

D iagnostic biologique des anticoagulants circulants de type lupique (lupus anticoagulants)

D. ARNOUX, B. BOUTIÈRE et J. SAMPOL *

RÉSUMÉ

Les lupus anticoagulants (LA) sont des anticorps définis par leur capacité d'interférer dans des tests de coagulation dépendants des phospholipides. Paradoxalement, en dépit d'un effet anticoagulant souvent marqué *in vitro*, ils sont clairement associés à la survenue de manifestations thrombotiques artérielles et/ou veineuses et de pertes fœtales à répétition. Les LA sont retrouvés dans des contextes cliniques très divers : auto-immuns (LED notamment), infectieux, néoplasiques ou iatrogènes avec des conséquences variables sur le risque thrombotique. Ils sont fréquemment mis en évidence fortuitement, à l'occasion de la découverte d'une anomalie du bilan de coagulation standard, généralement un allongement du TCA.

Les LA font partie de la "famille" des anticorps antiphospholipides, bien qu'il reconnaissent vraisemblablement plutôt des complexes de phospholipides et de protéines. Ils sont très hétérogènes à la fois sur le plan immunologique et par leur réactivité dans les différents tests de coagulation servant à leur diagnostic.

Le diagnostic biologique des LA comporte quatre étapes : 1) dépistage, 2) mise en évidence d'un inhibiteur, 3) démonstration de sa dépendance en phospholipides, 4) exclusion d'une coagulopathie associée.

La procédure diagnostique doit être à la fois sensible et spécifique et impose de mettre en œuvre une combinaison de tests reposant sur des principes différents. La sensibilité des tests de dépistage des LA, notamment du TCA, varie considérablement en fonction du réactif utilisé. Outre le TCA, plusieurs tests dépendants des phospholipides, qui font intervenir de la thromboplastine diluée ou des venins activateurs de la coagulation à différents niveaux, permettent de les mettre en évidence. Des systèmes "intégrés" combinant en un seul test dépistage, inhibition et confirmation ont été mis au point. Enfin, il est à noter que certains LA sont susceptibles d'occasionner des perturbations artéfactuelles de divers tests chronométriques faisant intervenir des phospholipides : ce phénomène peut concerner par exemple le dosage des facteurs de la voie endogène de la coagulation, la détermination du temps de Quick/INR, le dépistage d'une résistance à la protéine C activée.

À la lumière de diverses études cliniques, les LA, au sein des anticorps antiphospholipides, semblent avoir une bonne valeur prédictive du risque thrombotique. Des travaux prospectifs sont nécessaires pour tenter d'établir des corrélations entre leur expression biologique et leurs associations cliniques.

MOTS-CLÉS

lupus anticoagulant – antiphospholipides.

SUMMARY

Lupus anticoagulants (LA) are antibodies characterized by their ability to prolong phospholipid - dependent clotting tests. Paradoxically, in spite of their *in-vitro* "anticoagulant" effect, they are associated with venous and/or arterial thrombosis and recurrent fetal loss. LA are found in a large variety of clinical settings : auto-immune diseases (among which SLE), infections, malignancy and in association with drug administration. They are often revealed by unexpected abnormality of routine coagulation screening tests, usually APTT.

LA are classified as "antiphospholipid" antibodies although they probably rather recognize complexes of phospholipids and phospholipid-bound proteins. LA are very heterogeneous, regarding both their immunological and haemostatic properties, since they behave diversely in coagulation tests used for their diagnosis. Biological diagnosis of LA includes four steps : 1) screening, 2) demonstration of an inhibitory activity, 3) demonstration of phospholipid - dependence, 4) exclusion of an associated coagulopathy.

Appropriate diagnostic procedure should associate various clotting tests based on different principles. The reagents used in the screening step differ widely in their sensitivity to LA. In addition to APTT, which represents the best-known screening assay, a large number of other phospholipid - dependent tests, using diluted thromboplastin or procoagulant viper venoms have been described.

"Integrated systems", combining screening, inhibition and confirmation in a single test have become available. Finally, it is noteworthy that LA may be responsible for artefactual perturbations of any phospholipid - dependent clotting test, such as coagulation factor measurement, determination of prothrombin time/INR, screening for an activated protein C resistance.

As suggested by recent clinical studies, LA, among antiphospholipid antibodies, represent strong markers of a thrombotic risk. Prospective works are still needed to investigate a potential relationship between their biological properties and their clinical associations.

KEY-WORDS

lupus anticoagulant – antiphospholipid antibodies.

* Laboratoire d'hématologie
C.H.R.U. – Hôpital La Conception
147, bd Baille
13385 MARSEILLE CEDEX 5

TIRÉS À PART :
Mme le Dr D. ARNOUX

article reçu le 15 janvier, accepté le 6 mars 1997.

Les lupus anticoagulants (LA) suscitent, depuis une dizaine d'années, un intérêt croissant à la fois chez les biologistes, qui se trouvent relativement souvent confrontés au problème de leur diagnostic, et chez les cliniciens, l'association de LA (ou d'autres antiphospholipides) avec la survenue de manifestations de type thrombotique et/ou de pertes fœtales répétées définissant le syndrome des antiphospholipides.

1. Définition et nomenclature

Les lupus anticoagulants sont des anticorps caractérisés par leur capacité de prolonger des tests de coagulation dépendants des phospholipides. Cette interférence des LA avec la fonction pro-coagulante des phospholipides ne s'exerce qu'in vitro, dans un milieu où ces phospholipides représentent un facteur limitant de la réaction de coagulation, notamment lors des étapes d'activation du facteur X et de la prothrombine. In vivo, les phospholipides servant de support aux réactions de coagulation étant disponibles en quantité non limitée, les LA n'ont pas d'effet à proprement parler anticoagulant et ne sont jamais responsables, à eux seuls, d'une tendance hémorragique. Cette dernière ne se manifeste que dans les rares cas où les LA sont associés à un déficit acquis en prothrombine (4, 24) ou à une thrombopénie sévère.

Bien qu'imparfaitement adapté, étant donné l'absence de spécificité de cette anomalie vis-à-vis du lupus érythémateux disséminé (LED), le terme de "lupus anticoagulant" retenu par les experts internationaux doit être préféré à celui d'"antiprotrombinase" couramment utilisé pour désigner ce type d'anticoagulants circulants (7).

Les lupus anticoagulants s'opposent, par leurs caractéristiques biologiques et par les manifestations cliniques thrombotiques qui leur sont associées, aux inhibiteurs spécifiques des facteurs de la coagulation, responsables d'un déficit acquis du facteur cible, avec une tendance hémorragique proportionnelle à l'intensité de ce déficit.

Le diagnostic biologique différentiel des deux types d'inhibiteurs peut, parfois, s'avérer délicat. De plus, dans de rares cas, les deux types d'anticorps peuvent être concomitants.

2. Circonstances de survenue

En dehors du LED, dans lequel ils ont été initialement décrits (10), où leur prévalence atteint 50 % dans certaines séries (25), les LA se rencontrent au cours de diverses pathologies auto-immunes (polyarthrite rhumatoïde, autres connectivites), chez des patients atteints de néoplasies, d'hémopathies lymphoïdes (lymphomes, leucémie lymphoïde chronique, leucémie à tricholeucocytes), au décours d'infections virales, bactériennes ou parasitaires, en association avec certains traitements médicamenteux (chlorpromazine, quinidine, procainamide, antibiotiques, interféron...), voire de façon idiopathique, en particulier chez des sujets âgés.

Les LA associés à des pathologies infectieuses sont le plus souvent transitoires et sans conséquences thrombotiques. Il en est habituellement de même pour les LA d'origine médicamenteuse, bien que des exceptions aient été décrites (notamment avec la procainamide, la quinine et l'interféron β).

3. Caractéristiques immunologiques

Généralement polyclonaux, les LA peuvent appartenir à divers isotypes, le plus souvent IgG mais aussi IgM, IgA ou mixtes.

De même que les anticorps anticardiolipine, les LA sont classiquement considérés comme des antiphospholipides, dirigés contre des phospholipides anioniques (phosphatidylsérine, phosphatidylinositol, acide phosphatidique) ou neutres, comme la phosphatidyléthanolamine, notamment lorsqu'elle est présente sous une configuration particulière, en phase hexagonale (28).

En réalité, leur spécificité exclusivement antiphospholipidique a été remise en cause par divers travaux, montrant que les LA reconnaissent plutôt des néoantigènes exprimés par certaines protéines plasmatiques lorsqu'elles sont liées à ces phospholipides. La notion d'"antiphospholipides" a ainsi tendance à évoluer vers celle d'"anti-complexes phospholipides/protéines" (33).

Parmi les cofacteurs protéiques des LA, les mieux connus sont la β_2 GPI (32) et la prothrombine (5). La nature de leur cofacteur protéique conditionnerait la réactivité des LA dans les divers tests de coagulation (16). Des anticorps dirigés contre des complexes de phospholipides et d'autres protéines plasmatiques comme la protéine C, la protéine S ou les kininogènes ont été décrits dans le cadre du syndrome des antiphospholipides, mais ils ne sont pas mis en évidence par les tests usuels de détection des LA (36).

Les LA sont donc des anticorps extrêmement hétérogènes, à la fois par leur isotype et par la diversité des complexes phospholipides-protéines qui constituent leur cible antigénique. Il convient par ailleurs de souligner que LA et anticorps anticardiolipine, s'ils se rencontrent dans des circonstances identiques et sont associés aux mêmes manifestations cliniques, représentent bien des entités distinctes et séparables.

Chez les patients présentant un syndrome des antiphospholipides, le taux de recouvrement des LA et des aCL n'est que de 60 % environ, d'où l'intérêt, dans un contexte évocateur, de rechercher systématiquement les deux types d'anticorps par les méthodes appropriées.

Dans cette démarche, le diagnostic des LA prend d'autant plus d'intérêt qu'à la lumière de diverses études, ce sont eux qui, au sein des anticorps antiphospholipides, semblent représenter le plus fort marqueur du risque thrombotique à la fois artériel et veineux, tant dans le cadre clinique du LED qu'en dehors de ce dernier (17, 20, 21).

4. Indications de la recherche LA

Étant donné la présentation clinique protéiforme du syndrome des antiphospholipides (36, 39), les indications du diagnostic de LA sont nombreuses :

- bilan initial et suivi de pathologies auto-immunes : LED, autres collagénoses,
- bilan étiologique de thromboses veineuses et/ou artérielles inexpliquées,
- pertes fœtales à répétition,
- thrombopénies inexpliquées,
- manifestations cliniques évocatrices : dermatologiques (livedo réticulaire), cardiaques (valvulopathies mitrales ou aortiques), neurologiques (accidents ischémiques transitoires, amaurose fugace),
- enfin, assez fréquemment, la recherche de LA sera pratiquée à l'initiative du biologiste, conformément à la nomenclature des actes de biologie en vigueur, devant la découverte fortuite de l'anomalie d'un test de coagulation, le plus souvent temps de céphaline avec activateur (TCA).

5. Étapes du diagnostic biologique des LA

La grande hétérogénéité des LA est en partie responsable de la difficulté de leur diagnostic : tous les LA ne réagissant pas de façon identique dans un système biologique donné, il est indispensable, pour les diagnostiquer au mieux, de mettre en œuvre une combinaison de tests à la fois sensibles et spécifiques.

D'autre part, les variations existant entre les laboratoires en ce qui concerne les méthodes et les critères d'interprétation des tests ont longtemps entretenu une certaine confusion et rendu problématique la confrontation des résultats de différentes études.

En 1991, le Sous-comité "Lupus anticoagulant/phospholipid-dependent antibodies" de l'International society on thrombosis and haemostasis a formulé des recommandations pour le diagnostic des LA (14). Depuis, ces recommandations ont fait l'objet d'actualisations régulières (7) qui ont permis d'améliorer considérablement la standardisation du diagnostic.

Les experts préconisent l'utilisation d'une procédure comportant quatre étapes :

1. dépistage des LA : mise en évidence de l'allongement de test(s) de coagulation faisant intervenir des phospholipides,
2. mise en évidence d'une activité inhibitrice : absence de correction de l'allongement après mélange du plasma à tester avec du plasma normal,
3. confirmation de la dépendance en phospholipides de l'inhibiteur,
4. exclusion d'une anomalie associée, déficit ou inhibition spécifique de l'un des facteurs de la coagulation.

Avant de détailler les étapes du diagnostic, il faut insister sur l'importance de diverses variables pré-analytiques. L'une des principales est le mode de préparation du plasma, tant en ce qui concerne les échantillons à étudier que le plasma servant à la réalisation des tests de mélange.

Le diagnostic doit être effectué sur un plasma parfaitement déplaqué, afin d'éviter la lyse de plaquettes résiduelles et la libération de phospholipides susceptibles de neutraliser les LA. Ceci revêt une importance particulière en présence de LA "faibles" (induisant un allongement modéré des tests de coagulation) et en cas de congélation du plasma à étudier.

Le chiffre des plaquettes résiduelles ne doit pas excéder $10 \times 10^9 /l$. Pour cela, il est conseillé de procéder soit à une double centrifugation (deux étapes de centrifugation de 10 min à 3 500 t/min, séparées par une décantation en tube plastique), soit à une filtration du plasma sur filtre de porosité 0.22 micron. L'ultracentrifugation qui risque de fragmenter les plaquettes est à proscrire.

Une autre source d'erreur est représentée par la présence d'héparine dans les échantillons. Elle peut être facilement dépistée par la réalisation d'un temps de thrombine. Bien que certains tests de diagnostic soient réputés insensibles à l'héparine (grâce à l'ajout aux réactifs de produits neutralisants), la recherche de LA sur des prélèvements contenant de l'héparine est déconseillée. En revanche, elle est possible chez des patients recevant un traitement antivitamine K équilibré.

6. Tests de dépistage

A ce stade du diagnostic, on doit privilégier la sensibilité. La concentration en phospholipides mise en œuvre dans les tests de dépistage est un facteur important, la sensibilité du test étant, en principe, d'autant plus importante que les phospholipides sont plus dilués. Toutefois, quelle que soit sa sensibilité, aucun système réactif n'est capable, à lui seul, de détecter la totalité des LA.

L'efficacité du dépistage est considérablement améliorée par la mise en œuvre d'une association de deux tests au moins (7, 18, 19, 43). Ces tests doivent reposer sur des principes différents.

1. Le temps de céphaline avec activateur (TCA)

Réalisé dans les conditions standard, il est de loin le test le plus couramment utilisé pour le dépistage des LA, mais sa sensibilité varie considérablement en fonction du réactif utilisé. La composition en phospholipides, et en particulier la concentration relative en phosphatidylsérine, serait plus importante que la teneur totale en phospholipides.

La nature de l'activateur intervient aussi : les réactifs à base de silice ou d'acide élaïque sont reconnus plus sensibles que ceux utilisant le kaolin ou la célite (11). Cependant, quel que soit le réactif employé, le TCA seul permet, au mieux, de dépister entre 50 et 70 % des LA (43). La sensibilité du TCA est également affectée par toute augmentation significative du facteur VIII, liée à un contexte inflammatoire, qui peut masquer l'effet de LA "faibles".

Des modifications peuvent être apportées au TCA "standard" afin d'améliorer sa sensibilité. Des réactifs TCA spécifiquement destinés au diagnostic des LA ont été mis au point, différant des réactifs usuels par la concentration et la nature des phospholipides mis en jeu.

Il est aussi possible de mettre à profit le temps d'incubation du plasma avec la céphaline/activateur. Une procédure diagnostique reposant sur la comparaison des TCA mesurés après deux temps différents d'incubation (1 et 10 minutes) a été décrite (29). Elle constituerait à la fois un test de dépistage et de confirmation.

2. Le temps de coagulation avec kaolin (kaolin clotting time : KCT)

Ne devant pas être confondu avec le temps de céphaline kaolin, il ne fait intervenir aucun phospholipide exogène, les phospholipides étant apportés à l'état de traces par le plasma à tester. Très sensible aux LA, ce test est particulièrement dépendant de la préparation de l'échantillon plasmatique, qui doit être rigoureusement déplaqué par filtration (porosité 0,22 micron) (13).

3. Le temps de thromboplastine diluée (TTD)

C'est un temps de Quick réalisé avec une forte dilution de la thromboplastine, habituellement au 1:500 (35).

Pour que le test puisse être mené en un temps, la thromboplastine doit être diluée dans du CaCl_2 0,025 M.

Dans ces conditions, le temps de Quick, le plus souvent non influencé par les LA, devient très sensible à leur présence. Comme pour le TCA, bien que dans une moindre mesure, la sensibilité du TTD dépend de la nature du réactif thromboplastine mis en œuvre. Pour certains, les thromboplastines "synthétiques", à base de facteur tissulaire recombinant humain relipidé, possèderaient la meilleure sensibilité aux LA (3, 15). Un travail récent n'a cependant pas confirmé cette différence de sensibilité entre thromboplastines d'extraction et recombinantes (18).

Le TTD est un test de dépistage relativement simple à pratiquer, automatisable, peu coûteux mais nécessitant la préparation extemporanée de la dilution de thromboplastine et la mesure systématique, pour chaque série de tests, du temps "témoin" pour assurer un calcul fiable du rapport temps patient

temps témoin

(normalement <1.2). En revanche, le TTD ainsi mesuré est très peu spécifique vis-à-vis des LA. Il est affecté par toute diminution, même mineure, de l'un des facteurs explorés par le temps de Quick (VII, X, V, II). De plus, une étude récente a démontré que sa spécificité est également influencée par la valeur du fibrinogène, suggérant l'utilité d'appliquer au TTD un facteur de correction en cas d'hyperfibrinogénémie (12). Enfin, dans la dilution au 1:500 de la thromboplastine, les agents neutralisants de l'héparine ne sont plus en concentration suffisante pour rendre le TTD insensible à sa présence.

La spécificité du test est considérablement améliorée si l'on tient compte du rapport :

$$\frac{\text{temps du mélange (malade + témoin)}}{\text{temps du témoin}}$$

le mélange renfermant plasma à tester et pool de plasmas normaux à parties égales. Réalisé dans ces conditions, le TTD peut être considéré davantage comme un test de confirmation que comme un simple test de dépistage.

Les critères de positivité généralement retenus figurent dans le tableau I.

4. Le temps de venin de vipère Russell dilué (DRVVT)

Connu depuis longtemps pour sa sensibilité aux LA, il fait intervenir un activateur du facteur X agissant en présence de phospholipides (38). Il présente l'avantage de ne pas être influencé par les déficits (ou inhibiteurs) touchant les facteurs VII, VIII, IX ou les facteurs contact.

De plus, certains réactifs commerciaux ont été rendus insensibles à l'héparine par ajout de substances neutralisantes. En revanche, le DRVVT est perturbé par les traitements par anti-vitamine K puisqu'il explore deux des facteurs vitamine K dépendants (X et II).

D'après une étude récente, le DRVVT, parmi les tests de dépistage des LA, aurait la meilleure valeur prédictive de la survenue de thromboses artérielles (1).

Dans notre expérience, le DRVVT s'est avéré un test de dépistage très utile. Il semble posséder une sensibilité intrinsèque, en mettant en évidence certains LA non dépistés par les tests usuels (TCA même sensibilisé et TTD).

A l'inverse, il permet en cas de franche négativité, d'éliminer la présence d'un LA devant un TTD "limite" et un TCA sub-normal, (situation fréquemment observée, par exemple, en présence de traces d'héparine).

5. Autres venins de vipère

D'autres venins de vipère ont été évalués dans le cadre du diagnostic des LA.

- **Le venin de vipère Taïpan** active la prothrombine en présence de phospholipides. Son action ne nécessite pas la présence de facteur V et il est insensible aux déficits (ou inhibiteurs) touchant tous les facteurs autres que la prothrombine (30).

TABLEAU I
Critères de positivité des tests usuels de diagnostic des LA

	Négatif	Douteux	Positif
Test de correction du TCA*	< 12	12 - 15	≥ 15
TTD**	< 1,10	1,10 - 1,20	≥ 1,20
Tests "intégrés" : - Staclot LA (Stago)*** - DRVVT LAC Screen/LAC Confirm (IL)****	< 7" < 1,1	7" - 10" 1,1 - 1,2	> 10" ≥ 1,2

* Interprétation du test de correction du TCA : calcul de l'indice de Rosner

** TTD (test de thromboplastine diluée) réalisé sur une dilution au 1/500° de la thromboplastine en chlorure de calcium 25 mM
Interprétation : $\frac{\text{temps mélange (M + T)}}{\text{temps témoin}}$

*** Raccourcissement du temps de coagulation après ajout de phospholipides (en secondes)

**** Interprétation du rapport LAC Screen^R/LAC Confirm^R

Un résultat "douteux" impose de renouveler le test sur un autre prélèvement et/ou de faire appel à un test reposant sur un principe différent.

- **La textarine**, autre activateur de la prothrombine, diffère du précédent par sa dépendance vis-à-vis du facteur V. En revanche, le temps de textarine est, parmi les tests de dépistage, le seul à ne pas être influencé par les traitements AVK, la textarine activant aussi bien la prothrombine sous sa forme native que sous sa forme acarboxylée (PIVKA II) (42).

7. Mise en évidence d'un inhibiteur

Devant l'anomalie d'un ou plusieurs tests de dépistage, la démonstration de la présence d'un inhibiteur fait appel à une épreuve de "correction" ou de "mélange". Les tests initialement perturbés sont refaits sur un mélange du plasma à tester et d'un pool de plasma normal. L'absence de correction de l'allongement initial par l'apport du plasma normal signe la présence d'un inhibiteur, qui reste à caractériser. Au contraire, la normalisation du temps de coagulation du mélange est en faveur d'un déficit touchant l'un au moins des facteurs explorés par le test.

Plusieurs points pratiques méritent d'être évoqués.

- La préparation du "plasma normal" destiné aux tests de mélange est d'une importance aussi capitale que celle des échantillons à tester (7, 22). Idéalement, il doit s'agir d'un pool de plasmas frais provenant de sujets sains (20 au minimum), réalisé dans les meilleurs délais suivant le prélèvement. Ce pool plasmatique doit subir une double centrifugation ou une filtration afin d'en éliminer totalement les plaquettes. Il peut être conservé congelé (par fractions de 0,5 ml environ) plusieurs mois à - 80°C, quelques semaines à - 20°C.

L'utilisation dans le test de mélange d'un seul plasma jugé "normal" sur la base d'un bilan de coagulation standard est à proscrire. L'emploi de plasmas lyophilisés commerciaux, utile devant la difficulté de certains laboratoires à réaliser un pool frais de bonne qualité, est une source de variabilité des résultats.

- La proportion idéale d'échantillon à tester et de pool normal peut varier. Habituellement, le mélange est effectué à parties égales, mais l'utilisation de proportions différentes (quatre parties de plasma à tester pour une partie de pool) permet de sensibiliser le test, en présence d'inhibiteurs "faibles" induisant un allongement modéré des tests de dépistage (22, 26).

- La réalisation du test de coagulation avant et après incubation du mélange 2 h à 37° peut permettre de mettre en évidence une activité inhibitrice progressive, retrouvée pour environ 10 % des LA (9), alors que cette dépendance du temps et de la température est la règle pour les inhibiteurs spécifiques (en particulier anti-VIII). En revanche, la mise en évidence d'une inhibition immédiate dispense de réaliser l'étape d'incubation.

- Les critères retenus pour apprécier la correction du temps de coagulation représentent une cause importante de divergence dans l'interprétation du test de mélange. On peut prendre en compte la simple différence des temps de coagulation du mélange et du témoin, le rapport $\frac{\text{temps mélange}}{\text{temps témoin}}$

(généralement considéré comme positif s'il est ≥ 1.2 pour un mélange à parties égales). Cependant, le critère assurant la meilleure discrimination entre déficit en facteur(s) et présence d'un inhibiteur est l'indice de ROSNER (31), calculé selon la formule : $\frac{\text{temps du mélange} - \text{temps du témoin}}{\text{temps du patient}} \times 100$

Un indice ≥ 15 signe la présence d'un inhibiteur (voir tableau I). Cette méthode présente l'avantage de tenir compte du degré d'allongement initial et permet d'apprécier une correction relative.

A ce stade du diagnostic, on aura mis en évidence un inhibiteur, qui reste à caractériser.

8. Tests de confirmation

Ils ont pour but de démontrer la dépendance en phospholipides de l'inhibiteur, assurant ainsi un diagnostic différentiel entre LA et inhibiteurs anti-facteurs. Le critère requis à ce stade de la démarche diagnostique est la spécificité.

Pour cela, la meilleure procédure consiste à reprendre le(s) test(s) de dépistage initialement perturbé en augmentant la teneur en phospholipides du réactif, afin de "neutraliser" ou de diminuer significativement l'effet de l'inhibiteur, s'il s'agit bien d'un LA.

Les phospholipides utilisés dans les procédures de confirmation peuvent être de diverses origines : lysats (41) ou vésicules (2) plaquettaires, phospholipides extraits de cerveaux animaux ou encore phospholipides purifiés, comme la phosphatidyl éthanolamine en phase hexagonale (II) (27, 40) ou l'inosithine (34). Ces différents phospholipides semblent avoir une efficacité similaire dans les tests de confirmation (37).

La présence d'un LA se traduit par le raccourcissement, après ajout de phospholipides, du temps de coagulation précédemment allongé. Le degré de raccourcissement considéré comme significatif est à définir en fonction du test mis en œuvre et de la concentration des phospholipides ajoutés. Tous les principes de tests utilisés au stade du dépistage sont applicables à l'étape de confirmation, qu'il s'agisse du TCA, du TTD, du KCT, du DRVVT, du temps de textarine ou de venin de vipère Taïpan. Pour le temps de textarine, une méthode originale de confirmation a été décrite : elle consiste non plus à augmenter la concentration en phospholipides, mais à établir un rapport entre le temps de coagulation du plasma et/ou du mélange en présence de textarine (venin phospholipide-dépendant) et le temps obtenu avec un autre activateur de la prothrombine, l'écarine, dont l'action ne fait pas intervenir les phospholipides et n'est donc pas sensible aux LA (42).

Ce type de procédure représente un bon exemple des systèmes "intégrés" de diagnostic des LA, développés au cours des dernières années, qui combinent en un seul test dépistage, inhibition et confirmation. Plusieurs d'entre eux sont commercialement disponibles, comme le DRVVT LAC Screen[®] /LAC Confirm[®] (Instrumentation Laboratory) ou le Staclot LA[®] (Diagnostica Stago).

Ces deux derniers tests présentent l'avantage d'être insensibles à la présence d'héparine aux concentrations thérapeutiques. Leur spécificité apparaît satisfaisante, bien que des fausses positivités aient été reportées pour le Staclot LA[®] avec des anti-VIII de titre élevé (6).

En revanche, la mise en œuvre d'une seule de ces procédures ne semble pas permettre de dépister la totalité des LA.

Les critères de positivité habituellement retenus pour ces tests sont indiqués dans le *tableau I*.

9. Exclusion d'une anomalie de la coagulation associée au LA

Il est nécessaire, en particulier devant un allongement très important d'un test de dépistage, d'éliminer une coagulopathie touchant l'un des facteurs explorés : déficit ou présence d'un inhibiteur spécifique qui peut se superposer au LA préalablement identifié.

– Le cas le plus classique est celui d'un allongement marqué du TCA, non corrigé par apport de plasma normal, mais significativement raccourci en présence de phospholipides concentrés : la positivité du test de neutralisation ne dispense pas de doser les facteurs VIII, IX, XI, éventuellement XII pour exclure l'éventualité d'un inhibiteur spécifique (anti-VIII essentiellement) ou d'un déficit en l'un de ces facteurs.

Le mesure des facteurs sera réalisée sur des dilutions croissantes (pouvant aller jusqu'au 1:160^e) du plasma, afin de mini-

TABLEAU II
Diagnostic différentiel entre LA, inhibiteur spécifique et déficit en facteur devant un allongement du TCA

	Lupus anticoagulant	ACC spécifique voie endogène	Déficit en facteur voie endogène
TCA	± Allongé	Allongé	Allongé
Test de mélange	Non correction de l'allongement	Non correction de l'allongement	Correction de l'allongement
Indice de Rosner	≥ 15	≥ 15	< 12
Tests de confirmation d'un LA	Positifs	Négatifs	Négatifs
Facteurs voie endogène (dosage chronométrique)	Normaux ou diminution de plusieurs facteurs (correction par dilution du plasma)	Diminution du facteur cible (non correction par dilution du plasma)	Diminution d'un seul facteur

miser l'interférence possible du LA avec le dosage, lui-même basé sur le principe du TCA (8).

Trois éventualités se présentent :

- les facteurs mesurés dans les conditions usuelles sont tous normaux ;
- ou, un ou plusieurs des facteurs sont diminués dans des proportions variables, mais leur déficit apparent se corrige sous l'effet de la dilution du plasma : ces cas s'expliquent bien par la seule présence d'un LA ;
- un seul des facteurs est profondément abaissé, la dilution du plasma ne permet aucune correction significative du déficit : devant ce tableau, la recherche d'un inhibiteur spécifique et, le cas échéant, sa titration seront entreprises.

En cas de doute sur les résultats fournis par les méthodes classiques de mesure des facteurs, on peut avoir recours à des techniques de dosage insensibles aux LA : chromogéniques, immunologiques ou chronométriques faisant appel à des plasmas déficients d'origine animale.

Le principe du diagnostic différentiel entre LA, déficit en facteur et inhibiteur anti-facteur est résumé dans le *tableau II*.

– Devant un allongement concomitant du temps de Quick et du TCA, on doit exclure, en dosant les facteurs du complexe prothrombinique, l'éventualité rare d'un déficit acquis en prothrombine associé à la présence d'un LA, qui peut s'accompagner d'un grave syndrome hémorragique. Ce syndrome d'hypoprothrombinémie acquise (pour revue, voir 24) rencontré le plus souvent chez des enfants, dans un contexte auto-immun ou infectieux est dû à la présence d'anticorps anti-prothrombine, non neutralisants, mais responsables d'une épuraison rapide des complexes antigène-anticorps (4).

10. Interférence des LA dans d'autres tests de coagulation

Les LA sont susceptibles d'interférer dans n'importe quel test chronométrique faisant intervenir des phospholipides.

Deux exemples peuvent être cités.

– Certains LA "forts" sont capables de prolonger le temps de Quick, en principe peu sensible à leur présence. Ce phénomène peut être évoqué devant la découverte d'un abaissement plus ou moins marqué du taux de prothrombine en présence de facteurs du complexe prothrombinique normaux (leur mesure étant effectuée sur une dilution du plasma qui minimise l'effet de l'inhibiteur). Cette interférence dans la détermination du temps de Quick peut s'avérer très gênante pour le suivi de patients traités par antivitamines K dans le cadre d'un syndrome des antiphospholipides car l'INR obtenu ne reflète alors plus le degré réel d'anticoagulation (23).

Plusieurs études internationales sont en cours pour tenter de résoudre ce problème : elles ont pour but de préciser l'influence des thromboplastines utilisées pour déterminer l'INR en présence de LA et de valider des méthodes alternatives de surveillance thérapeutique comme le "prothrombin-proconvertin time" (proche du thrombotest d'Owren) ou la mesure de facteurs vitamine-K dépendants (X ou II) par des techniques insensibles aux LA.

- D'autres tests faisant partie du bilan étiologique d'une thrombose "insolite", comme certains tests de dépistage d'une résistance à la protéine C activée (facteur V Leiden) reposant sur le principe du TCA peuvent être faussés par la présence de LA : il est alors recommandé d'avoir recours à des techniques incluant une dilution de l'échantillon dans du plasma déficient en facteur V, qui améliorent considérablement la spécificité du dépistage vis-à-vis de la mutation Leiden.

Conclusion

Des progrès incontestables ont été accomplis au cours des dernières années, dans la standardisation

du diagnostic biologique des LA. Le mérite en revient en grande partie aux experts réunis au sein de groupes de travail comme le sous-comité "Lupus anticoagulant/phospholipid-dependent antibodies" de l'ISTH ou la Commission hémostasie de la Société française de biologie clinique, qui à l'occasion de confrontations régulières et d'études collaboratives, ont formulé des recommandations sur des aspects méthodologiques importants.

Parallèlement, les industriels du diagnostic ont mis à la disposition des biologistes une large gamme de réactifs performants.

Certains problèmes restent posés, notamment celui de l'absence de standard biologique de LA, qui rend difficile l'évaluation des nouveaux tests et impossible à ce jour la quantification de ces anticorps.

D'autre part, l'évolution des connaissances sur la diversité immunologique des LA, reflétée par l'hétérogénéité de leur comportement dans les tests de coagulation, laisse penser qu'il peut également exister une diversité d'associations cliniques. La valeur prédictive des tests de diagnostic pour la survenue de complications cliniques reste à établir au travers d'études prospectives.

BIBLIOGRAPHIE

- AMES P.R.J., PYKE S., IANNACCONE L., BRANCACCIO V. - Antiphospholipid antibodies, haemostatic variables and thrombosis : a survey of 144 patients. *Thromb. Haemost.*, 1995, **73** : 768-773.
- ARNOUT J., HUYBRECHTS E., VAN RUSSELT M., VERMYLEN J. - A new lupus anticoagulant neutralization test based on platelet-derived microvesicles. *Br. J. Haematol.*, 1992, **80** : 341-346.
- ARNOUT J., VAN RUSSELT M., HUYBRECHTS E., VERMYLEN J. - Optimisation of the dilute prothrombin time for the detection of the lupus anticoagulant by use of a recombinant tissue thromboplastin. *Thromb. Haemost.*, 1993, **69** : 1222 (abstr).
- BAJAJ S.P., RAPAPORT S.I., FIERER D.S. et al. - A mechanism for the hypoprothrombinemia of the acquired hypoprothrombinemia - lupus anticoagulant syndrome. *Blood*, 1983, **61** : 684-692.
- BEVERS E.M., GALLI 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.*, 1991, **66** : 629-632.
- BRANDT J.T., BARNA L.K., TRIPLETT D.A. - Laboratory identification of lupus anticoagulants : results of the second international workshop for identification of lupus anticoagulants. On behalf of the subcommittee on lupus anticoagulants/antiphospholipid antibodies of the ISTH. *Thromb. Haemost.*, 1995, **74** : 1597-1603.
- BRANDT J.T., TRIPLETT D.A., ALVING B., SCHARRE I. - Criteria for the diagnosis of lupus anticoagulants : an update. *Thromb. Haemost.*, 1995, **74** : 1185-1190.
- CLYNE L.P., HONIG C.L., DAINIAK N. - Correction of clotting factor "deficiencies" in plasma from patients with lupus like anticoagulants. *Thromb. Haemost.*, 1984, **51** : 317-320.
- CLYNE L.P., WHITE P.F. - Time dependance of lupus like anticoagulants. *Arch. Int. Med.*, 1988, **148** : 1060-1063.
- CONLEY C.L., HARTMANN R.C. - A hemorrhagic disorder caused by circulating anticoagulants in patients with disseminated lupus erythematosus. *J. Lab. Clin. Invest.*, 1952, **31** : 621-622.
- DENIS-MAGDELAINE A., FLAHAULT A., VERDY E. - Sensitivity of sixteen APTT reagents for the presence of lupus anticoagulants. *Haemostasis*, 1995, **25** : 98-105.
- ESCHWEGE V., SEDDIKI S., ROBERT A. - The tissue thromboplastin inhibition test in the detection of lupus anticoagulants : importance of a correction factor eliminating the influence of fibrinogen level. *Thromb. Haemost.*, 1996, **76** : 65-68.
- EXNER T., RICKARD K.A., KRONENBERG H.A. - A sensitive test demonstrating lupus anticoagulant and its behavioural patterns. *Br. J. Haematol.*, 1978, **40** : 143-151.
- EXNER T., TRIPLETT D.A., TABERNER D., MACHIN S.J. - Guidelines for testing and revised criteria for Lupus Anticoagulants. *Thromb. Haemost.*, 1991, **65** : 320-322.
- FORASTIERO R.R., CERRATO G.S., CARRERAS L.O. - Evaluation of recently described tests for detection of the lupus anticoagulant. *Thromb. Haemost.*, 1994, **72** : 728-733.
- GALLI M., FINAZZI G., BEVERS E.M., BARBUI T. - Kaolin clotting time and dilute Russell's viper venom time distinguish between prothrombin-dependent and β_2 -glycoprotein I-dependent antiphospholipid antibodies. *Blood*, 1995, **86** : 617-623.
- GINSBERG J.S., WELLS P.S., BRILL-EDWARDS P. et al. - Antiphospholipid antibodies and venous thromboembolism. *Blood*, 1995, **86** : 3685-3691.
- GOUEMAND J., CARON C., DE PROST D. et al. for the Working group on haemostasis of the Société française de biologie clinique - Evaluation of sensitivity and specificity of a standardized procedure using different reagents for the detection of lupus anticoagulants. *Thromb. Haemost.*, 1997, **77** : 336-342.
- HAEMOSTASIS COMMITTEE OF THE "SOCIÉTÉ FRANÇAISE DE BIOLOGIE CLINIQUE" - Laboratory heterogeneity of lupus anticoagulant : a multicentre study using different clotting assays on a panel of 78 samples. *Thromb. Res.*, 1992, **66** : 349-364.
- HASELAAR P., DERKSEN R., BLOKZIJL L. et al. - Risk factors for thrombosis in lupus patients. *Ann. Rheum. Dis.*, 1989, **48** : 933-940.
- HORBACH D.V., OORT D., DONDEERS J.M. et al. - Lupus anticoagulant is the strongest risk factor for both venous and arterial thrombosis in patients with systemic lupus erythematosus. *Thromb. Haemost.*, 1996, **76** : 916-924.
- KACZOR D.A., BICKFORD N.N., TRIPLETT D.A. - Evaluation of different mixing study reagents and dilution effect in lupus anticoagulant testing. *Am. J. Clin. Pathol.*, 1991, **95** : 408-411.
- LE D.T., WEIBERT R.T., SEVILLA B.K. et al. - The international normalized ratio (INR) for monitoring warfarin therapy : reliability and relation to other monitoring methods. *Ann. Int. Med.*, 1994, **120** : 552-558.
- LEE M.T., NARDI M.A., HU G. et al. - Transient hemorrhagic diathesis associated with an inhibitor of prothrombin with lupus anticoagulant in a 1 1/2-year-old girl : report of a case and review of the literature. *Am. J. Hematol.*, 1996, **51** : 307-314.

25. LOVE P.E., SANTORO S.A. – Antiphospholipid antibodies : anticardiolipin and the lupus anticoagulant in systemic lupus erythematosus (SLE) and in non SLE disorders. Prevalence and clinical significance. *Ann. Int. Med.*, 1990, **112** : 682-698.
26. MARTINUZZO M.E., FORASTIERO R.R., VRDOLJAK L., CARRERAS L.O. – Evaluation of different criteria of mixing studies for diagnosis of the lupus anticoagulant. *Thromb. Haemost.*, 1995, **73** : 1267.
27. RAUCH J., TANNENBAUM M., JANOFF A.S. – Distinguishing plasma lupus anticoagulants from antifactors antibodies using hexagonal (II) phase antiphospholipids. *Thromb. Haemost.*, 1989, **62** : 892-896.
28. RAUCH J., TANNENBAUM M., TANNENBAUM H. et al. – Human hybridoma lupus anticoagulants distinguish between lamellar and hexagonal phase lipid systems. *J. Biol. Chem.*, 1986, **261** : 9672-9677.
29. ROBERT A. – Two different incubation times for the activated partial thromboplastin time (APTT) : a new criterion for diagnosis of lupus anticoagulant. *Thromb. Haemost.*, 1994, **71** : 220-224.
30. ROONEY A.M., Mc NALLY T., MACKIE I.J., MACHIN S.J. – The Taipan snake venom time : a new test for lupus anticoagulant. *J. Clin. Pathol.*, 1994, **47** : 497-501.
31. ROSNER E., PAUZNER R., LUSKY A. et al. – Detection and quantitative evaluation of lupus circulating anticoagulant activity. *Thromb. Haemostas.*, 1987, **57** : 144-147.
32. ROUBEY R.A.S., PRATT C.W., BUYON J.P., WINFIELD J.B. – Lupus anticoagulant activity of autoimmune antiphospholipid antibodies is dependent upon β_2 - glycoprotein I. *J. Clin. Invest.*, 1992, **90** : 1100-1104.
33. ROUBEY R.A.S. – Autoantibodies to phospholipid-binding plasma proteins : a new view of lupus anticoagulants and other "antiphospholipid" autoantibodies. *Blood*, 1994, **84** : 2854 - 2867.
34. SAXENA R., SARAYA A.K., KOTTE V.K. et al. – Inosithin neutralization test to measure lupus anticoagulants. *Am. J. Clin. Pathol.*, 1993, **99** : 61-64.
35. SCHLEIDER M.A., NACHMAN R.L., JAFFE E.A., COLEMAN M.A. – A clinical study of lupus anticoagulant. *Blood*, 1976, **48**, 499-509.
36. SHAPIRO S.S. – The lupus anticoagulant/antiphospholipid syndrome. *Annu. Rev. Med.*, 1996, **47** : 533-553.
37. STEVENSON K.J., SEDDON J.M. – The role of lipids in the detection of lupus anticoagulants by the dilute Russell viper venom test : are platelets or reagents containing hexagonal H II phases necessary ? *Br. J. Haematol.*, 1994, **86** : 583-589.
38. THIAGARAJAN P., PENG V., SHAPIRO S.S. – The use of dilute Russel viper venom time for the diagnosis of lupus anticoagulants. *Blood*, 1986, **68** : 869-874.
39. TRIPLETT D.A. – Protean clinical presentation of antiphospholipid-protein antibodies (APA). *Thromb. Haemost.*, 1995, **74** : 329-337.
40. TRIPLETT D.A., BARNA L.K., UNGER G.A. – An hexagonal (II) phase phospholipid neutralization assay for lupus anticoagulant identification. *Thromb. Haemost.*, 1993, **70** : 787-793.
41. TRIPLETT D.A., BRANDT J.T., KACZOR D., SCHAEFFER J. – Laboratory diagnosis of lupus inhibitors : a comparison of the tissue thromboplastin inhibition procedure with a new platelet neutralization procedure. *Am. J. Clin. Pathol.*, 1983, **79** : 678-682.
42. TRIPLETT D.A., STOCKER K.F., UNGER G.A., BARNA L.K. – The textarin/ecarin ratio : a confirmatory test for lupus anticoagulants. *Thromb. Haemost.*, 1993, **70** : 925-931.
43. WORKING GROUP ON HEMOSTASIS OF THE SOCIETE FRANÇAISE DE BIOLOGIE CLINIQUE – Comparison of a standardized procedure with current laboratory practices for the detection of lupus anticoagulant in France. *Thromb. Haemostas.*, 1993, **70** : 781-786.