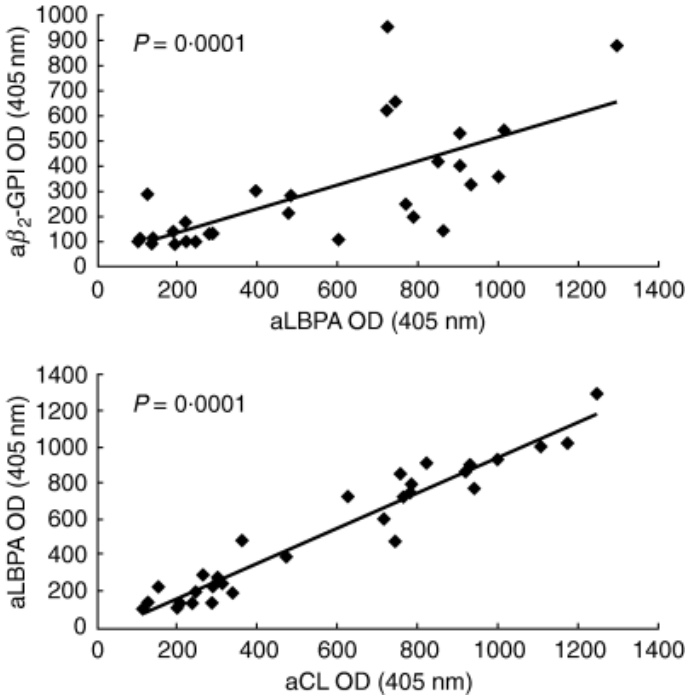


Figure 2.20 Analyse de corrélation entre la réactivité des aB2GP1, aCL et aLBPA IgG dosés par ELISA chez les patients atteints de SAPL.

Dernièrement, Hollerbach *et al.*[209] ont mis en évidence une prévalence des IgG aLBPA chez 45% des patients hospitalisés pour la COVID-19, une coagulopathie également associée à la présence d'aPL, par rapport à des témoins sains. De plus, ils ont démontré que l'aLBPA produit par les cellules B1a était associé à la gravité et à la mortalité du COVID-19, suggérant que cet aPL est un marqueur de gravité clinique dans la coagulopathie associée au COVID-19.

Dans l'ensemble, ces données reflètent que les aLBPA représentent un marqueur biologique du SAPL avec une sensibilité et une spécificité similaires à l'aB2GP1 et sont fortement associés à la présence d'un LA, suggérant leur effet pathogène. Toutefois, aucune étude n'a été réalisée sur l'association entre la présence d'aLBPA et les manifestations cliniques chez les patients atteints de SAPL.

Pour conclure, le caractère hétérogène, tant clinique que biologique, du SAPL rend son diagnostic difficile. De plus, bien que la plupart des études aient montré des profils biologiques d'aPL conventionnels associés à un haut risque de récidive thrombotique, toutes les études ne sont pas unanimes. Dès lors, d'autres propositions sont à étudier pour identifier en routine les patients porteurs d'un SAPL à haut risque de thrombose. Parmi elles, l'étude de la N-glycosylation des aPL est un test prometteur puisque plusieurs travaux ont montré qu'un faible taux de sialylation, de fucosylation ou encore de galactosylation des IgG augmente l'activité pro-inflammatoire des aPL, à l'origine de thromboses. D'autre part, la mesure en routine des NETs et des anticorps anti-NETs dans le sérum offrirait une valeur pronostique supplémentaire dans la gravité du SAPL. Enfin, l'identification de nouvelles cibles antigéniques impliquées dans la physiopathologie du SAPL ont permis de découvrir d'autres aPL non conventionnels, les aLBPA, dont la relevance clinique pourrait permettre de discerner les patients porteurs d'un SAPL à haut risque de récidive thrombotique.

DEUXIÈME PARTIE : ÉVALUATION DES AUTO-ANTICORPS ANTI-LBPA DANS LA GRAVITÉ DU SAPL

1 INTRODUCTION

D'après la revue de la littérature réalisée dans la première partie de cette thèse, le critère le plus reconnu aujourd'hui pour définir la gravité du SAPL est la triple positivité des aPL, définie par la présence simultanée des trois aPL conventionnels (aCL, aB2GP1, LA). Or, dans une étude récente[168], nous avons montré l'absence de différence du nombre d'évènements thrombotiques ou de complications obstétricales et de la récidive de ces évènements, entre des patients symptomatiques TP et SP pour l'aCL, en l'absence de traitement. Par conséquent, cette étude nous permet de suggérer que d'autres facteurs sont aujourd'hui indispensables à proposer aux cliniciens pour confirmer la gravité du SAPL, définie par le risque de récidive, afin d'adapter au mieux la prise en charge thérapeutique. De plus, les aPL sont reconnus hétérogènes tant dans leur réactivité (isolée ou associée) que dans leur structure. En effet, les aCL reconnaissent également le complexe LBPA-EPCR, puisque le LBPA est structurellement apparenté à la cardiolipine, et déclenchent l'activation de la coagulation associée à la production de ROS et de NETs. Notons que l'association des aLBPA à la gravité d'une coagulopathie associée à la présence d'aPL a déjà été démontrée dans le cas de la COVID-19.

L'ensemble de ces données nous a conduit à émettre l'hypothèse que la pathogénicité des aPL pouvait être fonction de leur cible antigénique. Ainsi, les aCL détectés pourraient ou non se fixer au LBPA, ce qui conditionnerait leur pathogénicité dans le SAPL. Les aLBPA pourraient donc constituer un nouveau marqueur biologique de gravité du SAPL.

2 OBJECTIFS

L'objectif principal de notre étude est d'évaluer la valeur clinique d'un aCL en fonction de sa réactivité pour le LBPA afin d'identifier, au sein des aCL, les aCL « pathogènes ».

Pour cela, nous avons constitué une cohorte de patients atteints de SAPL, cliniquement documentés, et porteurs d'aCL persistants, puis nous rechercherons les aLBPA dans les sérums

de ces patients, après avoir mis au point la technique de dosage des aLBPA. Enfin, ces résultats nous permettront d'analyser les profils cliniques associés au profil biologique des aPL, notamment en fonction de la présence ou de l'absence d'aLPBA.

Ce travail nous permettra de rechercher une potentielle association entre ces aLBPA et la gravité du SAPL, qui se caractérise par la récurrence des évènements thrombotiques et/ou obstétricaux qui seront recensés pour chaque patient de la cohorte, puisque les thromboses sévères constituent la première cause de mortalité de cette pathologie.

3 MATERIELS ET METHODES

3.1 POPULATION ETUDIEE

Nous avons constitué une cohorte de patients porteurs d'un SAPL cliniquement documenté, comprenant le nombre et les caractéristiques en termes de **récurrence** et de type d'évènements cliniques associés au SAPL, et **positifs pour les aCL de manière persistante** et soit isolée, soit dans le cadre d'une double ou d'une triple positivité.

Cette cohorte a été conçue à partir des résultats d'analyses de tous les patients dépistés pour la recherche d'aCL IgG/ IgM, de LA et d'aB2GP1 IgG/IgM au CHU de Marseille entre juillet 2021 et janvier 2022 (n = 3394). Ces tests ont été prescrits en raison d'une suspicion ou de la présence d'une maladie auto-immune, d'antécédents de thromboses et/ou de complications obstétricales. La plupart des demandes provenaient du service de Médecine Interne (61%) et du Centre d'Exploration des pathologies Hémorragiques et Thrombotiques (CEHT, 14%) du CHU de Marseille (Figure 3.1).

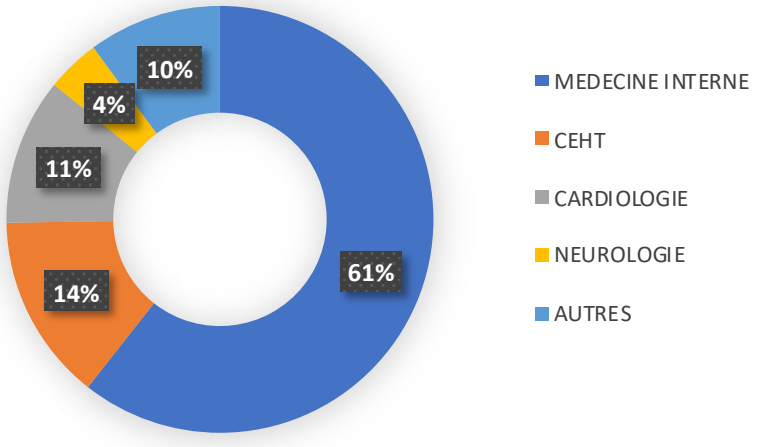


Figure 3.1 Répartition des principaux services prescripteurs d'aPL.

3.2 RECUEIL DES DONNEES

Le recueil des données biologiques concernant les aPL (aCL IgG et IgM, aB2GP1 IgG et IgM, LA), effectué grâce au système de gestion de l'information du laboratoire (SIL) a permis d'isoler 416 patients positifs sur un prélèvement pour les aCL à partir des 3394 patients dépistés. Les critères d'exclusion suivants ont ensuite été appliqués : un âge inférieur à 18 ans, la non persistance des aPL chez les patients présentant une maladie infectieuse et les dossiers cliniques incomplets. Le profil triple positif pour les aPL a été défini par l'association d'un LA positif, d'un aCL positif (IgG et/ou IgM) et d'un aB2GP1 positif (IgG et/ou IgM). Le profil double positif a été défini par la présence d'un aCL (IgG et/ou IgM) et d'un autre aPL conventionnel, un LA ou un aB2GP1 (IgG et/ou IgM). Le profil simple positif a été défini par la présence isolée d'un aCL (IgG et/ou IgM). La persistance de tous les aPL a été testée sur un deuxième prélèvement réalisé à 12 semaines d'intervalle par les mêmes techniques de laboratoire. Tous les échantillons de sérum de cette étude rétrospective faisaient partie d'une Biobanque déclarée (DC 2012_1704) conformément aux directives éthiques. Cette étude a été approuvée et enregistrée par l'Assistance Publique des Hôpitaux de Marseille (sous le numéro GDPR 2019-146) et répondait aux exigences locales en termes de collecte de données, de consentement des patients et de protection des données.

Le recueil des données cliniques a été réalisé de manière rétrospective pour chaque patient, en recensant les paramètres démographiques (âge, sexe), les antécédents d'évènements thrombotiques veineux et/ou artériels et de complications obstétricales, les maladies auto-immunes associées, les thrombophilies héréditaires, les facteurs de risque cardio-vasculaires ainsi que les traitements anticoagulants. A propos des évènements thrombotiques, la localisation et la récurrence des thromboses veineuses profondes, artérielles ou microcirculatoires ont été recensées. Les évènements thrombotiques artériels comprenaient les AIT, les AVC ou tout autre évènement aigu impliquant le système vasculaire artériel. Les évènements thrombotiques veineux étaient représentés par les TVP, les embolies pulmonaires ou tout autre évènement aigu impliquant le système vasculaire veineux. Tous les événements thrombotiques ont été confirmés objectivement à l'aide de techniques pertinentes. Les complications obstétricales ont été recueillies selon les critères de définition de Sydney qui comprennent : un ou plusieurs décès inexpliqués d'un fœtus morphologiquement normal à la 10ème SA ou au-delà, une ou plusieurs naissances prématurées avant la 34 SA en raison d'une pré-éclampsie, éclampsie ou d'une insuffisance placentaire, au moins trois fausses couches

spontanées inexpliquées avant la 10ème SA. Un évènement clinique a été considéré comme récurrent lorsque le nombre d'évènements cliniques était supérieur ou égal à 2.

3.3 METHODES DE DOSAGE

Parmi les données biologiques recueillies concernant les aPL, les IgG et IgM aCL ont été déterminées dans le laboratoire d'immunologie du CHU de Marseille (Hôpital de la Conception) à l'aide de kits ELISA CARDIO-LISA® commercialisés par THERADIAG sur des prélèvements sériques. Le seuil de positivité des aCL était de 15 U/mL pour les deux isotypes, calculé en utilisant le 99ème percentile des résultats obtenus sur 100 donneurs sains. Les aB2GP1 IgG et IgM ont été mesurés sur des prélèvements sériques à l'aide de kits ELISA commercialisés par ORGENTEC utilisant de la β2GP1 purifiée avec un seuil de positivité fixé à 8 U/ML pour les deux isotypes, correspondant au 99ème percentile des résultats obtenus sur 100 donneurs sains. Le LA a été déterminé dans le laboratoire d'hématologie du CHU de Marseille (Hôpital de la Timone) sur des prélèvements plasmatiques grâce à deux tests de coagulation conformément aux recommandations de 2009 de l'ISTH : le PTT-LA (Diagnostica Stago) et le dRVVT (STA-Staclot® DRVV screen et STA-Staclot® DRVV confirm). Le LA a été recherché selon une procédure en trois étapes comprenant le dépistage, le mélange et la confirmation. L'indice de Rosner (IR) a été calculé pour évaluer le PTT-LA et a été admis comme positif lorsque l'IR était strictement supérieur à 15. Les résultats du DRVVT ont été exprimés par un rapport normalisé (RN) considéré comme positif si le RN était strictement supérieur à 1,2.

Concernant le dosage des aLBPA, leur mesure nécessite la mise au point d'une technique manuelle ELISA qui fera l'objet de mon mémoire de DES. Des expériences de double élution nous permettront de confirmer la fixation spécifique d'aCL/ LBPA.

3.4 ANALYSE STATISTIQUE

L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du logiciel GraphPad Prism version 6.0. Les variables quantitatives ont été comparées par le test *t* de Student et les variables qualitatives par le test du χ^2 (test de Fisher en cas d'effectifs faibles). Pour tous les tests, le seuil de signification statistique a été fixé à $p = 0,05$.

4 RESULTATS

4.1 DESCRIPTION DE LA COHORTE

D'après les critères de sélection établis précédemment, nous avons obtenus une cohorte de 99 patients présentant un aCL persistant, dont 46 patients **simple positifs** pour l'aCL, 20 patients **double positifs** dont un aCL et un autre aPL conventionnel et 33 patients **triple positifs** (Figure 3.2). Pour étudier la réactivité des aCL pour le LBPA, un groupe contrôle a été isolé en parallèle à partir de sujets ayant un profil d'aPL négatif pour les aCL (n = 21), en présence (n=9) ou en l'absence (n=12) d'autres aPL conventionnels.

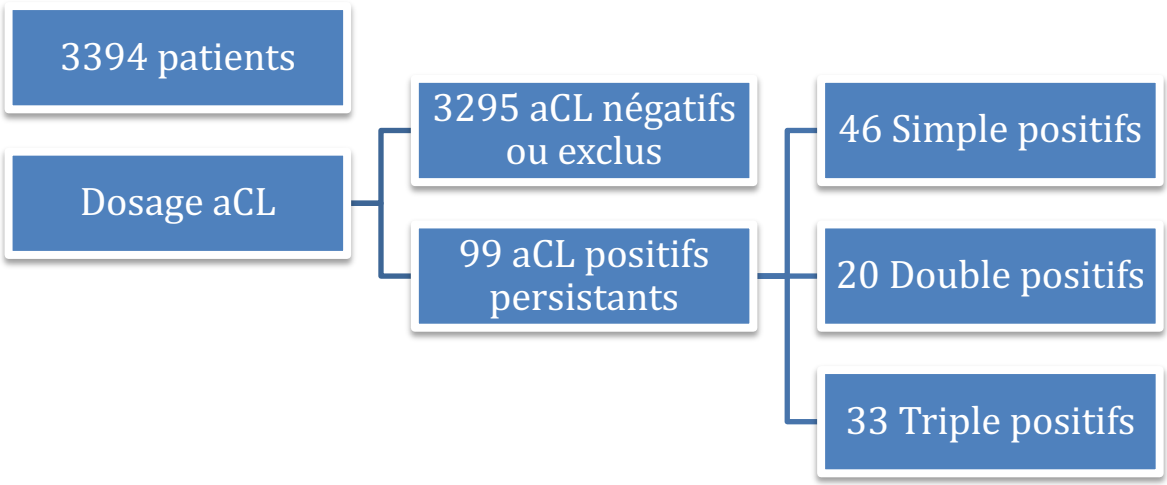


Figure 3.2 Organigramme de la sélection des patients constituant la cohorte. La persistance a été définie par la présence de l'aCL à deux reprises, à au moins 12 semaines d'intervalles. Les patients ont été classés en fonction du profil d'aPL dit « simple positif » en présence d'un aCL isolé, « double positif » en présence d'un aCL et d'un autre aPL conventionnel et « triple positif » en présence simultanée d'un aCL, d'un aB2GP1 et d'un LA.

4.2 ANALYSE DES CARACTERISTIQUES CLINIQUES DE LA COHORTE

Au niveau **démographique**, cette cohorte de patients porteurs d'un SAPL avec aCL persistant (n=99) est composée de 70 femmes et de 29 hommes (sex-ratio = 2,41), âgés de 18 à 81 ans avec une moyenne d'âge de 47,3 ans.

Concernant les caractéristiques cliniques, les patients présentant au moins un évènement clinique associé au SAPL ont été rassemblés dans le groupe **« SAPL symptomatique** » (n=61). A l'inverse, les patients porteurs d'aPL conventionnels persistants en l'absence de critères cliniques du SAPL ont été classés dans le groupe « **SAPL asymptomatique** » (n=38).

Le Tableau 3.1 représente l'ensemble des caractéristiques démographiques et cliniques recensés dans la cohorte (aCL positif), elle-même divisée en deux groupes de patients selon la présence (SAPL symptomatique) ou l'absence (SAPL asymptomatique) d'évènements cliniques, ainsi que dans le groupe contrôle (aCL négatif).

Variable	SAPL symptomatique (n=61)	SAPL asymptomatique (n=38)	Groupe contrôle aCL négatifs (n=21)
Genre			
Femme	38 (62,3%)	32 (84,2%)	15 (71,4%)
Homme	23 (37,7%)	6 (15,8%)	6 (28,6%)
Âge (au prélèvement)	50,39 ± 13,82	42,39 ± 15,88	47,24 ± 13,95
Âge (au premier évènement clinique)	42,76 ± 15,08	X	43,29 ± 15,24
Thrombose (T)			
Veineuse	30 (49,2%)	0	3 (14,3%)
Artérielle	13 (21,3%)	0	2 (9,52%)
Veineuse + Artérielle	4 (6,5%)	0	0 (0%)
Complications obstétricales (CO)	17 (44,7%)	0	2 (13,3%)
Récurrence (gravité)			
Nb moyen de T	1,29 ± 1,26	0	0,33 ± 0,66
Nb moyen de CO	1,11 ± 1,94	0	0,33 ± 1,05
Nb moyen de T + CO	2,02 ± 1,57	0	0,57 ± 1,03

Tableau 3.1 Caractéristiques démographiques et cliniques de la cohorte (n=99) de patients porteurs d'un SAPL symptomatique ou asymptomatique et de témoins sains.

Au total, 61,6% des patients porteurs d'un aCL persistant ont présenté au moins un évènement clinique (SAPL symptomatique), contre 33,3% chez les sujets du groupe contrôle (aCL négatif), ce qui démontre la valeur clinique des aCL dans le SAPL. Concernant l'analyse des manifestations cliniques dans le groupe « SAPL symptomatique », près de la moitié (49,2%) de ces patients ont eu au moins une thrombose veineuse isolée, contre 21,3% pour les thromboses artérielles, et 6,5% ont eu à la fois une thrombose veineuse et artérielle. Quant aux complications obstétricales, elles sont survenues chez 44,7% des patientes symptomatiques.

Enfin en termes de **gravité**, les données cliniques recueillies auprès de tous les patients de la cohorte ont révélé que parmi les 61,6 % des patients porteurs d'un SAPL symptomatique et positifs pour les aCL de manière persistante, plus de la moitié (50,8%) avaient des évènements cliniques récurrents (>2), soit 31,3% des patients de la cohorte. Par comparaison, 14,3% des sujets du groupe contrôle (aCL négatif) avaient des évènements cliniques récurrents.

4.3 ANALYSE DES CARACTERISTIQUES BIOLOGIQUES DE LA COHORTE

4.3.1 REPARTITION DES PATIENTS EN FONCTION DU PROFIL D'ACL

L'analyse des profils d'aPL portera exclusivement sur les aCL. Pour cela, les patients de la cohorte ont été divisés en trois groupes en fonction du nombre d'aPL positifs et persistants associés aux aCL : un groupe de patients simple positif pour l'aCL (SP), un groupe de patients double positifs (DP) dont au moins un aCL et un groupe de patients triple positifs (TP), représentés dans le Tableau 3.2.

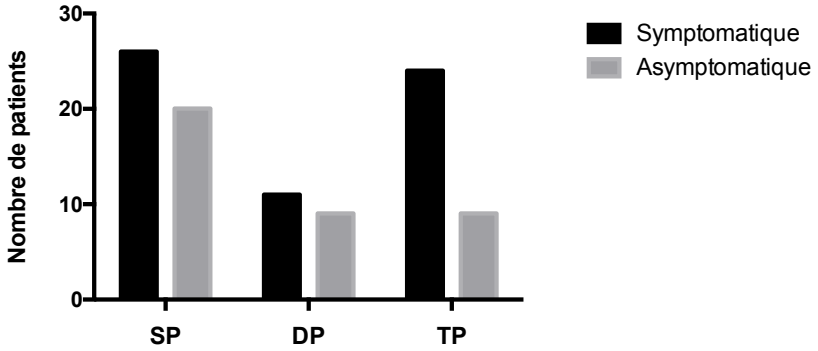


Figure 3.3 Répartition des profils cliniques symptomatiques ou asymptomatiques des patients de la cohorte (n=99) en fonction des profils biologiques SP (simple positif), DP (double positif) et TP (triple positif) des aCL.

Cette analyse n'a pas montré de différence significative entre les différents profils d'aCL (SP/DP p=1,00 ; SP/TP p=0,1622 ; DP/TP p=0,2370) pour la présence ou l'absence de manifestation clinique, quel que soit le type d'évènement thrombotique ou obstétrical et la localisation veineuse ou artérielle (Figure 3.3). On observe toutefois une tendance à ce que les patients TP soient plus symptomatiques (dans 72,7% des cas) que les patients SP et DP (dans respectivement 56,5% et 55% des cas), cette différence étant probablement non significative du fait de la faible taille des échantillons. En revanche, parmi les sujets symptomatiques, il y a autant de sujets porteurs d'un profil SP (42,6%) que TP (39,3%), ce qui peut s'expliquer par la faible prévalence de la TP au sein des patients atteints d'un SAPL. Ainsi, la TP est un marqueur intéressant pour déterminer les patients à haut risque thrombotique, bien que non significatif dans notre cohorte, mais insuffisant pour identifier à lui seul les patients à haut risque

thrombotique. Il est donc nécessaire de rechercher d'autres marqueurs biologiques de gravité du SAPL pour ne pas sous-estimer le risque thrombotique chez les patients SP et DP.

Variable	Profil simple positif (SP) (n=46)	Profil double positif (DP) (n=20)	Profil triple positif (TP) (n=33)
Genre			
Femme	34 (73,9%)	12 (60%)	24 (72,7%)
Homme	12 (26,1%)	8 (40%)	9 (27,3%)
Âge (au prélèvement)	43,67 ± 14,63	46,85 ± 16,03	52,70 ± 13,94
Âge (au premier évènement clinique)	43,22 ± 14,19	41,33 ± 16,18	42,87 ± 17,13
Profil clinique			
Symptomatique (SYM)	**26 (56,5%)**	**11 (55%)**	**24 (72,7%)**
Asymptomatique (ASY)	20 (43,5%)	9 (45%)	9 (27,3%)
Taux moyen d'aCL			
IgG (GPL/ml)	23,91 ± 9,65	27,0 ± 18,83	91,91 ± 154,22
IgM (MPL/ml)	8,02 ± 11,84	14,69 ± 14,47	16,85 ± 17,32
Thrombose (T)			
veineuse	12 (26,1%)	7 (35,0%)	11 (33,3%)
artérielle	6 (13,0%)	2 (10,0%)	5 (15,2%)
veineuse + artérielle	1 (2,17%)	1 (5%)	2 (6,06%)
Complications obstétricales (CO)	8 (23,5%)	1 (8,33%)	8 (33,3%)
Récurrence (gravité) chez les SYM			
Nb moyen de T	1,20 ± 1,22	1 ± 0,47	1,50 ± 1,50
Nb moyen de CO	2,07 ± 2,71	0,40 ± 0,89	0,47 ± 0,62
Nb moyen de T + CO	2,44 ± 1,96	1,20 ± 0,42	1,91 ± 1,28

Tableau 3.2 Caractéristiques démographiques, cliniques et biologiques de la cohorte (n=99) en fonction du profil biologique SP (simple positif), DP (double positif) et TP (triple positif) pour les aCL.

De plus, il n'existe pas de différence significative pour la **récurrence** des évènements thrombotiques vasculaires entre les trois profils d'aCL (SP/DP p=0,1970 ; SP/TP p=0,4533 ; DP/TP p=0,0949). En terme de complications obstétricales, elles sont

significativement plus récurrentes chez les SP que les TP (p=0,0135). En revanche, il serait plus pertinent d'étudier le nombre d'évènements cliniques en dehors de la présence d'un traitement anticoagulant à long terme. Dans notre cohorte, le nombre de patients TP symptomatique non traité étant très limité (n=1), les résultats obtenus n'auraient pas de signification.

Concernant les **titres d'aCL**, les aCL sont significativement plus élevés chez les TP que les SP pour les isotypes IgG (p=0,0037) et IgM (p=0,0087) (Figure 3.4). Il n'existe pas de différence significative pour les taux d'aCL d'isotype IgM et IgG entre les SP/ DP et les DP/ TP. De plus, il n'existe pas de différence significative pour la présence ou l'absence de manifestation clinique entre les taux moyens d'aCL d'isotype IgG et IgM, quel que soit le type d'évènement thrombotique ou obstétrical, sa localisation veineuse ou artérielle et sa récurrence.

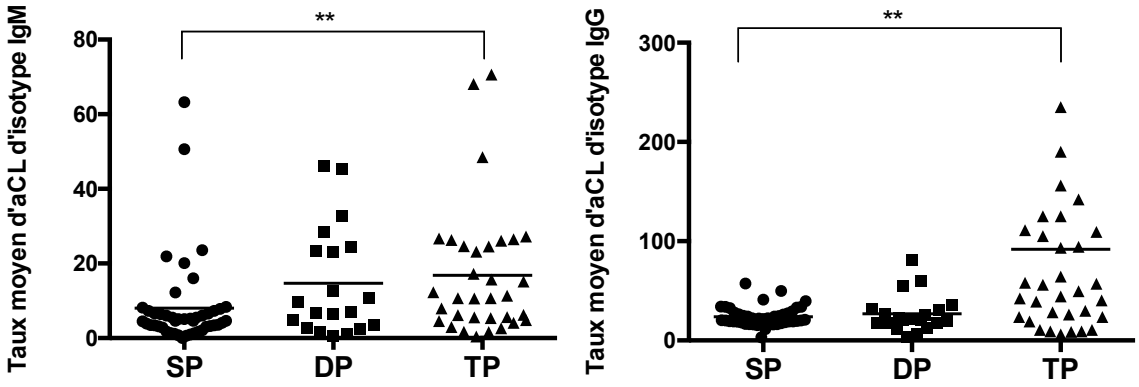


Figure 3.4 Titres moyens d'aCL pour les isotypes IgM et IgG chez les patients de la cohorte (n=99) en fonction du profil biologique SP (simple positif), DP (double positif) et TP (triple positif) pour les aCL.

4.3.2 Repartition des patients en fonction du profil d'aLBPA

Dans notre cohorte, le titre d'aCL n'est pas relié à la récurrence des évènements cliniques. Toutefois, l'étude de la pathogénicité de l'aCL en fonction de sa réactivité pour le LBPA reste pertinente dans le but d'identifier un nouveau marqueur biologique de récurrence clinique dans le SAPL : les aLBPA.

C'est pourquoi, le dosage des aLBPA dans les sérums des patients de cette cohorte, après mise au point de la technique de détection, permettra de rechercher une éventuelle association entre ces aLBPA et la gravité du SAPL, définie par la récurrence des évènements cliniques. Les résultats de cette étude qui vise à établir la signification clinique des aLBPA dans la gravité SAPL seront présentés dans mon mémoire de DES.

CONCLUSION

Notre étude s'est portée sur l'identification de facteurs biologiques de gravité du SAPL, définie par la récurrence des évènements cliniques de type thrombotiques ou obstétricaux. Pour cela, une revue de la littérature a permis d'identifier des profils d'aPL associés à un haut risque de thrombose, telles que la présence d'un LA, la présence de titres élevés d'aPL ou bien la présence d'associations d'aPL conventionnels dont la triple positivité est aujourd'hui la plus décrite. Toutefois, une étude récente menée sur deux cohortes de patients porteurs d'un SAPL avec des profils d'aPL différents, l'une constituée de patients simple positifs pour les aCL et l'autre de patients triple positifs, n'a montré aucune différence significative entre les deux cohortes concernant la gravité du SAPL. Devant cette observation, une recherche de nouveaux facteurs biologiques de gravité a été initiée.

Le taux de N-glycosylation des aPL pourrait avoir un impact sur la gravité du SAPL puisque les patients porteurs d'un SAPL ont présenté des aPL hyposialylés, hypogalactosylés ou encore hypofucosylés par rapport aux porteurs asymptomatiques d'aPL.

De plus, la quantification des NETs, impliqués dans le processus d'immunothrombose, pourrait offrir une valeur pronostique en s'associant à la gravité du SAPL. Quant aux auto-anticorps dirigés contre les NETs détectés chez les patients porteurs d'un SAPL, ces derniers ont été associés à un risque plus élevé de récidives thrombotiques veineuses profondes.

Enfin, l'identification de nouvelles cibles antigéniques des aPL tel que le LBPA, complexé à l'EPCR situé à la surface des monocytes et reconnu par les aCL, a permis de suggérer que la pathogénicité des aCL dépende de leur réactivité pour le LBPA. Pour l'étudier, une cohorte de 99 patients porteurs d'un SAPL cliniquement documenté et porteurs d'au moins un aCL persistant parmi les aPL a été conçue. Le travail de mémoire de DES de Biologie Médicale qui suit cette thèse permettra déterminer d'une part si le dosage des aLBPA chez ces patients apporte un avantage pour l'identification de sous-groupes de patients à haut risque de thrombose, plaçant cet auto-anticorps comme un nouveau marqueur biologique prédictif de la sévérité clinique de la maladie. D'autre part, ce travail permettra d'évaluer si la pathogénicité des aCL dépend de leur réactivité pour le LBPA. En pratique clinique, l'intérêt est majeur puisque ce potentiel biomarqueur de gravité, les aLBPA, orienterait vers une prise en charge personnalisée en fonction du niveau individuel de risque thrombotique et soulèverait

notamment la question de l'instauration d'un traitement anticoagulant au long cours même en l'absence de triple positivité, le profil biologique à haut risque thrombotique le plus décrit dans les recommandations actuelles.

BIBLIOGRAPHIE

1. Wassermann, A., Neisser, A. & Bruck, C. Eine serodiagnostische Reaktion bei Syphilis. *Dtsch Med Wochenschr* 32, 745–746 (1906).

2. Moore, J. E. & Mohr, C. F. Biologically false positive serologic tests for syphilis; type, incidence, and cause. *J Am Med Assoc* 150, 467–473 (1952).

3. Conley et al. A hemorrhagic disorder caused by circulating anticoagulant in patients with disseminated lupus erythematosus – ScienceOpen.

4. Bowie, E. W., Thompson, J. H., Pascuzzi, C. A. & Owen, C. A. Thrombosis in systemic lupus erythematosus despite circulating anticoagulants. *The Journal of laboratory and clinical medicine* 62, 416–430 (1963).

5. Soulier, B. & Boffà, M. Recurrent abortion, thrombosis and circulating antithromboplastin type anticoagulant. *La Nouvelle Presse Médicale* 9, 859–864 (1980).

6. Harris, E. N. *et al.* Anticardiolipin antibodies: detection by radioimmunoassay and association with thrombosis in systemic lupus erythematosus. *The Lancet* 322, 1211–1214 (1983).

7. Loizou, S. *et al.* Measurement of anti-cardiolipin antibodies by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): standardization and quantitation of results. *Clinical and experimental immunology* 62, 738 (1985).

8. Hughes, G. R. Thrombosis, abortion, cerebral disease, and the lupus anticoagulant. *Br Med J (Clin Res Ed)* 287, 1088–1089 (1983).

9. Harris, E. N. Clinical and serological features of the'antiphospholipid syndrome'. *Brit J Rheumatol* 26, 19 (1987).

10. Asherson, R. A. A 'primary' antiphospholipid syndrome? *J Rheumatol* 15, 1742–1746 (1988).

11. Galli, M. *et al.* Anticardiolipin antibodies (ACA) directed not to cardiolipin but to a plasma protein cofactor. *Lancet* 335, 1544–1547 (1990).

12. Bevers, E. M., Galli, M., Barbui, T., Comfurius, P. & Zwaal, R. F. A. Lupus Anticoagulant IgG's (LA) Are Not Directed to Phospholipids only, but to a Complex of Lipid-Bound Human Prothrombin. *Thromb Haemost* 66, 629–632 (1991).

13. de Laat, B., Mertens, K. & de Groot, P. G. Mechanisms of Disease: antiphospholipid antibodies—from clinical association to pathologic mechanism. *Nat Rev Rheumatol* 4, 192–199 (2008).

14. Wilson, W. A. *et al.* International consensus statement on preliminary classification criteria for definite antiphospholipid syndrome: report of an international workshop. *Arthritis Rheum* 42, 1309–1311 (1999).

15. Miyakis, S. *et al.* International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J Thromb Haemost* 4, 295–306 (2006).

16. Cervera, R. *et al.* Morbidity and mortality in the antiphospholipid syndrome during a 10-year period: a multicentre prospective study of 1000 patients. *Ann Rheum Dis* 74, 1011–1018 (2015).

17. Asherson, R. A. The catastrophic antiphospholipid syndrome. *J Rheumatol* 19, 508–512 (1992).

18. Gómez-Puerta, J. A. *et al.* Long-Term Follow-Up in 128 Patients With Primary Antiphospholipid Syndrome: Do They Develop Lupus? *Medicine* 84, 225–230 (2005).

19. Durcan, L. & Petri, M. Chapter 2 - Epidemiology of the Antiphospholipid Syndrome. in *Handbook of Systemic Autoimmune Diseases* (eds. Cervera, R., Espinosa, G. & Khamashta, M.) vol. 12 17–30 (Elsevier, 2017).

20. Cervera, R., Boffa, M.-C., Khamashta, M. A. & Hughes, G. R. V. The Euro-Phospholipid project: epidemiology of the antiphospholipid syndrome in Europe. *Lupus* 18, 889–893 (2009).

21. Rodríguez-Pintó, I., Espinosa, G. & Cervera, R. Catastrophic APS in the Context of Other Thrombotic Microangiopathies. *Curr Rheumatol Rep* 17, 3 (2015).

22. Rodríguez-Pintó, I. *et al.* Catastrophic antiphospholipid syndrome (CAPS): Descriptive analysis of 500 patients from the International CAPS Registry. *Autoimmun Rev* 15, 1120–1124 (2016).

23. Sebastiani, G. D., Iuliano, A., Cantarini, L. & Galeazzi, M. Genetic aspects of the antiphospholipid syndrome: An update. *Autoimmunity Reviews* 15, 433–439 (2016).

24. Constantin, A., Cantagrel, A., Laroche, M. & Mazières, B. *Rhumatologie pour le praticien*. (Elsevier Health Sciences, 2018).

25. Espinosa, G., Cervera, R., Font, J. & Asherson, R. A. The lung in the antiphospholipid syndrome. *Annals of the Rheumatic Diseases* 61, 195–198 (2002).

26. Ghosh, S., Walters, H. D., Joist, J. H., Osborn, T. G. & Moore, T. L. Adult respiratory distress syndrome associated with antiphospholipid antibody syndrome. *J Rheumatol* 20, 1406–1408 (1993).

27. Howe, H. S., Boey, M. L., Fong, K. Y. & Feng, P. H. Pulmonary haemorrhage, pulmonary infarction, and the lupus anticoagulant. *Ann Rheum Dis* 47, 869–872 (1988).

28. Cucurull, E. *et al.* [Pulmonary thromboendarterectomy in a patient with primary antiphospholipid syndrome. *Med Clin (Barc)* 106, 498–500 (1996).

29. Moyssakis, I. *et al.* Libman-Sacks Endocarditis in Systemic Lupus Erythematosus: Prevalence, Associations, and Evolution. *The American Journal of Medicine* 120, 636–642 (2007).

30. Lee, J. L., Naguwa, S. M., Cheema, G. S. & Gershwin, M. E. Revisiting Libman–Sacks Endocarditis: A Historical Review and Update. *Clinic Rev Allerg Immunol* 36, 126–130 (2009).

31. Soltész, P., Szekanecz, Z., Kiss, E. & Shoenfeld, Y. Cardiac manifestations in antiphospholipid syndrome. *Autoimmun Rev* 6, 379–386 (2007).

32. Djokovic, A. *et al.* Cardiac manifestations in primary antiphospholipid syndrome and their association to antiphospholipid antibodies' types and titers—cross-sectional study of Serbian cohort. *Clin Rheumatol* (2022)

33. Sherer, Y. & Shoenfeld, Y. Mechanisms of disease: atherosclerosis in autoimmune diseases. *Nat Clin Pract Rheumatol* 2, 99–106 (2006).

34. Uthman, I. & Khamashta, M. Antiphospholipid syndrome and the kidneys. *Semin Arthritis Rheum* 35, 360–367 (2006).

35. Asherson, R. A. *et al.* Catastrophic antiphospholipid syndrome: international consensus statement on classification criteria and treatment guidelines. *Lupus* 12, 530–534 (2003).

36. Alijotas-Reig, J. *et al.* The European Registry on Obstetric Antiphospholipid Syndrome (EUROAPS): A survey of 247 consecutive cases. *Autoimmun Rev* 14, 387–395 (2015).

37. Andreoli, L. *et al.* EULAR recommendations for women's health and the management of family planning, assisted reproduction, pregnancy and menopause in patients with systemic lupus erythematosus and/or antiphospholipid syndrome. *Ann Rheum Dis* 76, 476–485 (2017).

38. Le Thi Huong, D. *et al.* The second trimester Doppler ultrasound examination is the best predictor of late pregnancy outcome in systemic lupus erythematosus and/or the antiphospholipid syndrome. *Rheumatology (Oxford)* 45, 332–338 (2006).

39. Practice bulletin #33: diagnosis and management of preeclampsia and eclampsia. *ResearchGate* doi:10.1016/S0029-7844(01)01747-1.

40. Mekinian, A. *et al.* European registry of babies born to mothers with antiphospholipid syndrome. *Ann Rheum Dis* 72, 217–222 (2013).

41. Martinez-Zamora, M. A. *et al.* Risk of thromboembolic events after recurrent spontaneous abortion in antiphospholipid syndrome: a case-control study. *Ann Rheum Dis* 71, 61–66 (2012).

42. Francès, C. *et al.* Dermatologic manifestations of the antiphospholipid syndrome: Two hundred consecutive cases. *Arthritis & Rheumatism* 52, 1785–1793 (2005).

43. Francès, C. *et al.* Sneddon syndrome with or without antiphospholipid antibodies. A comparative study in 46 patients. *Medicine (Baltimore)* 78, 209–219 (1999).

44. Ruiz-Irastorza, G., Crowther, M., Branch, W. & Khamashta, M. A. Antiphospholipid syndrome. *The Lancet* 376, 1498–1509 (2010).

45. Krause, I. *et al.* The association of thrombocytopenia with systemic manifestations in

the antiphospholipid syndrome. *Immunobiology* 210, 749–754 (2005).

46. Rottem, M. *et al.* Autoimmune hemolytic anaemia in the antiphospholipid syndrome. *Lupus* 15, 473–477 (2006).

47. Presotto, F., Fornasini, F., Betterle, C., Federspil, G. & Rossato, M. Acute adrenal failure as the heralding symptom of primary antiphospholipid syndrome: report of a case and review of the literature. *European Journal of Endocrinology* 153, 507–514 (2005).

48. Espinosa, G. *et al.* Budd-Chiari Syndrome Secondary to Antiphospholipid Syndrome: Clinical and Immunologic Characteristics of 43 Patients. *Medicine* 80, 345–354 (2001).

49. Tektonidou, M. G. & Moutsopoulos, H. M. Osteoarticular Manifestations of Antiphospholipid Syndrome. in *Hughes Syndrome: Antiphospholipid Syndrome* (ed. Khamashta, M. A.) 127–139 (Springer, 2006).

50. Pengo, V. *et al.* Update of the guidelines for lupus anticoagulant detection. Subcommittee on Lupus Anticoagulant/Antiphospholipid Antibody of the Scientific and Standardisation Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. *J Thromb Haemost* 7, 1737–1740 (2009).

51. Sanmarco, M. Les autoanticorps anti-phospholipides sont devenus bien hétérogènes. *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée* 26, 47–54 (2011).

52. San Marco, M. Exploration biologique des anticorps anti-phospholipides. *GEAI'info* 4, 11_17 (2001).

53. Masson, E. Le syndrome des antiphospholipides (SAPL): Aspects cliniques, diagnostiques et thérapeutiques.

54. Deguchi, H., Fernandez, J. A., Hackeng, T. M., Banka, C. L. & Griffin, J. H. Cardiolipin is a normal component of human plasma lipoproteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97, 1743–1748 (2000).

55. Pangborn, M. C. Isolation and purification of a serologically active phospholipid from beef heart. *Journal of biological chemistry* 143, 247–56 (1942).

56. Matsuura, E. *et al.* Heterogeneity of anticardiolipin antibodies defined by the anticardiolipin cofactor. *The Journal of Immunology* 148, 3885–3891 (1992).

57. Galli, M. *et al.* Anticardiolipin antibodies (ACA) directed not to cardiolipin but to a plasma protein cofactor. *The Lancet* 335, 1544–1547 (1990).

58. McNeil, H. P., Simpson, R. J., Chesterman, C. N. & Krilis, S. A. Anti-phospholipid antibodies are directed against a complex antigen that includes a lipid-binding inhibitor of coagulation: beta 2-glycoprotein I (apolipoprotein H). *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 4120–4124 (1990).

59. Nash, M. J. *et al.* The anticardiolipin assay is required for sensitive screening for antiphospholipid antibodies. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2, 1077–1081 (2004).

60. Giannakopoulos, B., Passam, F., Ioannou, Y. & Krilis, S. A. How we diagnose the antiphospholipid syndrome. *Blood* 113, 985–994 (2009).

61. Harris, E. N. The Second International Anti-Cardiolipin Standardization Workshop/The Kingston Anti-Phospholipid Antibody Study (KAPS) Group. *American Journal of Clinical Pathology* 94, 476–484 (1990).

62. Pierangeli, S. S. & Harris, E. N. A protocol for determination of anticardiolipin antibodies by ELISA. *Nat Protoc* 3, 840–848 (2008).

63. Escalante, A., Brey, R. L., Mitchell, B. D. & Dreiner, U. Accuracy of anticardiolipin antibodies in identifying a history of thrombosis among patients with systemic lupus erythematosus. *Am J Med* 98, 559–565 (1995).

64. Boffa, M.-C. *et al.* Laboratory criteria of the obstetrical antiphospholipid syndrome. Data from a multicentric prospective European women cohort. *Thromb Haemost* 102, 25–28 (2009).

65. Neville, C. *et al.* Thromboembolic risk in patients with high titre anticardiolipin and multiple antiphospholipid antibodies. *Thromb Haemost* 90, 108–115 (2003).

66. Iverson, G. M., Victoria, E. J. & Marquis, D. M. Anti-beta2 glycoprotein I (beta2GPI) autoantibodies recognize an epitope on the first domain of beta2GPI. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 15542–15546 (1998).

67. Sorice, M. & Misasi, R. Different domains of β2-glycoprotein I play a role in autoimmune pathogenesis. *Cell Mol Immunol* 17, 1210–1211 (2020).

68. (PDF) β2-Glycoprotein I can exist in 2 conformations: Implications for our understanding of the antiphospholipid syndrome. *ResearchGate* doi:10.1182/blood-2009-12-260976.

69. Masson, E. Anticorps antiphospholipides et hémostase. *EM-Consulte*

70. Zhang, S. *et al.* Evaluation of the diagnostic potential of antibodies to beta2-glycoprotein 1 domain 1 in Chinese patients with antiphospholipid syndrome. *Sci Rep* 6, 23839 (2016).

71. Mahler, M. *et al.* Autoantibodies to domain 1 of beta 2 glycoprotein I determined using a novel chemiluminescence immunoassay demonstrate association with thrombosis in patients with antiphospholipid syndrome. *Lupus* 25, 911–916 (2016).

72. de Groot, P. G. *et al.* Lupus anticoagulants and the risk of a first episode of deep venous thrombosis. *J Thromb Haemost* 3, 1993–1997 (2005).

73. IgG/IgM antiphospholipid antibodies present in the classification criteria for the antiphospholipid syndrome: a critical review of their association with thrombosis

74. Devreese, K. M. J. *et al.* Testing for antiphospholipid antibodies with solid phase assays: guidance from the SSC of the ISTH. *J Thromb Haemost* 12, 792–795 (2014).

75. Tincani, A. *et al.* Minimal requirements for antiphospholipid antibodies ELISAs proposed by the European Forum on antiphospholipid antibodies. *Thrombosis Research* 114, 553–558 (2004).

76. Oosting, J. D., Derksen, R. H., Entjes, H. T., Bouma, B. N. & de Groot, P. G. Lupus anticoagulant activity is frequently dependent on the presence of beta 2-glycoprotein I. *Thromb Haemost* 67, 499–502 (1992).

77. Miyara, M., Diemert, M.-C., Amoura, Z. & Musset, L. [Antiphospholipid antibodies in practice]. *Rev Med Interne* 33, 176–180 (2012).

78. Galli, M. *et al.* The risk of thrombosis in patients with lupus anticoagulants is predicted by their specific coagulation profile. *Thromb Haemost* 81, 695–700 (1999).

79. de Laat, H. B., Derksen, R. H. W. M., Urbanus, R. T., Roest, M. & de Groot, P. G. beta2-glycoprotein I-dependent lupus anticoagulant highly correlates with thrombosis in the antiphospholipid syndrome. *Blood* 104, 3598–3602 (2004).

80. Horbach, D. A., van Oort, E., Donders, R. C., Derksen, R. H. & de Groot, P. G. Lupus anticoagulant is the strongest risk factor for both venous and arterial thrombosis in patients with systemic lupus erythematosus. Comparison between different assays for the detection of antiphospholipid antibodies. *Thromb Haemost* 76, 916–924 (1996).

81. Simioni, P. *et al.* Deep Venous Thrombosis and Lupus Anticoagulant. *Thromb Haemost* 76, 187–189 (1996).

82. Nojima, J. *et al.* Risk of arterial thrombosis in patients with anticardiolipin antibodies and lupus anticoagulant. *Br J Haematol* 96, 447–450 (1997).

83. Rauch, J., Tannenbaum, M. & Janoff, A. S. Distinguishing plasma lupus anticoagulants from anti-factor antibodies using hexagonal (II) phase phospholipids. *Thromb Haemost* 62, 892–896 (1989).

84. Esmon, N. L., Safa, O., Smirnov, M. D. & Esmon, C. T. Antiphospholipid antibodies and the protein C pathway. *J Autoimmun* 15, 221–225 (2000).

85. Gris, J. C. *et al.* Antiphospholipid and antiprotein syndromes in non-thrombotic, non-autoimmune women with unexplained recurrent primary early foetal loss. The Nîmes Obstetricians and Haematologists Study--NOHA. *Thromb Haemost* 84, 228–236 (2000).

86. Sanmarco, M. *et al.* Antiphosphatidylethanolamine antibodies are associated with an increased odds ratio for thrombosis. *Thromb Haemost* 97, 949–954 (2007).

87. Heim, X. *et al.* Is Oxidative Stress an Emerging Player in the Thrombosis of Patients with Anti-Phosphatidylethanolamine Autoantibodies? *J Clin Med* 11, 1297 (2022).

88. Tonello, M. *et al.* IgG phosphatidylserine/prothrombin antibodies as a risk factor of thrombosis in antiphospholipid antibody carriers. *Thrombosis Research* 177, 157–160 (2019).

89. Sciascia, S. *et al.* Anti-prothrombin (aPT) and anti-phosphatidylserine/prothrombin

(aPS/PT) antibodies and the risk of thrombosis in the antiphospholipid syndrome. A systematic review. *Thromb Haemost* 111, 354–364 (2014).

90. Bertin, D. *et al.* Interest of IgG and IgM antiprothrombin autoantibodies in the exploration of antiphospholipid syndrome: a 5-year retrospective study. *Rheumatology (Oxford)* 59, 1539–1544 (2020).

91. Rand, J. H. Antiphospholipid Antibody-mediated Disruption of the Annexin-V Antithrombotic Shield: a Thrombogenic Mechanism for the Antiphospholipid Syndrome. *Journal of Autoimmunity* 15, 107–111 (2000).

92. Kobayashi, T. *et al.* A lipid associated with the antiphospholipid syndrome regulates endosome structure and function. *Nature* 392, 193–197 (1998).

93. Alessandri, C. *et al.* Anti-lysobisphosphatidic acid antibodies in patients with antiphospholipid syndrome and systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol* 140, 173–180 (2005).

94. Schreiber, K. *et al.* Antiphospholipid syndrome. *Nat Rev Dis Primers* 4, 17103 (2018).

95. Chighizola, C. B., Sciascia, S., Andreoli, L. & Meroni, P. L. Beyond current concepts in anti-phospholipid syndrome: The 16th International Congress on Anti-phospholipid Antibodies (ICAPA) in Manchester. *Autoimmun Rev* 19, 102615 (2020).

96. Brinkmann, V. *et al.* Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. *Science* 303, 1532–1535 (2004).

97. Brinkmann, V. & Zychlinsky, A. Neutrophil extracellular traps: Is immunity the second function of chromatin? *J Cell Biol* 198, 773–783 (2012).

98. Pierangeli, S. S., Vega-Ostertag, M., Liu, X. & Girardi, G. Complement activation: a novel pathogenic mechanism in the antiphospholipid syndrome. *Ann N Y Acad Sci* 1051, 413–420 (2005).

99. Meroni, P. L., Borghi, M. O., Raschi, E. & Tedesco, F. Pathogenesis of antiphospholipid syndrome: understanding the antibodies. *Nat Rev Rheumatol* 7, 330–339 (2011).

100. Müller-Calleja, N. *et al.* Lipid presentation by the protein C receptor links coagulation with autoimmunity. *Science* (2021)

101. Nomura, A. *et al.* Different Spatial and Temporal Roles of Monocytes and Monocyte-Derived Cells in the Pathogenesis of an Imiquimod Induced Lupus Model. *Frontiers in Immunology* 13, (2022).

102. Kaplan, M. J. Linking clotting and autoimmunity. *Science* (2021)

103. Rand, J. H., Wu, X.-X., Quinn, A. S. & Taatjes, D. J. The annexin A5-mediated pathogenic mechanism in the antiphospholipid syndrome: role in pregnancy losses and thrombosis. *Lupus* 19, 460–469 (2010).

104. Gelber, S. E. *et al.* Prevention of Defective Placentation and Pregnancy Loss by Blocking Innate Immune Pathways in a Syngeneic Model of Placental Insufficiency. *The Journal of Immunology* 195, 1129–1138 (2015).

105. Girardi, G., Yarilin, D., Thurman, J. M., Holers, V. M. & Salmon, J. E. Complement activation induces dysregulation of angiogenic factors and causes fetal rejection and growth restriction. *J Exp Med* 203, 2165–2175 (2006).

106. Meroni, P. L., Borghi, M. O., Raschi, E. & Tedesco, F. Pathogenesis of antiphospholipid syndrome: understanding the antibodies. *Nat Rev Rheumatol* 7, 330–339 (2011).

107. Pengo, V. *et al.* Incidence of a first thromboembolic event in asymptomatic carriers of high-risk antiphospholipid antibody profile: a multicenter prospective study. *Blood* 118, 4714–4718 (2011).

108. Thrombosis and Systemic Lupus Erythematosus: The Hopkins Lupus Cohort Perspective: Scandinavian Journal of Rheumatology: Vol 25, No 4.

109. Hansen, K. E., Kong, D. F., Moore, K. D. & Ortel, T. L. Risk factors associated with thrombosis in patients with antiphospholipid antibodies. *The Journal of Rheumatology* 28, 2018–2024 (2001).

110. Danowski, A., Azevedo, M. N. L. de, Papi, J. A. de S. & Petri, M. Determinants of Risk for Venous and Arterial Thrombosis in Primary Antiphospholipid Syndrome and in Antiphospholipid Syndrome with Systemic Lupus Erythematosus. *The Journal of Rheumatology* 36, 1195–1199 (2009).

111. Girón-González, J. A., Río, E. G. del, Rodríguez, C., Rodríguez-Martorell, J. & Serrano, A. Antiphospholipid syndrome and asymptomatic carriers of antiphospholipid antibody: prospective analysis of 404 individuals. *The Journal of Rheumatology* 31, 1560–1567 (2004).

112. Rosendaal, F. R. Thrombosis in the young: epidemiology and risk factors. A focus on venous thrombosis. *Thromb Haemost* 78, 1–6 (1997).

113. Levine, J. S., Branch, D. W. & Rauch, J. The Antiphospholipid Syndrome (2009)

114. Otomo, K. *et al.* Efficacy of the antiphospholipid score for the diagnosis of antiphospholipid syndrome and its predictive value for thrombotic events. *Arthritis Rheum* 64, 504–512 (2012).

115. Sciascia, S. *et al.* GAPSS: the Global Anti-Phospholipid Syndrome Score. *Rheumatology* 52, 1397–1403 (2013).

116. Sciascia, S. *et al.* The global anti-phospholipid syndrome score in primary APS. *Rheumatology (Oxford)* 54, 134–138 (2015).

117. Zuily, S. *et al.* Validity of the global anti-phospholipid syndrome score to predict thrombosis: a prospective multicentre cohort study. *Rheumatology (Oxford)* 54, 2071–2075 (2015).

118. Ruiz-Irastorza, G. *et al.* Evidence-based recommendations for the prevention and long-term management of thrombosis in antiphospholipid antibody-positive patients: report of a task force at the 13th International Congress on antiphospholipid antibodies. *Lupus* 20, 206–218 (2011).

119. Tektonidou, M. G. *et al.* EULAR recommendations for the management of antiphospholipid syndrome in adults. *Ann Rheum Dis* 78, 1296–1304 (2019).

120. Syndrome des anticorps antiphospholipides : diagnostic&nbet traitement. https://www.edimark.fr/lettre-cardiologue/syndrome-anticorps-antiphospholipides-diagnostic-nbsp-nbsp-traitement.

121. Erkan, D. *et al.* Aspirin for primary thrombosis prevention in the antiphospholipid syndrome: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial in asymptomatic antiphospholipid antibody-positive individuals. *Arthritis Rheum* 56, 2382–2391 (2007).

122. Arnaud, L. *et al.* Efficacy of aspirin for the primary prevention of thrombosis in patients with antiphospholipid antibodies: an international and collaborative meta-analysis. *Autoimmun Rev* 13, 281–291 (2014).

123. Collaboration, A. T. (ATT). Aspirin in the primary and secondary prevention of vascular disease: collaborative meta-analysis of individual participant data from randomised trials. *The Lancet* 373, 1849–1860 (2009).

124. Erkan, D. *et al.* Hydroxychloroquine in the primary thrombosis prophylaxis of antiphospholipid antibody positive patients without systemic autoimmune disease. *Lupus* 27, 399–406 (2018).

125. Pengo, V. *et al.* Rivaroxaban vs warfarin in high-risk patients with antiphospholipid syndrome. *Blood* 132, 1365–1371 (2018).

126. Ruiz-Irastorza, G. *et al.* Effect of antimalarials on thrombosis and survival in patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus* 15, 577–583 (2006).

127. Tektonidou, M. G., Ioannidis, J. P. A., Boki, K. A., Vlachoyiannopoulos, P. G. & Moutsopoulos, H. M. Prognostic factors and clustering of serious clinical outcomes in antiphospholipid syndrome. *QJM: An International Journal of Medicine* 93, 523–530 (2000).

128. Woller, S. C. *et al.* Apixaban for the Secondary Prevention of Thrombosis Among Patients With Antiphospholipid Syndrome: Study Rationale and Design (ASTRO-APS). *Clin Appl Thromb Hemost* 22, 239–247 (2016).

129. Kwon, O. C., Park, Y.-B. & Park, M.-C. Effect of statins on the prevention of recurrent thrombosis in thrombotic antiphospholipid syndrome. *Rheumatology* keab410 (2021)

130. Meroni, P. L. *et al.* Statins prevent endothelial cell activation induced by antiphospholipid (anti-beta2-glycoprotein I) antibodies: effect on the proadhesive and proinflammatory phenotype. *Arthritis Rheum* 44, 2870–2878 (2001).

131. Erkan, D. *et al.* High thrombosis rate after fetal loss in antiphospholipid syndrome: effective prophylaxis with aspirin. *Arthritis Rheum* 44, 1466–1467 (2001).

132. Schulman, S., Svenungsson, E. & Granqvist, S. Anticardiolipin antibodies predict early recurrence of thromboembolism and death among patients with venous thromboembolism following anticoagulant therapy. Duration of Anticoagulation Study Group. *Am J Med* 104, 332–338 (1998).

133. Ginsberg, J. S. *et al.* Antiphospholipid antibodies and venous thromboembolism. *Blood* 86, 3685–3691 (1995).

134. Bates, S. M., Middeldorp, S., Rodger, M., James, A. H. & Greer, I. Guidance for the treatment and prevention of obstetric-associated venous thromboembolism. *J Thromb Thrombolysis* 41, 92–128 (2016).

135. Mohamed, K. A. A. & Saad, A. S. Enoxaparin and aspirin therapy for recurrent pregnancy loss due to anti-phospholipid syndrome (APS). *Middle East Fertility Society Journal* 19, (2014).

136. van Hoorn, M. E. *et al.* Low-molecular-weight heparin and aspirin in the prevention of recurrent early-onset pre-eclampsia in women with antiphospholipid antibodies: the FRUIT-RCT. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 197, 168–173 (2016).

137. Muñoz-Rodriguez, F. J. *et al.* Clinical study and follow-up of 100 patients with the antiphospholipid syndrome. *Semin Arthritis Rheum* 29, 182–190 (1999).

138. Cohn, D. M. *et al.* Recurrent miscarriage and antiphospholipid antibodies: prognosis of subsequent pregnancy. *J Thromb Haemost* 8, 2208–2213 (2010).

139. Mekinian, A. *et al.* The efficacy of hydroxychloroquine for obstetrical outcome in anti-phospholipid syndrome: Data from a European multicenter retrospective study. *Autoimmun Rev* 14, 498–502 (2015).

140. Bramham, K., Thomas, M., Nelson-Piercy, C., Khamashta, M. & Hunt, B. J. First-trimester low-dose prednisolone in refractory antiphospholipid antibody-related pregnancy loss. *Blood* 117, 6948–6951 (2011).

141. Jeremić, K. *et al.* Comparison of two therapeutic protocols in patients with antiphospholipid antibodies and recurrent miscarriages. *Vojnosanit Pregl* 62, 435–439 (2005).

142. Ruiz-Irastorza, G., Hunt, B. J. & Khamashta, M. A. A systematic review of secondary thromboprophylaxis in patients with antiphospholipid antibodies. *Arthritis Care & Research* 57, 1487–1495 (2007).

143. Bazzan, M. *et al.* Patients with antiphosholipid syndrome and thrombotic recurrences: A real world observation (the Piedmont cohort study). *Lupus* 25, 479–485 (2016).

144. Pengo, V. *et al.* Antibody profiles for the diagnosis of antiphospholipid syndrome. *Thromb Haemost* 93, 1147–1152 (2005).

145. Khamashta, M., Taraborelli, M., Sciascia, S. & Tincani, A. Antiphospholipid syndrome. *Best practice & research Clinical rheumatology* 30, 133–148 (2016).

146. EULAR recommendations for the management of antiphospholipid syndrome in adults | Annals of the Rheumatic Diseases.

147. Galli, M., Luciani, D., Bertolini, G. & Barbui, T. Lupus anticoagulants are stronger risk factors for thrombosis than anticardiolipin antibodies in the antiphospholipid syndrome: a systematic review of the literature. *Blood* 101, 1827–1832 (2003).

148. Prediction of adverse pregnancy outcome by the presence of lupus anticoagulant, but not anticardiolipin antibody, in patients with antiphospholipid antibodies.

149. Reynaud, Q. *et al.* Risk of venous and arterial thrombosis according to type of antiphospholipid antibodies in adults without systemic lupus erythematosus: A systematic review and meta-analysis. *Autoimmunity Reviews* 13, 595–608 (2014).

150. Pengo, V. *et al.* Correct laboratory approach to APS diagnosis and monitoring. *Autoimmun Rev* 12, 832–834 (2013).

151. de Laat, H. B., Derksen, R. H. W. M., Urbanus, R. T., Roest, M. & de Groot, P. G. beta2-glycoprotein I-dependent lupus anticoagulant highly correlates with thrombosis in the antiphospholipid syndrome. *Blood* 104, 3598–3602 (2004).

152. Schulman, S., Svenungsson, E. & Granqvist, S. Anticardiolipin Antibodies Predict Early Recurrence of Thromboembolism and Death Among Patients with Venous Thromboembolism Following Anticoagulant Therapy. *The American Journal of Medicine* 104, 332–338 (1998).

153. de Laat, B., Derksen, R. H. W. M., Urbanus, R. T. & de Groot, P. G. IgG antibodies that recognize epitope Gly40-Arg43 in domain I of beta 2-glycoprotein I cause LAC, and their presence correlates strongly with thrombosis. *Blood* 105, 1540–1545 (2005).

154. de Laat, B. *et al.* The association between circulating antibodies against domain I of beta2-glycoprotein I and thrombosis: an international multicenter study. *J Thromb Haemost* 7, 1767–1773 (2009).

155. Kelchtermans, H., Pelkmans, L., de Laat, B. & Devreese, K. M. IgG/IgM antiphospholipid antibodies present in the classification criteria for the antiphospholipid syndrome: a critical review of their association with thrombosis. *J Thromb Haemost* 14, 1530–1548 (2016).

156. Devreese, K. M. J. Antiphospholipid antibodies: evaluation of the thrombotic risk. *Thromb Res* 130 Suppl 1, S37-40 (2012).

157. Turiel, M. *et al.* Thrombotic Risk Factors In Primary Antiphospholipid Syndrome. *Stroke* 36, 1490–1494 (2005).

158. Pengo, V. *et al.* Antiphospholipid syndrome: antibodies to Domain 1 of β2-glycoprotein

1 correctly classify patients at risk. *J Thromb Haemost* 13, 782–787 (2015).

159. De Craemer, A.-S., Musial, J. & Devreese, K. M. J. Role of anti-domain 1-β2 glycoprotein I antibodies in the diagnosis and risk stratification of antiphospholipid syndrome. *J Thromb Haemost* 14, 1779–1787 (2016).

160. Devreese, K., Peerlinck, K. & Hoylaerts, M. F. Thrombotic risk assessment in the antiphospholipid syndrome requires more than the quantification of lupus anticoagulants. *Blood* 115, 870–878 (2010).

161. Ruffatti, A., Tonello, M., Cavazzana, A., Bagatella, P. & Pengo, V. Laboratory classification categories and pregnancy outcome in patients with primary antiphospholipid syndrome prescribed antithrombotic therapy. *Thromb Res* 123, 482–487 (2009).

162. Pengo, V. *et al.* Antibody profiles for the diagnosis of antiphospholipid syndrome. *Thromb Haemost* 93, 1147–1152 (2005).

163. Pengo, V. *et al.* Laboratory Diagnostics of Antiphospholipid Syndrome. *Semin Thromb Hemost* 44, 439–444 (2018).

164. Pengo, V. *et al.* Antiphospholipid syndrome: antibodies to Domain 1 of β2-glycoprotein 1 correctly classify patients at risk. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 13, 782–787 (2015).

165. Pengo, V. *et al.* Clinical course of high-risk patients diagnosed with antiphospholipid syndrome. *J Thromb Haemost* 8, 237–242 (2010).

166. Ruffatti, A. *et al.* Antibody profile and clinical course in primary antiphospholipid syndrome with pregnancy morbidity. *Thromb Haemost* 96, 337–341 (2006).

167. Galli, M. Interpretation and recommended testing for antiphospholipid antibodies. *Semin Thromb Hemost* 38, 348–352 (2012).

168. Bertin, D. *et al.* Single or triple positivity for antiphospholipid antibodies in 'carriers' or symptomatic patients: Untangling the knot. *J Thromb Haemost* 19, 3018–3030 (2021).

169. Maverakis, E. *et al.* Glycans in the immune system and The Altered Glycan Theory of Autoimmunity: a critical review. *J Autoimmun* 57, 1–13 (2015).

170. Anthony, R. M. & Nimmerjahn, F. The role of differential IgG glycosylation in the interaction of antibodies with FcγRs in vivo. *Current Opinion in Organ Transplantation* 16, 7–14 (2011).

171. Baković, M. P. *et al.* High-Throughput IgG Fc N-Glycosylation Profiling by Mass Spectrometry of Glycopeptides. *J. Proteome Res.* 12, 821–831 (2013).

172. Masson, E. Glycosylation des autoanticorps au cours des maladies auto-immunes. *EM-Consulte*

173. van Erp, L., Luytjes, W., Ferwerda, G. & van Kasteren, P. Fc-Mediated Antibody

Effector Functions During Respiratory Syncytial Virus Infection and Disease. *Frontiers in Immunology* 10, 548 (2019).

174. Kaneko, Y., Nimmerjahn, F. & Ravetch, J. V. Anti-Inflammatory Activity of Immunoglobulin G Resulting from Fc Sialylation. *Science* 313, 670–673 (2006).

175. Mizushima, T. *et al.* Structural basis for improved efficacy of therapeutic antibodies on defucosylation of their Fc glycans. *Genes Cells* 16, 1071–1080 (2011).

176. Ferrara, C. *et al.* Unique carbohydrate–carbohydrate interactions are required for high affinity binding between FcγRIII and antibodies lacking core fucose. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, 12669–12674 (2011).

177. Malhotra, R. *et al.* Glycosylation changes of IgG associated with rheumatoid arthritis can activate complement via the mannose-binding protein. *Nat Med* 1, 237–243 (1995).

178. Scallon, B. J., Tam, S. H., McCarthy, S. G., Cai, A. N. & Raju, T. S. Higher levels of sialylated Fc glycans in immunoglobulin G molecules can adversely impact functionality. *Mol Immunol* 44, 1524–1534 (2007).

179. Kaneko, Y., Nimmerjahn, F. & Ravetch, J. V. Anti-inflammatory activity of immunoglobulin G resulting from Fc sialylation. *Science* 313, 670–673 (2006).

180. Albert, H., Collin, M., Dudziak, D., Ravetch, J. V. & Nimmerjahn, F. In vivo enzymatic modulation of IgG glycosylation inhibits autoimmune disease in an IgG subclass-dependent manner. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 15005–15009 (2008).

181. Parekh, R. *et al.* A comparative analysis of disease-associated changes in the galactosylation of serum IgG. *J Autoimmun* 2, 101–114 (1989).

182. Rook, G. A. W. *et al.* Changes in IgG glycoform levels are associated with remission of arthritis during pregnancy. *Journal of Autoimmunity* 4, 779–794 (1991).

183. Fickentscher, C. *et al.* The Pathogenicity of Anti-β2GP1-IgG Autoantibodies Depends on Fc Glycosylation. *Journal of Immunology Research* 2015, e638129 (2015).

184. Alvarez, A. M., Gomez-Gutierrez, A. M., Bueno-Sánchez, J. C., Rúa-Molina, C. & Cadavid, A. P. Obstetric Antiphospholipid Syndrome: An Approach from Glycans of the Immunoglobulin G. *J Hum Reprod Sci* 14, 97–100 (2021).

185. Liu, T. *et al.* Characteristics of purified anti-β2GPI IgG N-glycosylation associate with thrombotic, obstetric and catastrophic antiphospholipid syndrome. *Rheumatology (Oxford)* 61, 1243–1254 (2022).

186. JCI Insight - Neutrophil extracellular traps in COVID-19. https://insight.jci.org/articles/view/138999.

187. Grayson, P. C. & Kaplan, M. J. At the Bench: Neutrophil extracellular traps (NETs) highlight novel aspects of innate immune system involvement in autoimmune diseases. *J Leukoc Biol* 99, 253–264 (2016).

188. Vayne, C., Nguyen, P. & Gruel, Y. Neutrophil extracellular traps, hemostatsis and thrombosis. *Hématologie* 23, 108–121 (2017).

189. Hakkim, A. *et al.* Impairment of neutrophil extracellular trap degradation is associated with lupus nephritis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 9813–9818 (2010).

190. Coelho, L. P. *et al.* Automatic determination of NET (neutrophil extracellular traps) coverage in fluorescent microscopy images. *Bioinformatics* 31, 2364–2370 (2015).

191. Nakazawa, D. *et al.* Abnormal conformation and impaired degradation of propylthiouracil-induced neutrophil extracellular traps: Implications of disordered neutrophil extracellular traps in a rat model of myeloperoxidase antineutrophil cytoplasmic antibody–associated vasculitis. *Arthritis & Rheumatism* 64, 3779–3787 (2012).

192. Kessenbrock, K. *et al.* Netting neutrophils in autoimmune small-vessel vasculitis. *Nat Med* 15, 623–625 (2009).

193. Köckritz-Blickwede, M. von, Chow, O., Ghochani, M. & Nizet, V. Visualization and Functional Evaluation of Phagocyte Extracellular Traps. in *Methods in Microbiology* vol. 37 139–160 (Elsevier, 2010).

194. Masuda, S. *et al.* NETosis markers: Quest for specific, objective, and quantitative markers. *Clinica Chimica Acta* 459, 89–93 (2016).

195. Thålin, C. *et al.* Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay for the quantification of citrullinated histone H3 as a marker for neutrophil extracellular traps in human plasma. *Immunol Res* 65, 706–712 (2017).

196. Leshner, M. *et al.* PAD4 mediated histone hypercitrullination induces heterochromatin decondensation and chromatin unfolding to form neutrophil extracellular trap-like structures. *Front Immunol* 3, 307 (2012).

197. Chen, K. *et al.* Endocytosis of soluble immune complexes leads to their clearance by FcγRIIIB but induces neutrophil extracellular traps via FcγRIIA in vivo. *Blood* 120, 4421–4431 (2012).

198. Rochael, N. C. *et al.* Classical ROS-dependent and early/rapid ROS-independent release of Neutrophil Extracellular Traps triggered by Leishmania parasites. *Sci Rep* 5, 18302 (2015).

199. Yalavarthi, S. *et al.* Release of neutrophil extracellular traps by neutrophils stimulated with antiphospholipid antibodies: a newly identified mechanism of thrombosis in the antiphospholipid syndrome. *Arthritis Rheumatol* 67, 2990–3003 (2015).

200. Meng, H. *et al.* In Vivo Role of Neutrophil Extracellular Traps in Antiphospholipid Antibody–Mediated Venous Thrombosis. *Arthritis & Rheumatology* 69, 655–667 (2017).

201. Lu, Y. *et al.* Antiphospholipid antibody-activated NETs exacerbate trophoblast and endothelial cell injury in obstetric antiphospholipid syndrome. *J Cell Mol Med* 24, 6690–6703

(2020).

202. Moore, S. *et al.* Role of Neutrophil Extracellular Traps Regarding Patients at Risk of Increased Disease Activity and Cardiovascular Comorbidity in Systemic Lupus Erythematosus. *The Journal of Rheumatology* 47, 1652–1660 (2020).

203. Zuo, Y. *et al.* Neutrophil extracellular traps in COVID-19. *JCI Insight* 5, e138999.

204. Ng, H. *et al.* Circulating Markers of Neutrophil Extracellular Traps Are of Prognostic Value in Patients With COVID-19. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 41, 988–994 (2021).

205. Leffler, J. *et al.* Degradation of neutrophil extracellular traps is decreased in patients with antiphospholipid syndrome. *Clin Exp Rheumatol* 32, 66–70 (2014).

206. Zuo, Y. *et al.* Anti–Neutrophil Extracellular Trap Antibodies and Impaired Neutrophil Extracellular Trap Degradation in Antiphospholipid Syndrome. *Arthritis & Rheumatology* 72, 2130–2135 (2020).

207. Olivieri, S. *et al.* Clinical value of antibodies to lysobisphosphatidic acid in patients with primary antiphospholipid sindrome. *Reumatismo* 62, 107–112 (2010).

208. Rochemonteix, B. G. *et al.* Interaction of Anti-Phospholipid Antibodies With Late Endosomes of Human Endothelial Cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 20, 563–574 (2000).

209. Hollerbach, A. *et al.* Pathogenic lipid-binding antiphospholipid antibodies are associated with severity of COVID-19. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 19, 2335–2347 (2021).

SERMENT DE GALIEN

Je jure, en présence de mes maîtres de la Faculté, des conseillers de l'Ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

- *D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.*

- *D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.*

- *De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.*

- *En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.*

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre, méprisé de mes confrères, si j'y manque.

Résumé :

Le syndrome des anti-phospholipides (SAPL) se définit par l'association de manifestations thrombotiques et/ou obstétricales à la persistance d'anticorps anti-phospholipide (aPL) circulants.

La problématique actuelle repose sur l'identification de patients à haut risque d'évènements thrombotiques ou obstétricaux. Après avoir réalisé une revue exhaustive de la littérature concernant le syndrome, tant dans son évaluation clinique, biologique que dans sa pathogénicité, l'objectif de cette thèse porte sur l'analyse de facteurs biologiques proposés comme marqueurs de gravité du SAPL.

La triple positivité (TP) des aPL est aujourd'hui le profil biologique à haut risque thrombotique le plus décrit. Toutefois, une étude récente discordante concernant l'association de la TP à la gravité du SAPL nous a conduit à rechercher de nouveaux marqueurs biologiques de gravité.

La N-glycosylation des aPL pourrait constituer un marqueur de gravité prometteur dans le SAPL puisque les patients porteurs d'un SAPL ont présenté des aPL hyposialylés, hypogalactosylés ou encore hypofucosylés par rapport aux porteurs asymptomatiques d'aPL.

Les NETs, impliqués dans le processus d'immunothrombose, pourraient également être considérés comme un marqueur biologique du risque thrombotique dans le SAPL.

L'étude de l'association d'auto-anticorps dirigés contre l'acide lysobisphosphatidique (LBPA), un phospholipide impliqué dans les mécanismes de thromboses et d'auto-immunité, à la gravité du SAPL fera l'objet de mon mémoire de DES de Biologie Médicale.

Ainsi, l'ensemble de ce travail montre l'intérêt d'identifier de nouveaux marqueurs biologiques de gravité du SAPL afin d'adapter la prise en charge thérapeutique dans le but de limiter les récidives thrombotiques, constituant la première cause de mortalité de cette pathologie.

Mots-clés : syndrome des antiphospholipides, risque thrombotique, gravité clinique, glycosylation, Neutrophil Extracellular Traps (NETs), anticorps anti-acide lysobisphosphatidique