



Thèse

2008

Open Access

This version of the publication is provided by the author(s) and made available in accordance with the copyright holder(s).

---

Thrombopénie induite par l'héparine associée à une activation plaquettaire dépendante de l'IL-8 et à un syndrome des anticorps anti-phospholipides

---

Bounameaux, Claire

#### How to cite

BOUNAMEAUX, Claire. Thrombopénie induite par l'héparine associée à une activation plaquettaire dépendante de l'IL-8 et à un syndrome des anticorps anti-phospholipides. Doctoral Thesis, 2008. doi: 10.13097/archive-ouverte/unige:597

This publication URL: <https://archive-ouverte.unige.ch/unige:597>

Publication DOI: [10.13097/archive-ouverte/unige:597](https://doi.org/10.13097/archive-ouverte/unige:597)

**UNIVERSITE DE GENEVE**

**FACULTE DE MEDECINE**

Section de médecine Clinique  
Département de médecine interne  
Service d'angiologie et d'hémostase

Thèse préparée sous la direction du Professeur Philippe de Moerloose  
et du Docteur Daniel Genné, PD

---

# **THROMBOPENIE INDUITE PAR L'HEPARINE ASSOCIEE A UNE ACTIVATION PLAQUETTAIRE DEPENDANTE DE L'IL-8 ET A UN SYNDROME DES ANTICORPS ANTI-PHOSPHOLIPIDES**

Thèse  
présentée à la Faculté de Médecine  
de l'Université de Genève  
pour obtenir le grade de Docteur en médecine

par

Claire BOUNAMEAUX

de

Genève (GE)

**Thèse n° 10544**

Genève  
2008



**UNIVERSITÉ  
DE GENÈVE**

**FACULTÉ DE MÉDECINE**

## **DOCTORAT EN MEDECINE**

Thèse de :

**Madame Claire BOUNAMEAUX**

originaire de Genève (GE)

Intitulée :

**THROMBOPENIE INDUITE PAR L'HEPARINE ASSOCIEE  
A UNE ACTIVATION PLAQUETTAIRE DEPENDANTE DE L'IL-8  
ET A UN SYNDROME DES ANTICORPS ANTI-PHOSPHOLIPIDES**

La Faculté de médecine, sur le préavis de Monsieur Philippe DE MOERLOOSE, professeur associé au Département de médecine interne, et de Monsieur Daniel GENNE, privat-docent au Département de médecine interne, autorise l'impression de la présente thèse, sans prétendre par là émettre d'opinion sur les propositions qui y sont énoncées.

Genève, le 17 juin 2008

Thèse n° **10544**

Jean-Louis Carpentier  
Doyen

N.B. - La thèse doit porter la déclaration précédente et remplir les conditions énumérées dans les "Informations relatives à la présentation des thèses de doctorat à l'Université de Genève".

## **REMERCIEMENTS**

Au Professeur Philippe de Moerloose, mon directeur de thèse pour son aide précieuse dans un domaine très spécialisé,

Au Docteur Françoise Boehlen pour son investissement exceptionnel dans les analyses de laboratoires,

Au Docteur Daniel Genné, chef de service de médecine de l'Hôpital de La Chaux-de-Fonds pour son soutien,

Aux Docteurs Claire Pouplard et Aurélie Membré, à Tours, pour leur participation à la rédaction de l'article et pour la réalisation des tests spécialisés,

A mon père, enfin, pour ses vifs encouragements à mener à terme ce travail de thèse.

## SOMMAIRE

	Pages
1. Abréviations	4
2. Résumé	5
3. Introduction	6
4. Thrombopénie induite par l'héparine (TIH)	7
4.1 Définition	
4.2 Historique	
4.3 Classification	
4.4 Epidémiologie	
4.5 Physiopathologie	
4.6 Clinique	
4.7 Tests diagnostiques	
4.8 Diagnostic différentiel	
4.9 Prise en charge de la TIH et alternatives à l'héparine	
5. Syndrome des anticorps anti-phospholipides (SaPL)	36
5.1 Définition	
5.2 Classification	
5.3 Epidémiologie	
5.4 Pathogenèse et anticorps	
5.5 Clinique	
5.6 Tests diagnostiques	
5.7 Traitements	
6. Similitudes et différences entre la thrombopénie induite par l'héparine et le syndrome des anticorps anti-phospholipides	44
7. Introduction à l'article	45
8. Article original	46
9. Discussion de l'article	50
10. Conclusion	52
11. Références	53

## 1. ABREVIATIONS

AC	anticorps
AC anti PF4-H	anticorps anti-complexe PF4-Héparine
aCL	anticorps anti-cardiolipine
aPL	anticorps anti-phospholipides
AVC	accident vasculaire cérébral
Beta2GPI	bêta 2 glycoprotéine I
HBPM	héparine de bas poids moléculaire
HNF	héparine non fractionnée
Ig	immunoglobuline
IL-6, 8	interleukine 6, 8
LA	anticoagulant lupique
LED	lupus érythémateux disséminé
NAP2	neutrophil activating peptide 2
PAT	platelet aggregation test
PBP	platelet basic protein
PF4	facteur 4 plaquettaire
PF4-H	complexe facteur 4 plaquettaire-héparine
SaPL	syndrome des anticorps anti-phospholipides
SPR	spectroscopie de résonance plasmonique de surface
SRA	serotonin release assay
TIH	thrombopénie induite par l'héparine de type 2
VwF	facteur Von Willebrand

## **2. RESUME**

Des similitudes physiopathologiques entre le mécanisme du syndrome des anticorps anti-phospholipides et de la thrombopénie induite par l'héparine ont déjà été mises en évidence. Nous nous sommes intéressés à un cas clinique présentant simultanément les deux pathologies et pour lequel les tests diagnostiques les plus fréquemment utilisés pour le dépistage de la thrombopénie induite par l'héparine (dosage des anticorps anti-PF4, test d'agrégation plaquettaire) étaient négatifs. Nous avons mis en évidence un anticorps anti-IL-8 dont l'effet sur l'activation plaquettaire est dépendant de l'héparine. Ce dosage complémentaire devrait donc être effectué lors de forte suspicion de thrombopénie à l'héparine avec des tests diagnostiques anti-PF4 et agrégation plaquettaire négatifs. Nous nous interrogeons également sur l'éventuelle prédisposition de la thrombopénie à l'héparine chez les patients souffrant d'un syndrome des anticorps anti-phospholipides.

### **3. INTRODUCTION**

La thrombopénie induite par l'héparine (TIH) est une pathologie rare dont le diagnostic est basé sur la clinique et des tests biologiques. Il existe différents algorithmes décisionnels permettant de classer la probabilité d'une thrombopénie induite par l'héparine et ceux-ci comprennent les tests diagnostiques les plus couramment utilisés qui sont le dosage des anticorps anti-PF4 et le test d'agrégation plaquettaire.

Dans certains cas, on observe une différence entre une probabilité clinique estimée haute et des tests diagnostiques négatifs. Ceci est dû à l'insuffisante sensibilité-spécificité des tests, aux nombreux diagnostics alternatifs de thrombopénie et à la variété des anticorps présents. D'autres tests plus sensibles et plus spécifiques mais aussi plus coûteux ou plus techniques (radioactivité) existent cependant et dans certains cas sont nécessaires afin de poser un diagnostic de certitude.

A partir d'un cas clinique, nous montrerons la nécessité de pousser plus loin les investigations en cas de forte suspicion de TIH et nous discuterons également la question de l'intrication et de l'éventuelle prédisposition à une TIH en présence d'un syndrome des anticorps anti-phospholipides (SaPL).

La première partie du travail est constituée de deux volets qui résument les deux entités que sont la TIH et le SaPL. La deuxième partie du travail est consacrée à un cas clinique publié et à une discussion sur l'intrication des deux syndromes.



## **4. THROMBOPENIE INDUITE PAR L'HEPARINE**

### **4.1 Définition**

La TIH est diagnostiquée sur des critères cliniques et/ou biologiques : baisse absolue des thrombocytes à moins de 150 G/L ou baisse relative de plus de 50% de la valeur de base des thrombocytes avant le début de l'héparinothérapie, ou par la survenue d'une complication thromboembolique artérielle ou veineuse survenant pendant ou après une exposition à l'héparine indépendamment du mode d'administration et du type d'héparine (héparine non fractionnée ou HNF, héparine de bas poids moléculaire ou HBPM, danaparotide sodique) (1).

L'exposition est valable même si elle survient après héparinisation d'un cathéter ou la présence d'un cathéter enduit d'héparine. La dose d'héparine pouvant entraîner une TIH peut être très faible et une TIH est décrite même après une exposition unique de 250 U. Bien que sous HBPM le délai de survenue d'une TIH puisse excéder 3 semaines (2), si la thrombopénie survient après le 21<sup>ème</sup> jour d'exposition à l'héparine, la TIH devient moins vraisemblable et il faut rechercher une autre étiologie à la thrombopénie.

*In vitro*, on a décrit qu'un titre élevé d'anticorps de la TIH était capable d'activer les plaquettes même en l'absence d'héparine. Dans ces cas, la thrombopénie et les thromboses peuvent survenir plusieurs jours après l'arrêt du traitement héparinique.

### **4.2 Historique (3)**

1916 : McLean identifie une substance anticoagulante naturelle (4).

1918 : Howell et Holt nomment la substance héparine, du mot « hepar » qui signifie foie car elle est extraite de tissus hépatiques animaux (5).

1927 : Shionoya découvre que l'héparine ne prévient pas les thromboses induites par les plaquettes (6).

1937 : Crafoord effectue des études montrant que l'héparine prévient les thromboses (7).

1958 : Weismann associe des embols artériels au traitement par héparine en chirurgie. Il remarque que les embols sont d'origine plaquettaire et qu'ils surviennent dans un délai moyen de 10 jours après le début de l'héparinothérapie. Il remarque également que le phénomène cesse lorsque le traitement d'héparine est stoppé (8).

1964 : Roberts et ses collègues suspectent une origine immune au phénomène des thromboses induites par l'héparine (9).

1973 : Rhodes et ses collègues caractérisent les anticorps anti-héparine (10).

1975 : Fratantoni et ses collègues décrivent une agrégation plaquettaire et un relargage de sérotonine de plaquettes normales en présence d'héparine. Postulation que le facteur qui active les plaquettes est un anticorps (11).

1974 : Klein et Bell découvrent qu'il existe des thrombopénies d'origine non-immune (12).

1989 : Chong et Berndt nomment TIH type I quand il n'y a pas d'anticorps et TIH type II quand c'est d'origine immune (13).

1992 : Amiral décrit que l'antigène reconnu par les anticorps du TIH consiste en un complexe héparine-PF4 (14).

1994 : Greinacher et ses collègues objectivent que des concentrations élevées d'héparine en solution induisent un relargage du PF4 provenant de complexes héparine-PF4 liés de façon covalente. On pense donc que de hautes concentrations d'héparine inhibent l'activation plaquettaire par la rupture du complexe multimoléculaire à la surface plaquettaire (15).

### **4.3 Classification**

Il existe deux types de thrombopénie induite par l'héparine :

<b><u>Type 1</u></b>	Non immun	Précoce	Bénin	Régresse malgré poursuite héparine
<b><u>Type 2</u></b>	Immun	Tardif	Grave	Ne régresse pas

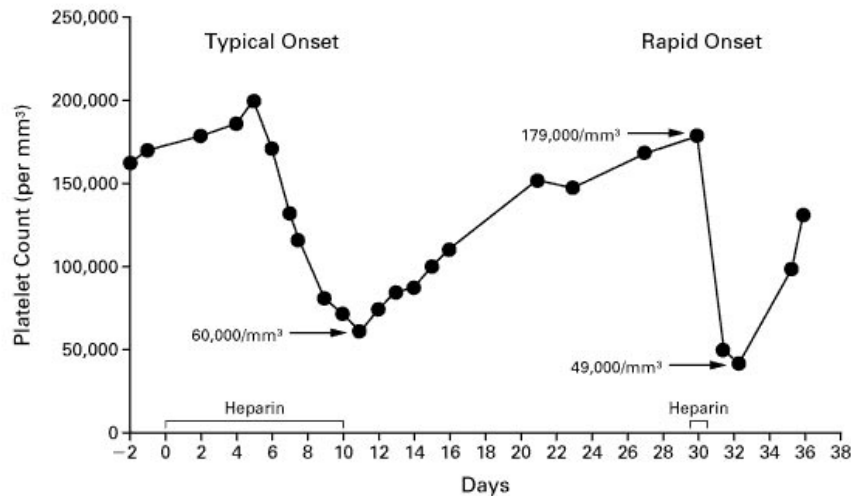
La TIH de type 1 consiste en une thrombopénie survenant de manière précoce soit moins de 5 jours après l'initiation de l'héparinothérapie et est due à une interaction directe entre les plaquettes et l'héparine. La thrombopénie régresse malgré la poursuite de l'héparine et la réaction est considérée comme bénigne. L'héparinothérapie peut être poursuivie.

La TIH de type 2 consiste en une thrombopénie due à une réaction immune et survient en général entre le 5<sup>ème</sup> et le 10<sup>ème</sup> jour mais peut survenir plus rapidement s'il y a eu exposition à l'héparine dans les 100 jours qui précèdent en raison de la persistance d'anticorps circulants. La thrombopénie s'installe alors de manière abrupte, déjà après quelques heures (16). Une fois que l'héparine arrêtée, le compte plaquettaire se normalise en 4 à 14 jours (17).

Dans la suite de ce travail, le terme TIH désignera uniquement la réaction auto-immune de type 2 de thrombopénie induite par l'héparine.

La figure 1 illustre la cinétique typique d'une TIH. Dans un premier temps, on observe une chute progressive des plaquettes après l'introduction d'héparine puis une normalisation du taux dès l'arrêt de l'héparine. Dans un deuxième temps, on note une chute rapide et précoce des plaquettes après tentative de réintroduction d'héparine.

Figure 1 : cinétique classique de la TIH



Warkentin & Kelton *NEJM* 2001;344:1286

#### 4.4 Epidémiologie

Les chiffres varient largement d'une publication à l'autre et dépendent du type de patient et du type d'héparine employé.

##### 4.4.1 Type de patient (HNF)

Chirurgie (18)	3%
Chirurgie cardio-vasculaire ou orthopédique (19,20)	5%
Médecine (21)	1%

La TIH n'est pratiquement pas décrite en pédiatrie (22) ni chez les patients obstétricaux (23) ni chez les patients dialysés au long cours (24-26).

Pendant la grossesse, la TIH semble se produire moins fréquemment. Une hypothèse est que les glycosaminoglycanes augmentent, ce qui diminuerait la pathogénicité des anticorps liés à la TIH. Le passage des anticorps par le placenta est possible (3).

#### 4.4.2 Type d'héparine

##### 4.4.2.1 Sous héparine non fractionnée pendant >4 jours :

TIH type I :            10-20% des patients  
TIH type II :            0,2 à 3% des patients

##### 4.4.2.2 Comparaison HBPM et HNF après chirurgie de la hanche :

HNF            2,7% de TIH  
HBPM            0,2% de TIH

##### 4.4.2.3 Comparaison HNF et HBPM en général

L'incidence de la TIH est 10 fois plus élevée avec une HNF qu'avec une HBPM (27). Les patients qui ont déjà été exposés à une HNF et qui reçoivent dans les 100 jours qui suivent une HBPM développent plus fréquemment et plus rapidement une TIH que ceux qui n'avaient pas été exposés récemment (28).

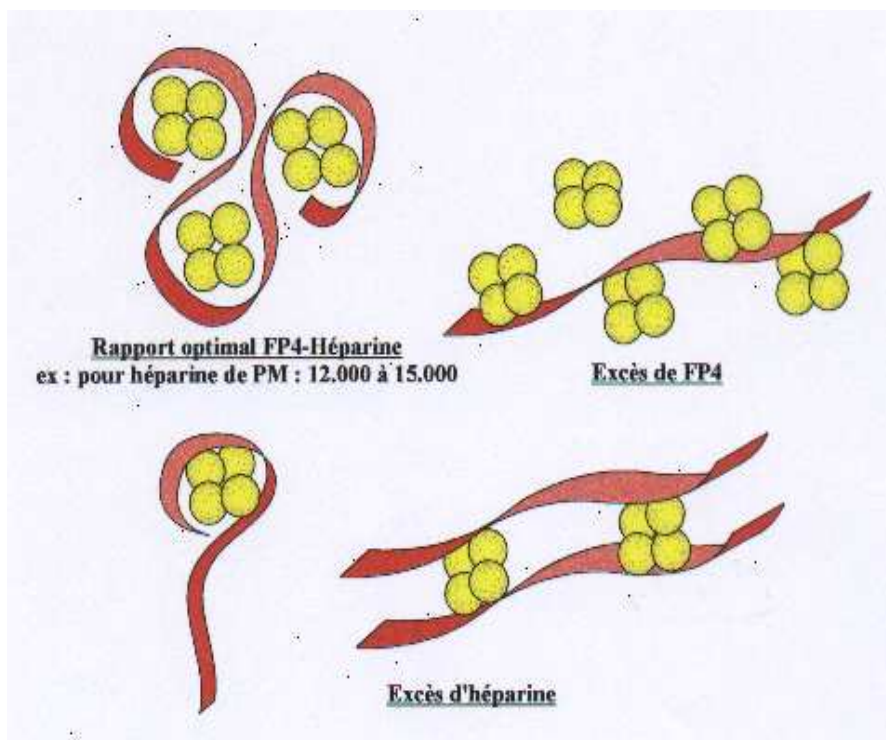
Les héparines d'origine bovine (qui ne sont en principe plus utilisées actuellement) étaient associées à une fréquence plus élevée de TIH que les héparines d'origine porcine.

#### 4.5 Physiopathologie

##### 4.5.1 Formation d'un complexe héparine-PF4

L'héparine chargée négativement se fixe sur le PF4 (protéine endogène des granules plaquettaires  $\alpha$ ) qui est un récepteur de la membrane plaquettaire chargé positivement (29-31).

Figure 2 : Rapport héparine /PF4 optimal pour la formation des complexes fixant les AC anti-PF4



*D'après J Amiral*

#### 4.5.2 Formation d'anticorps reconnaissant le complexe héparine-PF4

Les anticorps, majoritairement de type IgG mais aussi de type IgM ou IgA, reconnaissent le complexe héparine-PF4 et se fixent à un récepteur Fc gamma R II a situé sur la plaquette. Parfois on trouve seulement des IgM ou des IgA. La réponse immune induite est polyclonale. Les anticorps sont spécifiques pour des épitopes variables et sont donc multiples chez un même patient. Il existe des anticorps qui reconnaissent des épitopes qui sont exposés seulement en présence de molécules d'héparine (32).

Dans environ 75% des cas, les patients développent des anticorps avec une spécificité qui implique l'héparine et le PF4. Dans un quart des cas, les anticorps se lient *in vitro* à des épitopes qui sont situés exclusivement sur le PF4 (32).

Les anticorps qui reconnaissent le complexe héparine-PF4 se fixent aussi sur les héparans sulfates de l'endothélium et l'activent. Cette activation augmente l'expression de cytokines telle l'interleukine-6 (IL-6) et celle du facteur de von Willebrand (VwF).

L'épitope de l'héparine qui est reconnu par l'anticorps est différent de l'épitope auquel se lie le PF4. L'épitope du PF4 est exposé seulement quand le PF4 est fixé à l'héparine ou immobilisé *in vitro* sur du polystyrène (changement de conformation).

#### 4.5.3 Interleukine-8 (IL-8) et neutrophil activating peptide 2 (NAP2)

Dans 15 % des cas on ne retrouve pas d'anticorps anti-PF4-héparine et d'autres antigènes comme l'IL-8 et le NAP2 sont impliqués (15).

Le NAP2 est issu de la PBP soit la Platelet Basic Protein qui est stockée dans les granules  $\alpha$  des mégacaryocytes. Un clivage sur la portion N-terminal conduit à la formation de la CTAP-III qui est présente dans les granules plaquettaires  $\alpha$ . Celle-ci est clivée en  $\beta$ TG lors de l'activation plaquettaire puis en NAP2. Le NAP2 présente une homologie de 60% avec le PF4, incluant la partie C-terminale de l'hélice  $\alpha$  qui est probablement impliquée dans la liaison avec l'héparine (33, 34). Toutes les protéines dérivées de la PBP se lient à l'héparine mais leur affinité est moindre que celle du PF4.

L'IL-8 est relâchée par les cellules endothéliales sous forme d'une protéine de 77 acides aminés et par les monocytes et les neutrophiles sous une forme raccourcie de 72 acides aminés. Il s'agit d'une chemokine qui attire et active les neutrophiles et aussi d'un agent de l'angiogenèse. L'IL-8 a 40% d'acides aminés en commun avec le PF4 mais se lie à l'héparine avec une affinité moindre que le NAP2 et le PF-4 (35). Il est décrit qu'une tumeur ou une arthrite sévère peuvent contribuer à la formation d'anticorps contre l'IL-8 (32).

La présence d'auto-anticorps dirigés contre l'IL-8 ou le NAP2 n'est pas dépendante de l'héparine. Ces anticorps sont dirigés contre ces chemokines et pas contre l'héparine. La thrombopénie pourrait résulter du même mécanisme qu'avec le PF4 ou d'un autre mécanisme lors duquel l'héparine mobilise l'IL-8 et le NAP2 déjà présents (33).

Des auto-anticorps dirigés contre l'IL-8 ont été décrits chez des individus sains à de faibles concentrations et à des concentrations élevées dans certains états inflammatoires comme des tumeurs, des infections, après une opération chirurgicale ou dans des maladies auto-immunes (36-38).

#### 4.5.4 Fixation des anticorps sur les plaquettes

La fixation des anticorps se fait via l'interaction entre leur portion Fab et la partie FCgammaRII des récepteurs membranaires plaquettaires (CD32).

Pour les complexes immuns avec des IgM et des IgA, il existe une possible implication des monocytes et des neutrophiles qui expriment les récepteurs Fc- $\alpha$ R pour les complexes avec des IgA et des lymphocytes qui exposent des récepteurs Fc- $\mu$ R pour les complexes avec IgM (32).

#### 4.5.5 Activation plaquettaire

Le récepteur plaquettaire activé induit la formation de phospholipase C ce qui entraîne l'expression du complexe GPIIb/IIIa activé sur la surface plaquettaire membranaire qui induit l'agrégation plaquettaire.

Les inhibiteurs du complexe GPIIb/IIIa bloquent l'agrégation plaquettaire induite par l'ADP, l'acide arachidonique, le collagène, la thrombine et le peptide activateur du récepteur à la thrombine et *in vitro* de l'agrégation plaquettaire induite par les anticorps anti-PF4-heparine (39-41).

Certains auteurs pensent que la SR121566A présente un intérêt clinique en prophylaxie de la TIH ou souffrant d'une TIH ; en effet leur idée est de bloquer la GPIIb/IIIa activée qui est un récepteur plaquettaire membranaire avec un antagoniste, le SR121566A, pour empêcher l'activation plaquettaire de la TIH (42).

L'activation plaquettaire consiste en le relargage de granules  $\alpha$  contenant du PF4, de la sérotonine et de l'ADP qui activent les cellules endothéliales et qui induisent l'expression du facteur tissulaire sur la surface des cellules endothéliales (43).

#### 4.5.6 Formation de microparticules dérivées des plaquettes

On trouve dans le sérum des patients avec une TIH des microparticules dérivées des plaquettes qui ont une activité pro-coagulante. Ces microparticules pourraient contribuer à la formation de thromboses. Leur taux dépend de la dose d'héparine (44).



#### 4.5.7 P-sélectines

Les P-sélectines sont des glycoprotéines membranaires qui se trouvent dans les granules plaquettaires  $\alpha$  et dans les corps de Weibel-Palade des cellules endothéliales. Après l'activation plaquettaire, les P-sélectines sont exprimées sur la membrane plasmique (45) et sécrétées dans le plasma (46). Leur rôle est de favoriser le recrutement et l'adhésion des leucocytes. L'élévation des P-sélectines reflète l'activation des cellules endothéliales et des plaquettes. Une équipe a mesuré les valeurs de P-sélectine et les taux d'anticorps anti-PF4 et a objectivé qu'un taux élevé de P-sélectine lors d'une TIH était associé avec des complications thromboemboliques (47).

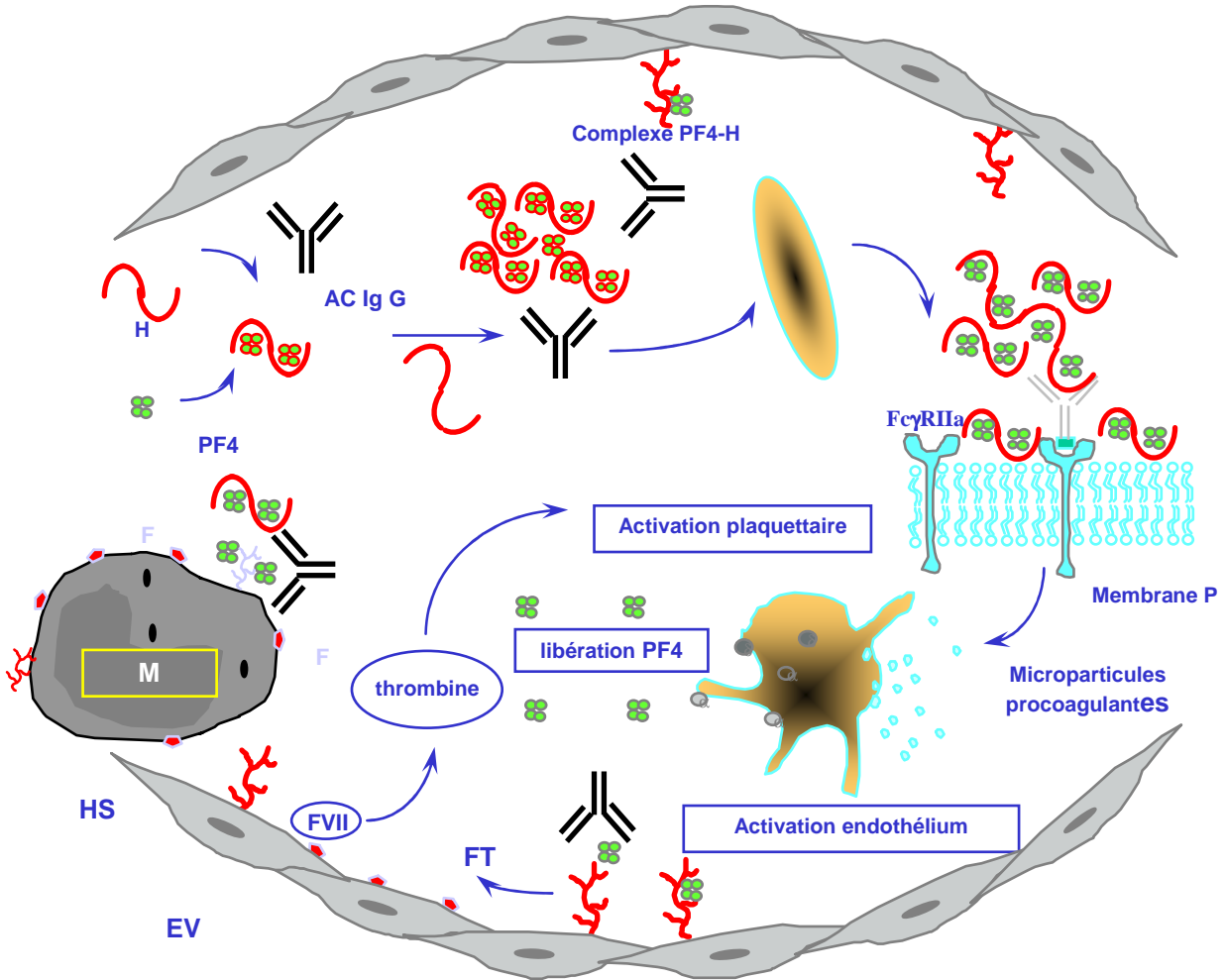
#### 4.5.8 Agrégation plaquettaire

L'activation plaquettaire est suivie d'une agrégation plaquettaire (on parle de la formation d'un thrombus plaquettaire, blanc ou white clot). Les plaquettes sensibilisées sont éliminées rapidement ce qui induit une thrombopénie.

#### 4.5.9 Activation des cellules endothéliales

Les cellules endothéliales ont besoin des plaquettes pour être activées via la beta2GPI (48). Les cellules endothéliales sont aussi activées via l'ADP car si celui-ci est bloqué par de l'apyrase ou par un inhibiteur de son récepteur, l'activation des cellules endothéliales par les plaquettes est seulement diminué car ceci n'interfère pas avec l'adhésion plaquettaire mais uniquement avec l'amplification du phénomène (39-40, 48-53).

Figure 3 : Récapitulatif de la physiopathologie de la TIH



Légende Figure 3 : EV : endothélium vasculaire, P : plaquette, H : héparine, HS : héparan sulfate, M : monocyte, PF4 : facteur 4 plaquettaire, FT : facteur tissulaire.

#### 4.5.10 Différence d'affinité des anticorps

L'affinité des anticorps est différente selon qu'il s'agisse d'une HNF, d'une HBPM, du fondaparinux/ ou du danaparoïde sodique. La raison pour laquelle la TIH survient plus avec l'héparine non fractionnée qu'avec l'HBPM ou les molécules heparin-like plus petites comme le pentasaccharide (fondaparinux) est que ces polyanions se lient tous au PF4 mais la taille des différents complexes varie ainsi que le nombre de complexes formés. Les complexes dans lesquels deux tétramères de PF4 se lient à un polyanion d'héparine sont plus immunogènes et se forment plus quand le polyanion est de l'HNF. Il s'ensuit donc une différence d'immunogénicité, dans l'ordre, HNF puis HBPM puis fondaparinux (30).

Auparavant, le danaparoïde sodique était considéré comme une bonne alternative à l'héparine en cas de TIH (31) malgré une cross-réactivité de 10%. Tous les anticorps qui réagissaient avec le danaparoïde étaient des anticorps qui avaient une spécificité pour le complexe PF4-H et pas pour le PF4 seul. Un test a aussi été effectué après avoir fait des complexes avec PF4-HBPM et là, une réactivité croisée plus grande a été observée avec le danaparoïde sodique de 36%. Le danaparoïde sodique consiste surtout en des héparans sulfates et c'est sans doute à cause d'eux qu'on observe une réactivité croisée.

Les HBPM et le danaparoïde sodique ont une charge anionique moins importante que l'HNF et se lient donc moins aux protéines plasmatiques. L'HBPM est moins apte que l'HNF à modifier la structure du PF4 pour induire la formation d'anticorps sans liaison car il n'y a pas formation d'anticorps anti-PF4 seul mais seulement des anticorps anti PF4-H (32).

## **4.6 Clinique**

La raison pour laquelle les complications se développent chez certains patients et pas chez d'autres n'est pas claire. On observe cependant que le risque thrombotique est plus grand chez les patients avec un taux d'anticorps anti-PF4-H élevé ou avec une thrombopénie sévère (diminution de plus de 70%) ou avec la combinaison des deux (1). Que des anticorps soient dirigés contre les PF4-H, contre l'IL-8 ou contre NAP2, le taux de développement d'une thrombose est statistiquement comparable (33).

### **4.6.1 Thromboses artérielle ou veineuse et embolie pulmonaire**

Les complications thrombotiques se produisent fréquemment sur un site vasculaire endommagé. Les thromboses artérielles (moins fréquentes que les thromboses veineuses) peuvent entraîner un AVC, un infarctus du myocarde, une ischémie d'un membre ou un infarctissement d'un organe (54). Les sites préférentiels des thromboses artérielles sont l'aorte abdominale et ses branches mais tous les territoires peuvent être touchés (2). D'une manière générale les thromboses veineuses sont plus fréquentes chez les patients orthopédiques et médicaux et les thromboses artérielles sont aussi fréquentes que les thromboses veineuses chez les patients de chirurgie cardiaque ou vasculaire. Le risque de thrombose reste élevé pendant quelques jours à quelques semaines après l'arrêt de l'héparine et même lorsque le compte plaquettaire est redevenu normal. Par rapport à la cinétique, tout est décrit : la thrombose peut survenir avant, concomitamment ou après la

thrombopénie. Il faut donc suspecter une TIH même en l'absence de thrombopénie si une thrombose survient lors d'une héparinothérapie (55,56).

Le risque de thrombose chez un patient avec une TIH est 30 fois plus élevé que dans la population normale. La fréquence de survenue des thromboses artérielles ou veineuses varie selon les références. Elle varie entre 20 et 50% mais s'élève jusqu'à 65%. Les embolies pulmonaires surviennent dans 10-25% des cas de TIH. La mortalité est élevée entre 8 et 20% (2, 57-61).

#### 4.6.2 Complications neurologiques

Il s'agit d'AVC ischémiques, de thromboses veineuses cérébrales, d'états confusionnels ou d'amnésies transitoires qui surviennent chez environ 10% des patient(e)s (2).

#### 4.6.3 Nécrose cutanée

La nécrose cutanée induite par l'héparine est rare et atypique et se produit surtout sur les endroits gras comme l'abdomen ou bien sur les extrémités et le nez.

#### 4.6.4 Autres manifestations rares et atypiques

De rares cas de nécrose hémorragique des surrénales et de gangrène veineuse des membres ont été décrits.

#### 4.6.5 Hémorragie

Comme la thrombopénie est rarement très sévère (rarement inférieure à 10 G/L), la TIH n'entraîne pas d'hémorragie. La thrombopénie n'est pas sévère car il n'y a pas beaucoup d'anticorps qui se lient aux plaquettes et donc ces plaquettes ne sont pas éliminées par le système réticulo-endothélial.

## **4.7 Tests diagnostiques**

Le diagnostic se base surtout sur la clinique et la présence d'une thrombopénie mais une fois qu'une TIH est suspectée, il existe plusieurs tests diagnostiques. Ces tests ne sont pas disponibles partout et leur sensibilité/spécificité est très variable. Il y a des tests fonctionnels qui objectivent l'activation plaquettaire et des tests immuns qui détectent la présence d'anticorps. Il existe également des scores de probabilité incluant des paramètres cliniques, la sévérité de la thrombopénie et le résultat des tests. Ils permettant d'évaluer le risque qu'il s'agisse d'une TIH plutôt que d'une autre cause de thrombopénie. Après l'arrêt de l'héparine, on peut observer un effet rebond du compte plaquettaire qui plaide également pour une TIH. Parmi les nombreux tests existants, certains sont techniquement difficiles, coûtent très cher ou demandent trop de temps pour être utilisés dans des laboratoires de routine (62, 63).

### **4.7.1 Sensibilité et spécificité**

Il existe des tests plutôt spécifiques tels le Serotonin release assay (SRA) ou le Platelet aggregation test (PAT) ainsi que des tests plutôt sensibles tels la détection des anticorps anti-PF4 (19, 63, 64, 67, 68).

	<b><u>sensibilité</u></b>	<b><u>spécificité</u></b>
Dosage des anti PF4	97%	74-86%
SRA	88-100%	89-100%
PAT	90%	77-100%

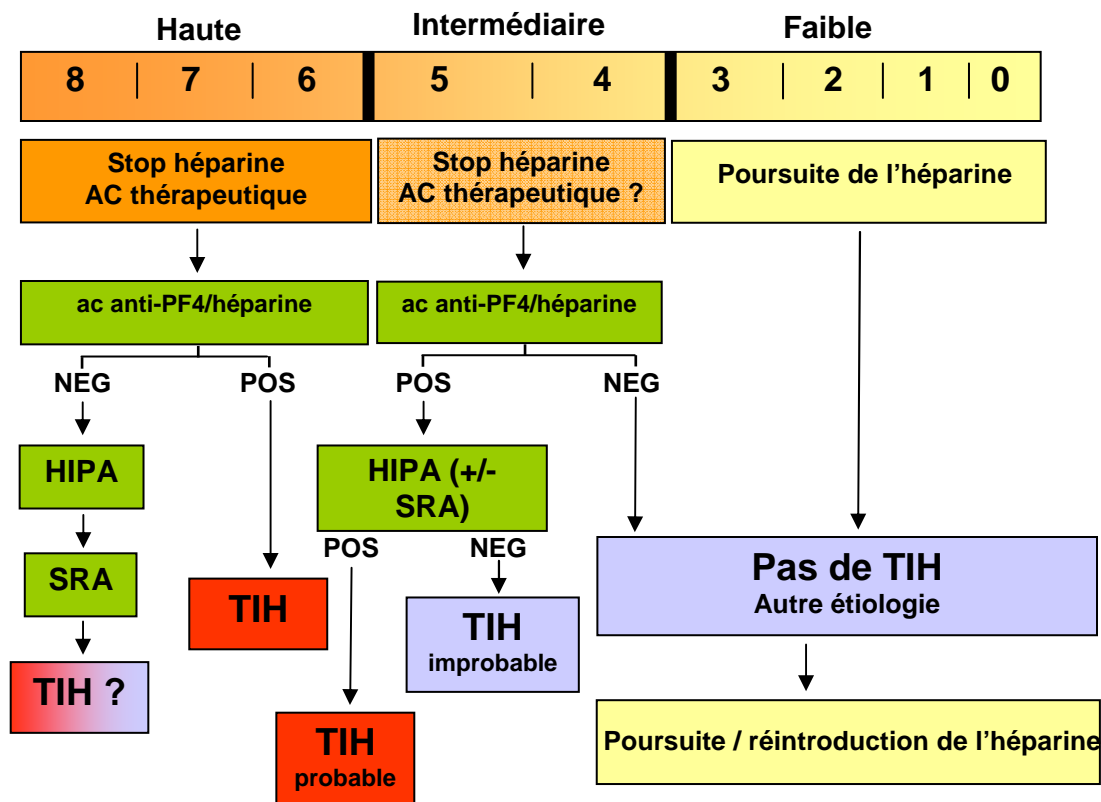
La figure 4 illustre une proposition d'algorithme de prise en charge de la TIH en fonction de la sévérité de la thrombopénie, du délai entre la thrombopénie et la diminution des plaquettes et de la présence d'une thrombose.

Figure 4 : Algorithme d'aide diagnostic en cas de suspicion de TIH

1. Score de probabilité pré-test (ou TTT)

	2	1	0
Thrombocytopenia	>50% platelet fall to nadir 20	30-50% platelet fall, or nadir 10-19	<30% platelet fall, or nadir <10
Timing* of onset of platelet fall (or other sequelae of HIT)	Days 5-10, or day 1 with recent heparin (past 30 days)	> day 10 or timing unclear, or < day 1 with recent heparin (past 31-100 days)	< day 4 (no recent heparin) None
Thrombosis or other sequelae	Proven new thrombosis; skin	Progressive or recurrent thrombosis, erythematous	Definite

2. Algorithme d'aide au diagnostic en fonction de la probabilité pré-test

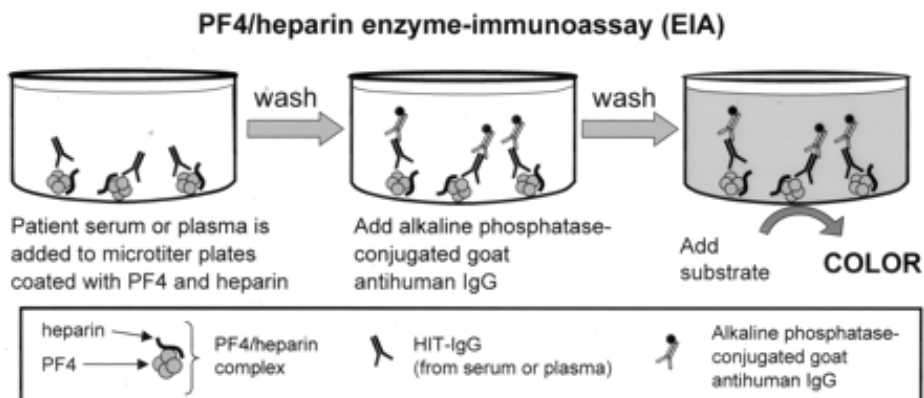


#### 4.7.2 Détection d'anticorps anti-PF4

Il s'agit d'un test immunologique de phase solide type ELISA. Il ne s'agit pas d'un test fonctionnel. Des complexes PF4-H sont étalés sur une plaque et on y rajoute le sérum du patient. Si des anticorps sont présents dans le sérum ils vont se lier au complexe ce qui va être détecté avec un deuxième anticorps. Les anticorps anti-PF4 disparaissent de la circulation dans une médiane de 85 jours (16).

La sensibilité de ce test est de l'ordre de 90% et sa spécificité médiocre car les anticorps peuvent être présent sans qu'il n'y ait de TIH. La valeur prédictive positive est basse. La spécificité est améliorée avec un dosage des IgG seuls (69-71).

Figure 5 : Illustration du test Elisa pour la détection des AC anti-PF4



Warkentin Chest 2005;127:35S

### 4.7.3 Test d'agrégation plaquettaire (PAT)

Le test d'agrégation plaquettaire est un test fonctionnel. Le sérum du patient est mis en présence de plaquettes lavées d'un donneur sain ou en présence de plasma riche en plaquettes. S'il y a agrégation, cela signifie qu'il y a des anticorps qui déclenchent l'agrégation plaquettaire dans le sérum du malade. L'agrégation se mesure en trois temps : sans héparine (contrôle) puis avec une dose faible d'héparine (0,1 à 0,3 U/mL) puis avec une dose élevée d'héparine (10 à 100 U/mL). A chaque étape, on évalue l'agrégation plaquettaire.

Les méthodes pour détecter l'agrégation plaquettaire sont multiples : soit on utilise des plaquettes lavées et on peut effectuer un test visuel d'agrégation plaquettaire ou détecter l'ATP release par luminographie ou quantifier des microparticules dérivées des plaquettes par cytométrie de flux ou encore mesurer le relargage de sérotonine marquée (SRA), soit on utilise des plaquettes dans du plasma citraté riche en plaquettes et on quantifie la liaison de l'annexine V aux phospholipides anioniques exprimés sur les plaquettes activées par cytométrie de flux ou l'agrégation plaquettaire par agrégométrie.

Le test est positif s'il n'y a pas d'agrégation sans héparine, agrégation avec une faible dose d'héparine et pas d'agrégation avec une dose élevée d'héparine. La concentration optimale d'héparine est entre 0,1 et 1,0 ml. Avec ces concentrations, la sensibilité varie de 39% avec les plaquettes les moins réactives à 81% avec les plaquettes les plus réactives. Les tests d'agrégation plaquettaires sont valables quel que soit l'anticorps impliqué (AC anti PF4-H, AC anti IL-8, AC anti NAP2) (33).

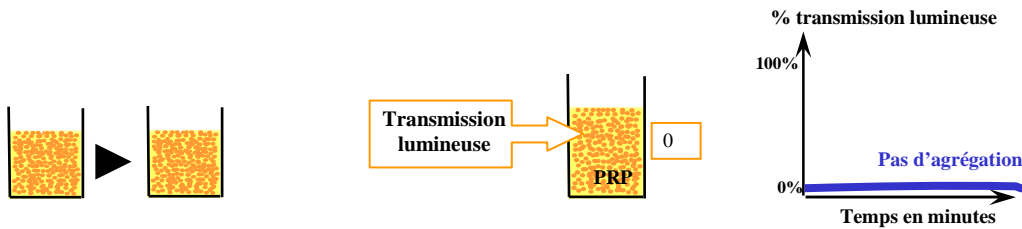
Deux variables ont particulièrement un effet sur la sensibilité et la spécificité du test : la dose d'héparine utilisée ainsi que le type de plaquettes utilisées (72, 73). En effet, la réaction est médiée par les récepteurs plaquettaires Fc et leur densité sur les plaquettes peut affecter les résultats du test.

La valeur prédictive positive varie en fonction de la concentration d'héparine et des plaquettes du donneur utilisées pour le test. Si les plaquettes sont lavées, la performance du test s'améliore (2, 74).

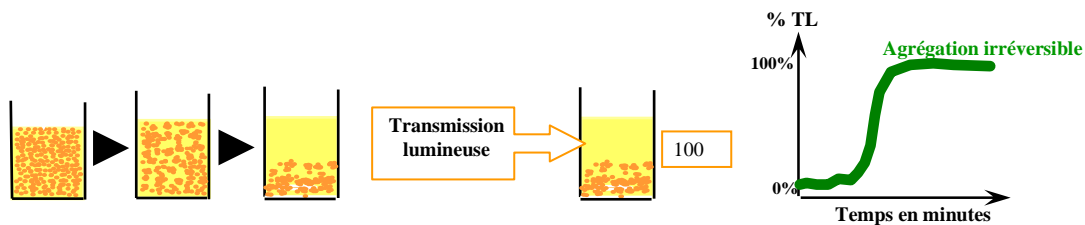


Figure 6 : Illustration du PAT

**Contrôle = plasma du patient + plaquettes d'un témoin + NaCl**



**Test = plasma du patient + plaquettes d'un témoin + héparine /**



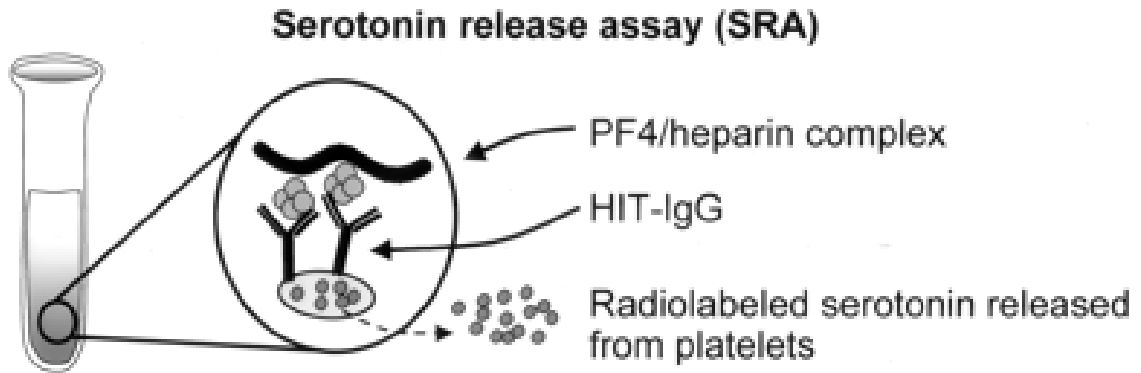
#### 4.7.4 14C-serotonin release assay (SRA)

Dans ce test on utilise des plaquettes de donneurs normaux marquées à la 14C-sérotonine. Les plaquettes sont ensuite lavées et on y rajoute le sérum du patient puis des doses d'héparine. Le test est positif s'il y a relargage de 14C-sérotonine à des doses thérapeutiques d'héparine.

Le SRA a une meilleure sensibilité (65% à 94%) que l'agrégation plaquettaire et une meilleure spécificité (90-100%). La sensibilité du test varie en fonction de la concentration d'héparine : à doses thérapeutiques (0,05-1 U/mL) on observe une agrégation plaquettaire mais à hautes doses (10-100 U/mL) il n'y a pas d'agrégation plaquettaire (2).

Le désavantage du test consiste non seulement en un coût élevé mais aussi à l'utilisation de matériel radioactif. De même que pour le test d'agrégation plaquettaire, les anticorps en jeu n'ont que peu d'importance.

Figure 7 : Illustration du SRA



Warkentin Chest 2005;127:35S

#### 4.7.5 Détection d'anticorps anti-IL-8 par la spectroscopie de résonance plasmonique de surface (SPR)

La recherche d'anticorps se liant à de l'interleukine 8 immobilisée est réalisée en utilisant la spectroscopie de résonance plasmonique de surface (SPR pour surface plasmon resonance en anglais). Les interactions ont été étudiées dans des conditions de flux (ce qui présente l'avantage d'être plus proche de ce qui se passe *in vivo*), à des densités de protéines compatibles avec celles qui pourraient être présentes sur des surfaces cellulaires. La spectroscopie de résonance plasmonique de surface s'appuie sur le phénomène optique de réflexion interne totale. En effet, la lumière traversant un milieu optiquement dense (ex: verre) est en partie réfléchiée et en partie réfractée lorsqu'elle atteint une interface d'un milieu optiquement moins dense (ex: milieu aqueux). Au delà d'un certain angle d'incidence (angle critique), la lumière est totalement réfléchiée mais une petite partie de la lumière incidente pénètre dans le milieu optiquement moins dense (onde évanescente).

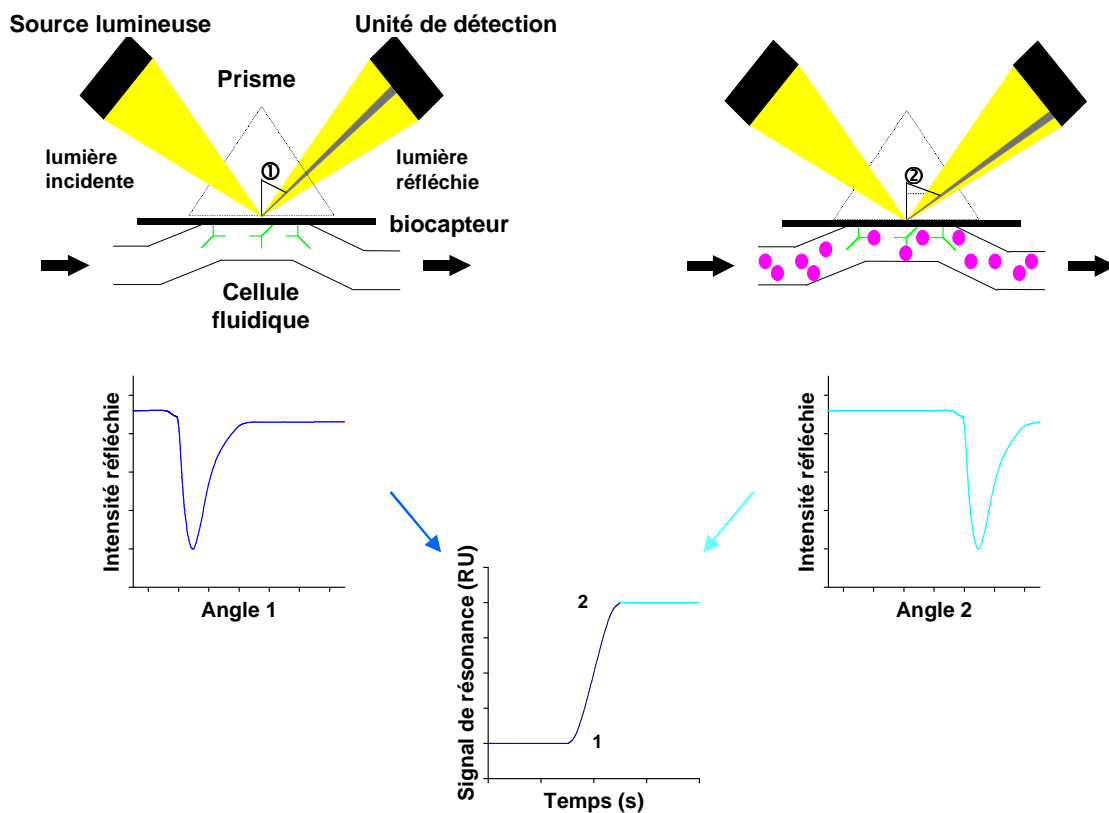
Si la lumière est polarisée et monochromatique et si l'interface entre les deux milieux contient un matériel conducteur alors l'onde évanescente peut interagir avec les électrons libres (plasmons) du film conducteur (en l'occurrence film métallique). L'énergie lumineuse perdue est plus importante qu'en l'absence de film métallique ce qui se traduit par une

diminution de l'intensité de la lumière réfléchiée à un angle bien précis : c'est la résonance plasmonique de surface.

La détection se fait par la mesure de l'angle auquel la lumière réfléchiée est fortement diminuée. Cet angle dépend des paramètres suivants: propriétés du film métallique (constantes), longueur d'onde de la lumière incidente (constante), indice de réfraction du verre (constant) et indice de réfraction du milieu aqueux qui va varier si des interactions entre biomolécules ont lieu à l'interface métal - milieu aqueux.

Figure 8 : Illustration de la SPR

*Il faut immobiliser par liaison covalente l'un des partenaires de la réaction que l'on souhaite étudier.*



Le biocapteur utilisé est composé par :

- Un film d'or qui possède une inertie chimique ainsi qu'un signal de résonance pour une combinaison appropriée d'angle de réflexion et de longueur d'onde de lumière.
- Du dextran qui assure un environnement hydrophile ainsi qu'une matrice flexible avec une certaine épaisseur pour un bon degré d'accessibilité des molécules et dont le pH et la force ionique influencent la flexibilité et qui est composé de dextran linéaire non réticulé (polysaccharide) et de carboxyméthyle (1 groupement carboxyl / résidu de saccharose) afin de procurer un groupement chimique pour l'immobilisation covalente (donne une charge négative si bien que les molécules chargées positivement sont attirées électrostatiquement par la couche de dextran à faible force ionique (il y donc possibilité de l'utiliser même pour des solutions peu concentrées)).

La phase d'activation:

L'activation d'environ 30 à 40 % des groupements carboxyls et après immobilisation la matrice porte encore une charge négative contrebalancée en partie par le ligand et à n'importe quel pH, les forces électrostatiques entre les molécules immobilisées et les effets électrostatiques des résidus carboxyls peuvent être minimisés par des tampons de force ionique relativement élevée ( $\geq 0,15$  M).



Note :

Dans le cas clinique qui illustre cette thèse, l'IL-8 utilisée provient de chez Santa Cruz Biotechnology. L'IL-8 est immobilisée par couplage covalent sur un biocapteur CM5 (matrice de dextran carboxylé).

Les expériences de liaison sont réalisées à l'aide de l'appareil Biacore X. Le tampon de course est un tampon Hepes-NaCl (Hepes 10 mM, NaCl 140 mM, pH 7,35 contenant du Tween 20 à 0,005%). Les expériences sont réalisées à 25°C à un débit de 5 µL/min. Après injection du plasma dilué au 1/5, les anticorps fixés sont détectés par injection d'anticorps de chèvre anti-IgG humaines (spécifiques du domaine Fc ; Sigma, St. Louis, MO) ou par injection d'anticorps de lapin anti-IgM humaines (Dako, Glostrup, Denmark).

Des liaisons non spécifiques au biocapteur sont minimisées en ajoutant du dextran carboxyméthylé à toutes les solutions injectées.

Le biocapteur est régénéré par injection de NaOH 10 mM. Les données ont été analysées à l'aide du logiciel Biaevaluation 3.0.

#### Figure 9 : Fiche d'identité de l'IL-8 (hBA-72): sc-4600de Santa Cruz Biotechnology

*Santa Cruz Biotechnology, Inc. 1.800.457.3801 831.457.3800 fax 831.457.3801 Europe +00800 4573 8000 49 6221 4503  
0 [www.scbt.com](http://www.scbt.com)*

#### **RECONSTITUTION**

In order to avoid freeze/thaw damaging of the active protein, dilute protein when first used to desired working concentration. Either a sterile filtered standard buffer (such as 50mM TRIS or 1X PBS) or water can be used for the dilution. Store any thawed aliquot in refrigeration at 2° C to 8° C for up to four weeks, and any frozen aliquot at -20° C to -80° C for up to one year. It is recommended that frozen aliquots be given an amount of standard cryopreservative (such as Ethylene Glycol or Glycerol 5-20% v/v), and refrigerated samples be given an amount of carrier protein (such as heat inactivated FBS or BSA to 0.1% v/v) or non-ionic detergent (such as Triton X-100 or Tween 20 to 0.005% v/v), to aid stability during storage.

#### **STORAGE**

Store desiccated at -20°C; stable for one year from the date of shipment.

#### **RESEARCH USE**

For research use only, not for use in diagnostic procedures.

#### **PROTOCOLS**

See our web site at [www.scbt.com](http://www.scbt.com) or our catalog for detailed protocols and support products.

## **BACKGROUND**

Interleukin-8, or IL-8, the prototypic member of the C-X-C, or  $\alpha$ , family of chemokines, is a chemoattractant cytokine involved in the chemotaxis and activation of neutrophils. IL-8 expression has been correlated to a large number of chronic inflammatory diseases, including inflammatory bowel disease (IBD) and atherosclerosis. IL-8 is cleaved from a 99 amino acid precursor to a 72 amino acid, nonglycosylated, biologically active protein with a molecular weight of 8 kDa. Whether IL-8 functions in vivo as a monomer or a hydrogenbonded dimer has not yet been resolved. Two IL-8 receptors, designated IL-8RA and IL-8RB, have been described and share 77% sequence identity. Both are seven-transmembrane domain proteins (7TMD), similar to the G protein-coupled receptors, and, in addition to IL-8, serve as receptors for other members of the  $\alpha$  and  $\beta$  chemokine families.

## **SOURCE**

IL-8 (hBA-72) is produced in *E. coli* as 8.4 kDa biologically active protein corresponding to 72 amino acids of IL-8 of human origin.

## **PRODUCT**

IL-8 (hBA-72) is purified from bacterial lysates (>98%); supplied as 25  $\mu$ g purified protein.

## **BIOLOGICAL ACTIVITY**

IL-8 (hBA-72) is biologically active as determined by chemotaxis over a wide concentration range in an assay using human peripheral blood neutrophils. Significant chemotaxis was achieved using a concentration range of 10 to 100 ng/ml.

### **4.8 Diagnostic différentiel**

Le diagnostic différentiel de la thrombopénie à l'héparine est large. Il englobe toutes les autres causes de thrombopénies ainsi que les états pouvant favoriser la survenue de thromboses veineuses ou artérielles.

#### **4.8.1 Causes de thrombopénie**

Le diagnostic différentiel de la thrombopénie inclut les causes interférant avec la production des plaquettes, les causes augmentant la destruction ou la consommation des plaquettes et les causes de dilution. Dans un second temps, un frottis sanguin périphérique voire une ponction-biopsie de moelle osseuse peut s'avérer nécessaire afin de distinguer une étiologie d'une autre.

##### **4.8.1.1 Production plaquettaire avec des mégacaryocytes diminués ou absents dans la moelle osseuse**

Leucémie, anémie aplasique, hémoglobinurie paroxystique nocturne, médicaments myélosuppresseurs.

#### 4.8.1.2 Production plaquettaire diminuée malgré la présence de mégakaryocytes dans la moelle osseuse

Thrombopénie induite par l'alcool, anémie mégaloblastique, thrombopénie associée au HIV, certains syndromes myélodysplasiques.

#### 4.8.1.3 Séquestration des plaquettes avec une rate agrandie

Cirrhose avec splénomégalie, myélofibrose accompagnée de métaplasie myéloïde, maladie de Gaucher.

#### 4.8.1.4 Destruction plaquettaire d'origine immune

Purpura thrombopénique idiopathique, thrombopénie associée au HIV, purpura post-transfusionnel, thrombopénie induite par les médicaments, thrombopénie néonatale allo-immune, maladie du tissu conjonctif, maladies lymphoprolifératives.

#### 4.8.1.5 Destruction plaquettaire d'origine non immune

Coagulation intravasculaire disséminée, purpura thrombotique thrombopénique, syndrome hémolytico-urémique, thrombopénie dans le syndrome de détresse respiratoire aiguë de l'adulte

#### 4.8.1.6 Dilution

Transfusion massive

#### 4.8.2 Comparaison de la thrombopénie survenant dans la TIH et des thrombopénies induites par d'autres médicaments :

De très nombreux médicaments sont connus pour induire une thrombopénie tels la quinine, la rifampicine, la ranitidine, le co-trimoxazol et bien d'autres encore. Le mécanisme conduisant à une thrombopénie est cependant différent de celui de la TIH sous plusieurs aspects.

En effet, contrairement à la TIH qui induit un état hypercoagulable, la thrombopénie due aux autres médicaments induit un état hypocoagulable et une diathèse hémorragique.

Le plus fréquemment, le médicament se lie à une glycoprotéine de surface comme GP Ib-IX ou/et GP IIb/IIIa ce qui induit un changement de conformation exposant un épitope. Cela peut aussi être la structure moléculaire du médicament lui-même qui est antigénique. En général, la liaison est facilement réversible car elle s'effectue de façon non covalente. Certaines s'effectuent de façon covalente, comme la pénicilline, à la membrane cellulaire. Pour les autres médicaments en cause dans les thrombopénies, il n'existe pas de test de laboratoire fiable. Il n'existe pas non plus de traitement spécifique de la thrombopénie induite par des médicaments, on propose essentiellement d'arrêter le médicament suspect et de suivre le compte plaquettaire. En général, dès que le traitement est suspendu, on observe une correction de la thrombopénie. S'il y a des signes de gravité tels qu'une thrombopénie sévère ou des signes de saignement, il faut envisager un traitement avec des corticoïdes (comme pour le purpura thrombopénique idiopathique) et parfois transfuser des plaquettes.

#### **4.9 Prise en charge de la TIH et alternatives à l'héparine**

##### **4.9.1 Présence d'AC anti-PF4 sans thrombopénie ni clinique associées**

Chez les patients chez qui on détecte des anticorps anti-PF4 sans thrombopénie ni thrombose, notamment les patients ayant subi une chirurgie cardiaque avec circulation extracorporelle, aucun traitement particulier n'est recommandé (19).

##### **4.9.2 Buts de la prise en charge**

Dans les autres cas, le but de la prise en charge est de réduire le risque thrombotique en diminuant l'activation plaquettaire et la génération de thrombine. Toutes les sources d'héparine doivent être éliminées (héparinisation de cathéter, héparine dans les filtres de dialyse, etc.). Il faut ensuite initier une anticoagulation alternative. Il n'est pas recommandé de changer de type d'héparine car les anticorps ont une réaction croisée avec l'HBPM ou le danaparoïde sodique (67).

Certaines thérapies ne sont pas recommandées notamment les anti-vitamines K (effet pro-coagulant temporaire), l'aspirine, la pose d'un filtre cave ou la transfusion de plaquettes (augmentation du processus d'activation plaquettaire et d'agrégation) (75, 76).



### 4.9.3 Alternatives à l'héparine

Les alternatives à l'héparine sont donc les inhibiteurs directs de la thrombine. Les inhibiteurs directs de la thrombine se lient et inactivent directement la thrombine et, contrairement à l'héparine, ne passent pas via l'antithrombine. Ils ont des demi-vies courtes et il n'y a pas de réaction croisée avec l'héparine (67).

La durée de traitement alternatif à l'héparine lors d'une TIH dépend de la présence ou non d'un événement thrombotique. Chez les patients qui présentent une thrombopénie isolée, une anticoagulation alternative est recommandée jusqu'à ce que le compte plaquettaire soit de nouveau normal (67). Le risque de thrombose reste cependant élevé et une anticoagulation avec une coumarine peut être envisagée pendant encore 4 semaines (56, 77, 78).

Pour les patients qui présentent une thrombopénie et une thrombose, une anticoagulation alternative doit être introduite jusqu'à ce que le compte plaquettaire soit au – dessus de 150 G/L afin de débiter ensuite une coumarine. L'introduction de la coumarine doit se faire sous couvert de l'anticoagulation alternative pendant au moins 5 jours et l'INR doit être thérapeutique pendant 48h avant qu'on puisse arrêter l'anticoagulation alternative (67).

### 4.9.4 Rappel des différentes familles d'anticoagulants :

#### *Inhibiteurs indirects de la thrombine*

- HBPM
- HNF
- fondaparinux
- danaparoïde sodique

#### *Inhibiteurs directs de la thrombine*

- lepirudine
- bivalirudine
- argatroban

#### *Anti-vitamine K*

### Inhibiteurs de la fonction plaquettaire

- aspirine
- clopidogrel
- tirofibran
- abxicimab

### Autres

- iloprost
- nouveaux anticoagulants **oraux** en développement
  - o anti-FXa
  - o DTI

## 4.9.5 Caractéristiques individuelles des alternatives à l'héparine non fractionnée

### 4.9.5.1 Enoxaparine sodique (Clexane®)

Il s'agit d'une HBPM (4500 daltons) qui se fixe sur l'antithrombine et catalyse l'inhibition de la thrombine. Le rapport de l'activité anti-facteur Xa sur l'activité anti-facteur IIa se situe entre 3,3 et 5,3. L'énoxaparine sodique ne modifie pas l'agrégation plaquettaire ni la fixation du fibrinogène sur les plaquettes. Sa demi-vie à dose unique est de 4 heures et à doses répétées de 7 heures. Sa métabolisation est hépatique, puis des fragments actifs et inactifs sont excrétés par le rein. Chez les patients avec une clearance de la créatinine <30 ml/min, il faut diminuer les doses ou les espacer.

### 4.9.5.2 Fondaparinux (Arixtra®)

Il s'agit d'un pentasaccharide synthétique de la famille des glycosaminoglycans. Le fondaparinux se lie spécifiquement à l'antithrombine et l'active. Contrairement à l'héparine qui agit aussi via l'antithrombine, l'effet anti-thrombotique du fondaparinux est le résultat de l'inhibition sélective du seul facteur Xa. L'inhibition physiologique du facteur Xa par l'antithrombine est catalysée et accélérée d'un facteur 300 en présence du fondaparinux alors que la thrombine (facteur IIa) n'est pas inhibée. Le fondaparinux n'a en principe pas

d'effet sur les plaquettes. Sa demi-vie d'élimination est de 14 à 21 heures et son élimination se fait par excrétion rénale sans métabolisation.

Un cas jusqu'à présent unique de cross-réactivité entre les anticorps de la TIH et le fondaparinux vient d'être décrit (79).

#### 4.9.5.3 Danaparoïde sodique (Orgaran®)

Il s'agit d'un mélange de glycosaminoglycures sulfatés de bas poids moléculaire composé d'héparan-sulfate, de dermatan-sulfate et de petites quantités de chondroïtine-sulfate. Il agit comme l'héparine en catalysant l'inhibition du facteur Xa par l'antithrombine. Il a une grande activité anti-Xa et une faible activité anti-IIa et pratiquement aucun effet sur l'agrégation plaquettaire. Sa demi-vie d'élimination de l'activité anti-Xa est de 25 heures et sa demi-vie d'élimination de l'activité anti-IIa de 7 heures. Son antidote est la protamine et il se monitorise via son activité anti-Xa. Son élimination est rénale.

Le danaparoïde sodique présente une réaction croisée faible (inférieure à 10%) avec les anticorps induits par l'héparine, car il ne contient pas d'héparine et se caractérise par un degré de sulfatation faible. Le taux de réaction croisée est d'environ 3% lorsqu'il est évalué par un test sérologique, la survenue d'un problème clinique ou une réduction plaquettaire (80).

Dans une étude rétrospective comparant la lépirudine et le danaparoïde, les patients avec une TIH sans thrombose qui ont reçu du danaparoïde à une dose prophylactique étaient plus susceptibles de développer une complication thromboembolique que ceux recevant de la lépirudine à une dose thérapeutique (81).

#### 4.9.5.4 Lépirudine (Refludan®)

Il s'agit d'une hirudine recombinante produite par des cellules de levures. L'hirudine naturelle est produite par la sangsue *Hirudo medicinalis*. La lépirudine agit comme inhibiteur direct et spécifique de la thrombine. Une molécule d'hirudine se lie à une molécule de thrombine et le mode d'action est indépendant de l'antithrombine. Le PF4 n'inhibe pas la lépirudine. Sa demi-vie initiale est de 10 minutes et sa demi-vie terminale de 1,3 heures. Chez les patients avec une insuffisance rénale terminale, la demi-vie peut atteindre 48 heures car l'élimination de la lépirudine est rénale.

Concernant le monitoring on observe que tous les tests de la coagulation dépendant de la thrombine sont influencés. Il faut viser une valeur de 1,5 à 2,5 fois l'aPTT de départ. En cas de présence de lupus anticoagulant, il y a prolongation de l'aPTT *in vitro* et il faut doser directement l'hirudinémie.

Par rapport à l'indication de la lépirudine en cas de TIH, on observe un taux de mortalité, d'amputation et de thromboses à 35 jours plus bas chez les patients ayant reçu de la lépirudine que chez les patients contrôles mais le taux de saignement est aussi plus élevé (17% vs 5,8%) ce qui fait qu'il faut faire particulièrement attention à ne pas surdoser l'hirudine chez les patients âgés et insuffisant rénaux (60, 82, 83).

L'inconvénient de l'hirudine est que des anticorps se développent dans 30% des patients après une première exposition et chez 70% après une exposition répétée. Comme un choc anaphylactique fatal a déjà été reporté, il n'est pas recommandé de traiter les patients plus d'une fois avec de l'hirudine (84, 85).

#### 4.9.5.5 Bivalirudine (Angiomax®)

C'est un autre analogue de l'hirudine soit un inhibiteur direct de la thrombine synthétique indiqué lors d'angioplastie transcutanée chez les patients risquant une TIH. Il n'existe pas d'études incluant des patients avec une TIH.

#### 4.9.5.6 Argatroban

Il s'agit d'une petite molécule synthétique dérivée de la L-arginine. Elle agit comme inhibiteur direct de la thrombine en se fixant sur le site catalytique de la thrombine de manière réversible (autre site que l'hirudine). Son mode d'action est indépendant de l'antithrombine et son élimination est hépatique.

Concernant son indication dans la TIH, l'outcome combiné de mortalité, d'amputation et de thrombose à 37 jours est plus bas chez les patients recevant de l'argatroban que chez les patients contrôles (35% vs 43%). Comme pour la lépirudine, le bénéfice est surtout dans la réduction d'apparition de nouvelles complications thromboemboliques (10% vs 25%). Les taux de saignement des patients contrôles et des patients sous argatroban sont similaires (59).

Pour le moment, aucun anticorps contre l'argatroban n'a été décrit. Le médicament n'est pas encore enregistré en Suisse.

#### 4.9.5.7 Iloprost (Ilomédine®)

Il s'agit d'un analogue de la prostacycline PGI<sub>2</sub>. Son effet est donc d'inhiber l'agrégation, l'adhésion des thrombocytes et d'activer la fibrinolyse. Son mécanisme d'action est mal connu et sa demi-vie est de 30 minutes. Son élimination est à 80% rénale et à 20% biliaire.

#### 4.9.5.8 Aspirine

L'aspirine inhibe la synthèse de la thromboxane A<sub>2</sub> dans les thrombocytes de manière irréversible et empêche donc l'agrégation plaquettaire de manière indirecte.

#### 4.9.5.9 Clopidogrel (Plavix®)

Il inhibe spécifiquement l'agrégation plaquettaire via l'inhibition de la fixation de l'ADP à son récepteur plaquettaire. Il n'y a donc pas d'activation du complexe GPIIb/IIIa ni d'agrégation plaquettaire.

## **5. SYNDROME DES ANTICORPS ANTIPHOSPHOLIPIDES**

### **5.1 Définition**

Le syndrome des anticorps anti-phospholipides (SaPL) a été décrit pour la première fois en 1906 par Wassermann chez des patients qui présentaient un test de la syphilis positif (86). Il se caractérise par la présence d'auto-anticorps de type IgG dirigés contre les phospholipides ou contre des protéines plasmatiques liées à des phospholipides anioniques. Ces auto-anticorps entraînent un état d'hypercoaguabilité avec une tendance aux événements thromboemboliques artériels et veineux, à des avortements à répétition et à une thrombopénie. Les principaux anticorps anti-phospholipides (aPL) sont : les anticorps anti-cardiolipine, les anticorps anti-beta 2 GPI et le lupus anticoagulant.

#### **5.1.2 Critères de Sydney**

Selon les critères de Sydney, le diagnostic de SaPL se fait sur la présence d'un critère clinique associé à un critère biologique (87-89) :

Critères cliniques :

- Thrombose artérielle ou veineuse objectivée (un épisode ou plus de thrombose artérielle ou veineuse quelque soit l'organe ou le tissu)
- Maladie de la grossesse
  - o Une (ou plus d'une) mort fœtale inexplicée après les 10 premières semaines de grossesse avec un fœtus morphologiquement normal
  - o Au moins trois pertes fœtales dans les 10 premières semaines de grossesse sans malformation chromosomique maternelle ou paternelle
  - o Une naissance prématurée (ou plus d'une) avant la 34ème semaine due à une insuffisance placentaire, éclampsie ou pré-éclampsie

Critères biologiques :

- Présence d'un lupus anticoagulant plasmatique à au moins deux reprises à 12 semaines d'intervalle mesuré selon les guidelines de l'International Society on Thrombosis and Haemostasis
- Présence d'anticorps anticardiolipine de type IgG et/ou IgM à un taux moyen ou élevé dans le sérum ou le plasma à au moins deux reprises à 12 semaines d'intervalle mesurée par un ELISA standardisé
- Présence d'anticorps anti-beta2GPI de type IgG et ou IgM dans le sérum ou le plasma à au moins deux reprises à 12 semaines d'intervalle et mesurée par un ELISA standardisé

## **5.2 Classification**

Primaire : le syndrome survient isolément

Secondaire : le syndrome est associé à une maladie systémique, le plus fréquemment le lupus érythémateux disséminé (LED).

## **5.3 Epidémiologie**

### **5.3.1 Présence d'aPL en dehors du SaPL.**

Selon le test diagnostique utilisé, les aPL sont présents chez 10% des individus sains mais persistent rarement (<2%) plus de 9 mois (90). Les aPL sont également présents chez 30% des individus souffrant d'un LED (91). On trouve aussi des aPL chez les patients avec le VIH ou traités par chlorpromazine (92, 93).

### **5.3.2 Présence d'aPL selon la clinique du SaPL**

25% des patients avec APS primaire ont une expression rénale de la maladie. Chez les patients qui se présentent avec une thrombose, la prévalence des aPL est plus élevée et varie entre 4 et 21% (94, 95).

## **5.4 Pathogenèse et anticorps**

La pathogenèse est multifactorielle parce que les aPL sont hétérogènes et reconnaissent des complexes de phospholipides chargés négativement avec des protéines co-facteurs variées telles la beta2GPI, la prothrombine, les protéines C et S ou encore l'annexine V.

En règle générale, les phospholipides chargés négativement sont présents seulement sur la partie interne des cellules membranaires et ne sont donc pas exposés aux anticorps circulants (96). Les aPL ont une réaction croisée avec les acides nucléiques. Les anticorps dirigés contre les acides nucléiques ont une réaction croisée avec les glycosaminoglycans (97-100).

### **5.4.1 Anticorps anti-cardiolipine (aCL)**

Ces anticorps réagissent avec des phospholipides tels que la cardiolipine ou la phosphatidylsérine liés à des protéines comme la beta 2 glycoprotein I, la prothrombine ou l'annexine V.

Il existe des isotypes d'immunoglobulines différentes : IgG, IgA, IgM et IgG de sous classes 1-4 (101). Il semble que les IgG2 aCL induisent plus de thromboses que les autres types d'aCL. En fonction du test utilisé, les IgG aCL sont présent jusque chez 6,5% des patients sains et les IgM aCL jusque chez 9,4% des patients sains (90). Les aCL sont des anticorps induisant un test de la syphilis faussement positif parce que l'antigène de la syphilis utilisé dans le test est de la cardiolipine mélangée avec de la céphaline et du cholestérol. Les anticorps anti-cardiolipine se lient donc à cet antigène et le test est positif. Pourtant, les AC ne sont pas des AC formés contre la syphilis. Avec ces anticorps, il est décrit moins de grossesses réussies, plus de thromboses, un livedo réticulaire et des céphalées type migraine. 85% des gens qui ont des anticoagulants lupiques sont aussi porteurs d'aCL.

Une étude de seulement 4 patients n'a pas montré de réactivité croisée entre les anticorps anti-cardiolipine et les glycosaminoglycans mais ceci n'a pas été confirmé (102). Environ 10% des aCL présentent une réactivité croisée avec les glycosaminoglycans héparine et les héparans sulfates (96,103). Un des ces aCL inhibe à 80% l'activation de l'antithrombine dépendante de l'héparine. Il s'agit d'une hypothèse de mécanisme par lequel les aCL induiraient des thromboses et des pertes fœtales. Les tests de détection de type ELISA sont peu standardisés et il y a malheureusement peu de concordance entre les résultats des différents laboratoires (104).



#### 5.4.2 Anticorps anticoagulant lupique (LA)

L'anticoagulant lupique porte un nom historique et paradoxal. En effet, comme son nom ne l'indique pas, d'une part il est pro-coagulant et d'autre part on le trouve chez des patients qui n'ont pas de lupus. A l'origine, ce nom lui a été donné car *in vitro*, il prolonge l'aPTT en bloquant l'assemblage du complexe de la prothrombinase. *In vivo*, il est pro-coagulant. Les tests de la coagulation sont perturbés même lorsque le compte plaquettaire est normal. Un traitement anticoagulant au décours interfère avec la détection du LA (105). Suivant le test employé on peut trouver jusqu'à 8% des patients sains avec un LA (106).

Les guidelines recommandent de faire le screening du lupus anticoagulant par au moins deux tests comme l'aPTT, le temps de dilution avec le venin de vipère Russel, le temps de coagulation au kaolin, le temps de prothrombine dilué, le temps de textarine ou encore le temps de taipan (107).

Note :

Le diagnostic différentiel d'une prolongation des tests de la coagulation type LA est un déficit en facteur de la coagulation. Pour faire la différence, on peut mélanger le plasma du patient avec le sang d'un donneur sain. Dans le cas d'un déficit de facteurs de coagulation, quand le plasma est mélangé, les valeurs se corrigent car les facteurs de coagulation sont apportés par le donneur mais ça ne se corrige pas si il y a les anticorps qui perturbent le test.

#### 5.4.3 Anticorps anti beta2GPI

La protéine beta2GPI est une protéine plasmatique aux propriétés anticoagulantes. Lorsqu'une cellule expose des phospholipides avec une charge négative, une protéine beta2GPI s'y fixe. Les anticorps du SaPL reconnaissent ce complexe (108, 109).

#### 5.4.4 Héparan sulfate

Le mécanisme exact par lequel les aPL induisent une lésion vasculaire n'est pas bien compris (110-112). Les héparans sulfates jouent un rôle dans l'équilibre hémostatique notamment via l'inhibition de l'activité de la thrombine via leur liaison à l'antithrombine. L'héparan sulfate contient des séquences similaires à l'héparine sur une portion inférieure à

1% (113). Il existe un pentasaccharide commun à l'héparan sulfate et à l'héparine qui se lie à l'antithrombine. Il existe des anticorps anti-héparans sulfates et anti-héparine (114-116). Les régions de l'héparan sulfate qui présentent des épitopes sont aussi les sites qui contiennent des résidus très sulfatés et ce sont des sites qui prédominent sur les héparan sulfates et l'héparine. Chez les patients avec SaPL on observe des IgG anti héparine qui sont spécifiques au site de l'héparine qui se lie à l'antithrombine et donc qui inhibent l'accélération de la formation de complexes antithrombine - thrombine et par là même induisent un état procoagulant (110).

Une étude a montré la présence d'anticorps anti-héparine de type IgG chez les patients avec SaPL. Ces anticorps se fixent spécifiquement sur le site de l'héparine qui est composé d'un disaccharide présent sur l'unique pentasaccharide qui lie l'antithrombine. Cela induit un état procoagulant (110). Comme les héparan sulfates de type GAGs appartiennent à une famille de substances antithrombogènes de la surface endothéliale, l'inhibition des GAGs par des aPL réagissant de manière croisée pourrait expliquer les thromboses associées à la présence des aPL. Une réaction croisée atteignant environ 10% a été mise en évidence entre les aCL, les GAGs et les phospholipides chargés négativement. Ces aCL pourraient aussi avoir une réaction croisée avec l'héparine et l'héparan sulfate. L'hypothèse est donc que les aPL causent des thromboses en inhibant l'activation physiologique de l'antithrombine par les héparan sulfates. Ce mécanisme a été décrit *in vitro* (96).

#### 5.4.5 Tests utilisés dans le diagnostic du SaPL

Il existe deux types de tests couramment utilisés pour le diagnostic biologique du SaPL ; les tests coagulants comme le lupus anticoagulant ou les tests immunologiques comme le dosage des AC anti aCL ou des AC beta 2 GPI.

### **5.5 Clinique**

#### 5.5.1 Thromboses

En général, les patients qui présentent une thrombose ont un taux d'aPL élevé. Le risque de thrombose est plus élevé avec le LA qu'avec les aCL (116). Les patients souffrant de LED ont une prévalence élevée de thromboses, prévalence qui augmente s'ils ont en plus des aPL.

### 5.5.1.1 Risque de développer une thrombose selon les types de patients (116):

- pertes fœtales récurrentes, pas ATCD thrombose	10%/an
- ATCD thromboses, stop traitement anticoagulant dans les 6 mois	>10%.
- avec LED, sans ATCD thrombose	2%
- augmentation isolée des aPL	<1%/an

### 5.5.1.2 Traitement des thromboses et prévention :

L'anticoagulation par coumarine visant un INR entre 2 et 3 permet de réduire le risque d'une thrombose veineuse profonde de 80 à 90% (116). Chez les patients ayant un antécédent d'accident vasculaire cérébral, l'aspirine semble aussi efficace que les coumarines avec un INR entre 2 et 3 pour prévenir la survenue d'un nouvel accident vasculaire cérébral s'ils ont un seul test positif pour les aPL.

### 5.5.2 Atteinte rénale

Le SaPL peut se manifester par une protéinurie asymptomatique modérée (moins de 2 g/24h) avec une fonction rénale normale, ou par une insuffisance rénale avec une protéinurie avoisinant les taux d'un syndrome néphrotique et associée à une hypertension.

Lorsqu'il y a une thrombose d'une grosse artère et un infarctus rénal, une douleur, une hématurie et une diminution de la fonction rénale sont observées. Une thrombose de la veine rénale peut être symptomatique ou pas. Le SaPL primaire se caractérise par des occlusions non inflammatoires des vaisseaux rénaux de tous les calibres (glomérulaire à artères et veines rénales). On note des lésions thrombotiques induisant un épaississement de l'intima, une fibrose sous-endothéliale et une hyperplasie de la média. Dans les capillaires glomérulaires touchés on voit des thrombi avec des dépôts mésangiaux. Ces lésions ressemblent aux lésions qu'on voit dans le syndrome hémolytique-urémique.

### 5.6 Tests diagnostiques

La détection des aPL est compliquée car leur cible est variable. Le LA et les aCL ont une spécificité pour la beta2GPI mais des cibles comme la prothrombine et l'annexine V ont été décrites. Les laboratoires dosent en général différents aPL (118-121).

## **5.7 Traitements**

### **5.7.1 Thrombose veineuse profonde**

La thrombose veineuse profonde est la manifestation clinique la plus fréquente du SaPL et survient chez environ 30% des patients. Le traitement consiste en une HNF ou une HBPM pour 5 jours puis un relais par les coumarines. Ce traitement comparé à un placebo réduit le risque d'une récurrence de 80 à 90% (122-125). Un traitement de coumarine (INR cible 2-3) est plus efficace qu'un traitement d'aspirine (125, 126). La durée optimale du traitement anticoagulant pour la prévention de la récurrence d'une thrombose chez les patients avec un SaPL est mal connue. Il semble que le risque de récurrence soit plus élevé dans les 6 mois suivant l'arrêt du traitement. Le consensus est de donner un traitement à durée indéterminée. Chez les patients qui présentent des récurrences sous traitement, il faut vérifier que l'INR cible est dans l'intervalle thérapeutique. Si ça n'est pas le cas, il faut viser un INR cible plus élevé, changer pour de l'héparine ou ajouter un antiplaquettaire aux coumarines (122, 127). Les échanges plasmatiques et les globulines immunes intraveineuses ont été suggérés pour les patients avec un SaPL catastrophique (128).

### **5.7.2 Thromboses artérielles**

La plupart du temps, c'est la circulation cérébrale qui est touchée avec un AVC chez 13% et un AIT chez 7% des patients avec SaPL (129). Les coumarines et l'aspirine semblent équivalentes pour la prévention des complications thromboemboliques chez les patients avec un AVC et un SaPL. Selon certains auteurs, que les anticorps LA ou aCL soient détectés ou non ne semble pas consister en un facteur prédictif d'une éventuelle récurrence d'une thrombose artérielle (130). Les patients qui présentent un premier AVC et des aPL une fois positifs n'auraient pas d'indication à une anticoagulation et pourraient être traités par de l'aspirine ou des coumarines avec un INR cible entre 1,4-2,8. Certains préfèrent l'aspirine car il n'y a pas besoin de monitoring de laboratoire (131). Cependant d'autres auteurs préfèrent anticoaguler ces patients qui présentent également un risque thrombotique veineux. Si la thrombose artérielle n'est pas cérébrale, il n'existe pas d'étude importante permettant d'adopter une attitude claire. De nombreux patients avec des

infarctus du myocarde et des aPL sont traités de manière empirique avec des coumarines avec un INR cible entre 2-3.

### 5.7.3 Grossesse

Les recommandations de consensus suggèrent que les femmes connues pour un SaPL et des antécédents de 2 (ou plus) pertes fœtales précoces ou 1 perte fœtale tardive reçoivent un traitement d'héparine et d'aspirine pendant la grossesse (132).

### 5.7.4 LED et aPL

Les patients chez qui on trouve accidentellement des aPL et qui n'ont pas d'antécédent n'ont pas encore été étudiés. Les patients qui ont un LED et des aPL pourraient être traités avec de l'aspirine s'ils sont asymptomatiques (et pas enceintes).

### 5.7.5 Nouveaux traitements

De nombreux traitements sont en évaluation. Parmi ceux-ci, on trouve notamment les traitements immunosuppresseurs qui ont pour l'instant donné des résultats décevants avec peu d'effet sur le SaPL. Il y a néanmoins certains espoirs avec le rituximab. Les échanges plasmatiques donnent de bons résultats mais sont indiqués seulement en cas de SaPL catastrophique. L'hémodialyse voire la transplantation rénale sont utilisées en cas d'insuffisance rénale terminale. L'anticoagulation est à poursuivre après la greffe sinon les anticorps attaquent le greffon. La plasmaphérèse et la corticothérapie sont employées en cas d'insuffisance rénale aiguë.

## **6. Similitudes et différences entre la TIH et le SaPL**

Les similitudes de la physiopathologie de la TIH et de le SaPL ont fait l'objet de multiples publications (133).

### **6.1 Thrombopénie**

La thrombopénie est une manifestation commune à la TIH et au SaPL mais les mécanismes qui la causent sont probablement différents. Lors d'une TIH, l'activation plaquettaire se fait via la fixation sur le récepteur plaquettaire de l'anticorps qui reconnaît le complexe H-PF4. Une concentration critique d'héparine est nécessaire. S'il y a trop d'héparine, il y a rupture du complexe. C'est donc l'activation plaquettaire qui cause la thrombopénie. En cas de SaPL, c'est le taux élevé de facteur tissulaire sécrété par les cellules endothéliales et les macrophages, les microparticules endothéliales dans le lupus et les mécanismes endothéliaux (prostacycline, thromboxane, protéine C, héparan sulfate, altération de la fibrinolyse, activation des récepteurs d'adhésion des leucocytes) qui causent la thrombopénie.

### **6.2 Reconnaissance de néo-complexes par des auto-anticorps**

La beta2GPI tout comme le PF4 subissent un changement de conformation quand ils interagissent avec des molécules chargées négativement comme les phospholipides et l'héparine, ce qui expose des néo-épitopes responsables de la réponse immune.

Les anticorps du SaPL ont peu d'affinité pour la beta2GPI lorsqu'elle n'est pas liée à un phospholipide de même que les anticorps de la TIH ont peu d'affinité pour le PF4 non lié en phase fluide. Cependant, dans les deux cas, si on immobilise le PF4 respectivement la beta2GPI sur des plaques irradiées (et donc chargées négativement) les anticorps s'y lient.

On observe que les anticorps de la TIH peuvent se lier soit au complexe H-PF4 soit au PF4 seul dans certaines conditions. La même chose se passe dans le SaPL où les aCL peuvent se lier directement à la beta2GPI immobilisée en l'absence de phospholipides (32, 134, 135). Des processus auto-immuns similaires existent dans la TIH et le SaPL ce qui explique la présence simultanée d'aCL et d'anticorps dépendants de l'héparine.

## **7. Introduction à l'article**

L'article qui suit illustre le cas d'une patiente caucasienne de 54 ans, hémodialysée depuis 2000 pour une insuffisance rénale terminale sur syndrome hémolytique urémique qui se présente avec une obstruction de sa fistule de dialyse. Elle présente des évènements thromboemboliques à répétition depuis 1971 et un SaPL à lupus anticoagulant et anticorps anti-beta2GPI positifs a été diagnostiqué en 1987. Elle est anticoagulée par Sintrom® (acénocoumarol) en raison de son SaPL mais aussi pour une fibrillation auriculaire et un remplacement de valve mitrale en 2003. Pendant son hospitalisation en 2003 et à plusieurs reprises par la suite, elle a présenté des épisodes de thrombopénie après administration d'héparine avec des tests anti-PF4, PAT et SRA toujours négatifs. Depuis 2003, toutes les séances de dialyse se déroulent sans héparine. En 2006, elle bénéficie d'une thrombectomie chirurgicale de sa fistule et reçoit du Prothromplex (un concentré de facteurs de la coagulation vitamine K dépendants) en pré-opératoire en raison d'un INR thérapeutique à 3,7. Malgré son SaPL, la patiente ne présentait pas de thrombopénie à l'entrée. En post opératoire, elle reçoit de l'héparine et développe une thrombopénie en quelques heures dans les 24 premières heures qui suivent l'initiation du traitement. L'héparine est immédiatement stoppée et un traitement de Refludan® (lépirudine) est débuté. Le compte plaquettaire remonte alors progressivement pour pratiquement se normaliser 5 jours plus tard. De nouveau, les tests anti-PF4, PAT et SRA sont négatifs.

La TIH est une complication de l'héparinothérapie qui se produit chez 1 à 5% des patients traités par HNF et plus rarement par HBPM. Elle est due dans la grande majorité des cas à la présence d'auto-AC anti-PF4-H qui peuvent être mis en évidence par des tests immunologiques. Les AC anti-PF4 sont négatifs dans moins de 5% des TIH et d'autres anticorps tels l'AC anti-IL-8 et l'AC anti-NAP2 sont décrits.

Dans ce cas, la patiente souffre conjointement d'un SaPL. Ce syndrome se manifeste cliniquement par des thromboses et/ou des complications durant la grossesse et biologiquement par la présence d'auto-anticorps contre des protéines plasmatiques liées à des phospholipides anioniques. Il est décrit que, parfois, la présence d'héparine sur la surface plaquettaire pourrait conduire au développement d'une thrombopénie induite par des aPL en l'absence d'AC anti-PF4. Au vu de la présence conjointe des deux pathologies chez cette patiente, nous nous interrogeons également sur l'éventuelle prédisposition à une TIH chez les patients souffrant de SaPL.

## CASE REPORT

# Heparin-induced thrombocytopenia associated with interleukin-8-dependent platelet activation in a patient with antiphospholipid syndrome

Claire Bounameaux<sup>1</sup>, Françoise Boehlen<sup>2</sup>, Aurélie Membre<sup>3</sup>, Daniel Genné<sup>1</sup>, Claire Pouplard<sup>4</sup>, Véronique Regnault<sup>3</sup>, Philippe de Moerloose<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Medical Department, Community Hospital of La Chaux-de-Fonds, La Chaux-de-Fonds, <sup>2</sup>Division of Angiology and Haemostasis, University Hospital of Geneva, Geneva, Switzerland; <sup>3</sup>Haematology Laboratory, CHU Nancy, Nancy, France and <sup>4</sup>Haematology Laboratory, CHU Tours, Tours, France

## Abstract

Platelet factor 4 heparin enzyme immunoassay, platelet aggregation test, and serotonin release assay are commonly used to diagnose and confirm heparin-induced thrombocytopenia. We describe a case of recurrent thrombocytopenia appearing in a few hours after each heparin administration and who tested negative for the three assays. Further analysis revealed anti-interleukin (IL)-8 antibodies and IL-8-dependent platelet activation facilitated by heparin, which may explain this unusual case of heparin-induced thrombocytopenia.

**Keywords** heparin-induced thrombocytopenia; heparin; thrombocytopenia; interleukin-8; antiphospholipid antibodies

**Correspondance** Claire Bounameaux, Service de Médecine Interne, rue du Chasseral 20, 2300 La Chaux-de-Fonds, Switzerland. Tel.: +41 32 967 28 72; Fax: +41 32 967 27 29; e-mail: claire.bounameaux@ne.ch

Accepted for publication 13 August 2007

doi:10.1111/j.1600-0609.2007.00959.x

Heparin-induced thrombocytopenia type 2 (HIT) is a complication of heparin therapy caused by heparin-dependent antibodies. According to the clinical context it occurs in 1–5% of patients receiving unfractionated heparin (UFH) and less frequently low-molecular-weight heparins. HIT is mainly caused by heparin-dependent platelet activation antibodies that recognize a self-protein, platelet factor 4 (PF4), bound to heparin. The major complication of HIT is arterial and/or venous thrombosis resulting from several mechanisms with an important *in vivo* role of platelet activation and markedly increased thrombin generation (1). The diagnosis of HIT is based on a 50% drop in the platelet count with or without thrombosis and the presence of HIT antibodies detectable in patient serum or plasma (1, 2). Antiphospholipid syndrome (APS) is characterized by auto-antibodies (anticardiolipin antibodies, anti-b2 glycoprotein I (anti-b2GPI) antibodies and/or lupus anticoagulant) directed against plasma proteins bound to anionic phospholipids. This syndrome is associated with vascular thrombosis and/or pregnancy morbidity (3). Thrombocytopenia is observed in about 30% of APS cases.

We report the case of a patient with APS who developed repeated episodes of early thrombocytopenia upon heparin administration without detectable anti-PF4-heparin antibodies and also who tested negative for platelet aggregation test (PAT) as well as for serotonin release assay (SRA). Further analysis revealed that the serum of this patient was able to trigger interleukin (IL)-8-dependent activation leading to procoagulant activity.

## Case report

A 54-yr-old Caucasian female, on haemodialysis since 2000 for terminal renal insufficiency because of haemolytic-uraemic syndrome, presented with a thrombosis of arterio-venous fistula in 2006. She used to have repeated thrombotic events since 1971 and APS was diagnosed in 1987 [prolonged activated Partial Thromboplastin Time (aPTT) with a lupus anticoagulant, anticardiolipin and anti-b2GPI antibodies]. She was treated with acenocoumarol (Sintrom3, Novartis Pharma Schweiz AG, Bern, Switzerland) not only for her APS, but also because she had intermittent atrial fibrillation and mitral valve replacement in 2003.



During her hospitalization in 2003, she experienced repeated episodes of thrombocytopenia after heparin administration with negative laboratory assays (anti-PF4-heparin antibodies and PAT tests) for HIT. An example of such episode is shown in Fig. 1 where the platelet count fell three times after exposure to heparin [the first time at admission, the second time after the cardiopulmonary bypass (CPB) and the last time when heparin was administered through a catheter]. Since 2003, all haemodialysis sessions were performed without heparin.

On admission in 2006, a thrombosis of the arteriovenous fistula was confirmed. The remaining items were not relevant. The main laboratory findings were as follows: Hb 110 g / L, thrombocytes 358 g / L, international normalized ratio (INR) 3.7. The presence of lupus-like anticoagulants, anti-b2GPI antibodies and anticardiolipin antibodies (>60 g / L) was confirmed. A fistula thrombectomy was performed in emergency, after administration of Prothromplex® (Baxter, Volketswil, Switzerland), (concentrate of vitamin K-dependent coagulation factors). After thrombectomy, heparin therapy was introduced, and she developed thrombocytopenia within a few hours (358 g / L before surgery, 116 g / L, 10 h after heparin reintroduction and 76 g / L, 48 h later). Heparin therapy was stopped and lepirudin (Refludan®, Pharmion, Basel, Switzerland) was introduced. Platelet count increased progressively until reaching near-normal values 5 days later. Anti-PF4-heparin antibodies, PAT and SRA were again negative.

**Methods**

Anticardiolipin as well as anti-b2GPI antibodies were detected with homemade assays as previously described (4,5).

Lupus anticoagulant was verified with dilute Russell’s viper venom time (Dade Behring, Marburg, Germany), PTT-LA® and Staclot LA® (Stago, Asnières, France). Anti-PF4 antibodies were detected with Asserachrom HPIA® (Stago) (6). Platelet aggregation tests were performed by standard methods. Serotonin release assays were performed as previously described (7).

Anti-IL-8 antibodies were detected using surface plasmon resonance spectroscopy as previously reported (8). For platelet activation, the chromogenic assay measuring the phospholipid-related platelet procoagulant activity (PPA) in human washed platelet preparation (8) was adapted from Warner et al. (9). Serum was heat-inactivated for 30 min at 56°C and was centrifuged at 13 000 g for 45 min. Washed platelet suspension was added to serum and recombinant IL-8 at various concentrations in the absence or presence of UFH (Choay, Sanofi-aventis, Paris, France) in 96-well Polysorp plates and incubated for 1 h at room temperature. The reaction was stopped by diluting with TBS buffer (50 mM Tris, 175 mM NaCl, 0.02% NaN<sub>3</sub>, pH 7.9 containing 2 mg / mL BSA). For thrombin detection, 50 µL of platelet mixtures was transferred to wells containing 50 µL of FXa (1.2 nM), FVa (2.4 nM), CaCl<sub>2</sub> (15 mM) and 50 µL of bovine purified FII (6 µM) and S2238 substrate (0.6 mM). Purified FII, FVa and FXa were obtained from Synapse B.V. (Maastricht, The Netherlands) and the S2238 substrate from Chromogenix (Vienna, Austria). Plates were incubated for 5 min in the dark at room temperature and absorbance change was read at 405 nm. Results were expressed as nanomolar phosphatidylserine equivalent for 150 · 10<sup>9</sup> platelets by reference to a standard curve constructed with a mixture of phosphatidylserine, phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine (20 : 20 : 60 mol.%).

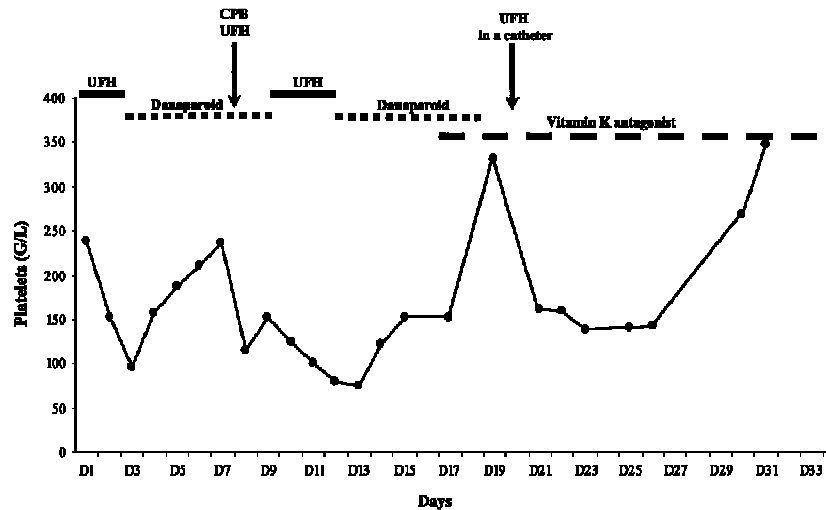


Figure 1 Time course of thrombocytopenia after heparin administration and treatments.

## Discussion

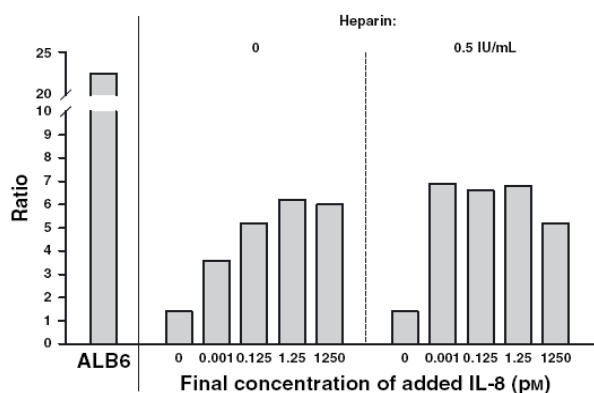
We report the case of a woman having thrombocytopenia which occurred early during the administration of heparin without any detectable anti-PF4 heparin antibodies. The platelet count returned to normal after heparin was stopped and alternative anticoagulant treatment administered; other causes of thrombocytopenia were ruled out (her APS has never been associated with thrombocytopenia).

In <5% of HIT, despite positive platelet activation tests, anti-PF4 heparin antibodies are not detectable by immunoassays, and other antigens such as IL-8 or NAP2 are described. In the case reported here, the presence of antibodies to IL-8 was positive (Table 1) while platelet activation (aggregation, secretion of serotonin or anionic phospholipid exposure at the platelet surface quantified by PPA) was not evidenced. However, upon addition of exogenous IL-8, serum-induced IL-8-dependent activation of washed platelets was observed (Fig. 2). Activation was maximal in the range of 1.25–1250 pmol / L IL-8. Addition of heparin facilitated this activation which was maximal with IL-8 concentrations as low as 0.001 pmol / L. Such antibodies have already been reported and their platelet-activating properties have been evidenced (8,10).

**Table 1** Detection of anti-IL8 antibodies by surface plasmon resonance

Sample	Signal with plasma (RU)	Signal with anti-IgG (RU)
Negative control	165 ± 5	230 ± 6
Positive control	385 ± 8	460 ± 12
Patient	315 ± 7	540 ± 13

Values are mean ± SD ( $n = 3$ ).  
RU, resonance unit.



**Figure 2** Platelet procoagulant activity measured by thrombin generation assay. Results were expressed in ratio of the PPA in the presence of IL-8 ± heparin vs. that in unstimulated platelets. Washed platelets incubated with ALB6 (10 µg/mL) were used as positive control of platelet activation.

The IL-8-dependent generation of procoagulant activity induced by the serum of this patient indicates strong platelet activation. Serum IL-8 level may not be sufficient to trigger this activation neither in vivo nor in conventional platelet activation tests in vitro. The presence of heparin may locally increase the density of IL-8 on the platelet surface and enhance IL-8-dependent platelet activation. This provides an explanation for thrombocytopenia in the early phase of heparin administration in this patient.

This case was complicated by the fact that the patient also had APS. Indeed several publications have highlighted the similarities between HIT and APS (11, 12). Both disorders are associated with antibodies specific for negatively charged molecules combined with a cationic protein and are characterized by thrombocytopenia associated with a paradoxical risk of venous and arterial thrombotic complications. Some patients with APS may have low titres of circulating HIT antibodies, even in the absence of heparin exposure (13–15). One explanation could be that, in some APS patients, the presence of heparin on the platelet surface could support the development of thrombocytopenia induced by antiphospholipid antibodies in absence of anti-PF4-heparin antibodies. Therefore the presence of antiphospholipid antibodies should not exclude the performance of additional investigations.

In conclusion, when thrombocytopenia occurs repeatedly after heparin administration, anti-IL8 antibodies and IL-8-dependent platelet activation should be verified when anti-PF4 heparin antibodies and conventional platelet activation assays are negative.

## Financial support

None.

## Conflict of interest

None.

## References

- Greinacher A. Heparin-induced thrombocytopenia: frequency and pathogenesis. *Pathophysiol Haemost Thromb* 2006;35:37–45.
- Warkentin TE. Think of HIT. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2006;408–14.
- Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T, et al. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J Thromb Haemost* 2006;4:295–306.
- Reber G, Arvieux J, Comby E, Degenne D, de Moerloose P, Sanmarco M, Potron G. Multicenter evaluation of nine

- commercial kits for the quantitation of anticardiolipin antibodies. *Thromb Haemost* 1995;73:444–52.
5. Reber G, Tincani A, Sanmarco M, de Moerloose P, Boffa MC. European Forum on Antiphospholipid Antibodies Standardization Group. Variability of anti-beta2 glycoprotein I antibodies measurement by commercial assays. *Thromb Haemost* 2005;94:665–72.
  6. Amiral J, Bridey F, Wolf M, Boyer-Neumann C, Fressinaud E, Vissac AM, Peynaud-Debayle E, Dreyfus M, Meyer D. Antibodies to macromolecular platelet factor 4-heparin complexes in heparin-induced thrombocytopenia: a study of 44 cases. *Thromb Haemost* 1995;73:21–8.
  7. Pouplard C, Amiral J, Borg JY, Vissac AM, Delahousse B, Gruel Y. Differences in specificity of heparin-dependent antibodies developed in heparin-induced thrombocytopenia and consequences on cross-reactivity with danaparoid sodium. *Br J Haematol* 1997;99: 273–80.
  8. Regnault V, de Maistre E, Carreaux JP, Gruel Y, Nguyen P, Tardy B, Lecompte T. Platelet activation induced by human antibodies to interleukin-8. *Blood* 2003;101: 1419–21.
  9. Warner MN, Pavord S, Moore JC, et al. Serum-induced platelet procoagulant activity: an assay for the characterization of prothrombotic disorders. *J Lab Clin Med* 1999;133:129–33.
  10. Amiral J, Marfaing-Koka A, Wolf M, Alessi MC, Tardy B, Boyer-Neumann C, Vissac AM, Fressinaud W, Poncz M, Meyer D. Presence of autoantibodies to Interleukin-8 or neutrophil-activating peptide-2 in patients with heparin-associated thrombocytopenia. *Blood* 1996;88: 410–6.
  11. Arnout J. The pathogenesis of the antiphospholipid syndrome: a hypothesis based on parallels with heparin-induced thrombocytopenia. *Thromb Haemost* 1996;75:536–41.
- Gruel Y. Antiphospholipid antibodies and heparin-induced thrombocytopenia: update on similarities and differences. *J Autoimmun* 2000;15:265–8.
12. Lasne D, Saffroy R, Bachelot C, Vincenot A, Rendu F, Papo T, Aiach M, Piette J-C. Tests for heparin-induced thrombocytopenia in primary antiphospholipid syndrome. *Br J Haematol* 1997;97:939.
  13. Martinuzzo ME, Forastiero RR, Adamczuk Y, Pombo G, Carreras LO. Antiplatelet factor 4-heparin antibodies in patients with antiphospholipid antibodies. *Thromb Res* 1999;95:271–9.
  14. Martin-Toutain I, Piette JC, Diemert MC, Faucher C, Jobic L, Ankri A. High prevalence of antibodies to platelet factor 4 heparin in patients with antiphospholipid antibodies in absence of heparin-induced thrombocytopenia. *Lupus* 2007;16:79–83.

## **9. Discussion de l'article**

Cet article illustre le cas d'une patiente souffrant d'un SaPL qui présente de façon récurrente des thrombopénies survenant précocement après administration d'héparine avec des tests PAT et SRA toujours négatifs et une recherche d'anticorps anti-PF4-H toujours négative. Le compte plaquettaire se normalise en quelques jours après l'arrêt de l'héparinothérapie et les autres causes de thrombopénies ont pu être exclues.

La TIH est une complication de l'héparinothérapie qui se produit chez 1 à 5% des patients traités par HNF et plus rarement par HBPM. Elle est due dans la grande majorité des cas à la présence d'auto-AC anti-PF4-H qui peuvent être mis en évidence par des tests immunologiques. Les AC anti-PF4 sont négatifs dans moins de 5% des TIH et d'autres anticorps tels l'AC anti-IL-8 et l'AC anti-NAP2 sont décrits.

Ce travail nous a permis de mettre en évidence la présence d'anticorps anti-IL-8 dépendants de la concentration d'héparine pour induire l'agrégation plaquettaire. En effet, après des dosages complémentaires, la présence d'anticorps anti-IL-8 est objectivée. L'activation plaquettaire (agrégation, sécrétion de sérotonine, exposition de phospholipides sur la surface plaquettaire) est par contre négative. Après ajout d'IL-8 exogène, on observe une activation des plaquettes lavées induite par le sérum et dépendante de l'IL-8. L'activation est maximale avec des doses de 1,25 à 1250 pmol/L d'IL-8. Cette activation est augmentée en présence d'héparine, même avec des doses d'IL-8 très basses de 0,001 pmol/l. Il est donc vraisemblable que l'IL-8 sérique n'est pas suffisante pour déclencher une activation plaquettaire ni *in vivo* ni *in vitro* lors des tests d'agrégation plaquettaire conventionnels. La présence d'héparine augmente la densité d'IL-8 sur la surface plaquettaire et engendre une activation plaquettaire. Nous recommandons donc d'effectuer des dosages complémentaires lors de haute suspicion de TIH avec des tests diagnostiques anti-PF4 et d'agrégation plaquettaire négatifs.

L'intérêt de ce cas était que la patiente était simultanément atteinte de SaPL. Les similarités entre les deux pathologies ont fait l'objet de plusieurs publications. Les deux syndromes sont associés à des auto-anticorps spécifiques pour des molécules chargées négativement combinées à des protéines chargées positivement et se

caractérisent par une thrombopénie accompagnée d'un risque paradoxal de thromboses veineuses ou artérielles.

Il est décrit que les patients souffrant de SaPL peuvent présenter des anticorps de TIH même en l'absence d'exposition à l'héparine. Chez certains de ces patients, la présence d'héparine sur la surface plaquettaire favoriserait le développement d'une thrombopénie induite par les aPL sans qu'il n'y ait formation d'anticorps anti-PF4-H. Les investigations complémentaires doivent donc être réalisées même chez les patients atteints de SaPL lorsqu'une TIH est suspectée.

## **10. Conclusion**

Ce travail, illustré par un case report récemment publié, montre les nombreuses similitudes physiopathologiques entre le mécanisme du SaPL et de la TIH ainsi que la multitude des anticorps en jeu. Tant chez les patients souffrant du SaPL que chez les patients atteints de TIH, le diagnostic, basé sur la clinique et la biologie, reste parfois difficile malgré la disponibilité d'un certain nombre de tests diagnostiques. Cependant, de nombreux tests restent trop coûteux pour être effectués ailleurs que dans certains grands centres européens. En cas de tests non concordants, des analyses supplémentaires doivent être effectuées afin de déterminer le ou les anticorps responsables pour optimiser la prise en charge du patient. Quant à la question de l'intrication et de l'éventuelle prédisposition à une TIH en présence d'un SaPL, elle semble très probable même si tous les mécanismes et les anticorps en jeu ne sont pas encore identifiés.

## 11. Références

- (1) GM Arepally, TL Ortel. Heparin-induced thrombocytopenia. *N Engl J Med* 2006; 355: 809-17.
- (2) Y Blanloeil. Thrombopénie induite par l'héparine. *STV* 2003; 15: 315-25.
- (3) TE Warkentin, A Greinacher. Heparin-induced thrombocytopenia, third edition, Marcel Dekker edition, 2004.
- (4) J Mac Lean. The discovery of heparin. *Am J Physiol* 1916; 41: 250.
- (5) WH Howell, E Holt. Studies on heparin. *Am J Physiol* 1918; 47: 328.
- (6) T Shionoya. Studies in experimental extracorporeal thrombosis : III. Effects of certain anticoagulants (heparin and hirudin) on extracorporeal thrombosis and on the mechanism of thrombus formation. *JEM* 1927; 46: 19-26.
- (7) C Crafoord. Preliminary report on post operative treatment with heparin as a preventive of thrombosis. *Acta Chir Scand* 1937; 79: 407-26.
- (8) RE Weissman, RW Tobin. Arterial embolism occurring during systemic heparin therapy. *AMA Arch Surg* 1958; 76: 219-25.
- (9) B Roberts, FE Rosato. Heparin a cause of arterial emboli ? *Surg* 1964; 55: 803-8.
- (10) GR Rhodes, RH Dixon, D Silver. Heparin induced thrombocytopenia with thrombotic and hemorrhagic manifestations. *Surg gynecol obstet* 1973; 136: 409-16.
- (11) JC Fratantoni, R Pollet, HR Gralnick. Heparin-induced thrombocytopenia : confirmation of diagnosis with in vitro methods. *Blood* 1975; 45: 395-401.
- (12) HG Klein, WR Bell. Disseminated intravascular coagulation during heparin therapy. *Ann Intern Med* 1974; 80: 477-81.
- (13) BH Chong, MC Berndt. Heparin-induced thrombocytopenia. *Blut* 1989; 58: 53-7.
- (14) J Amiral, F Bridey, M Dreyfus. Platelet factor 4 complexed to heparin is target for antibodies generated in heparin-induced thrombocytopenia. *Thromb haemost* 1992; 68: 95-6.
- (15) A Greinacher, J Amiral, V Dummel, A Vissac, V Kiefel, C Mueller-Eckhardt. Laboratory diagnosis of heparin-associated thrombocytopenia and comparison of platelet aggregation test, heparin-induced platelet activation test, and platelet factor 4/heparin enzyme-linked immunosorbent assay. *Transfusion* 1994; 34: 381-16.
- (16) TE Warkentin, JG Kelton. Temporal aspects of heparin-induced thrombocytopenia. *N Engl J Med* 2001; 344: 1286-92.
- (17) BH Chong. Heparin-induced thrombocytopenia. *Br J Haematol* 1995; 89: 431-9.

- (18) JH Levy, KA Tanaka, MJ Hursting. Reducing thrombotic complications in the perioperative setting: An update on HIT. *Anesth Analg* 2007; 105: 570-82.
- (19) TE Warkentin, J-A Sheppard, P Horsewood, PJ Simpson, JC Moore, JG Kelton. Impact of the patient population on the risk for heparin-induced thrombocytopenia. *Blood* 2000; 96: 1703-8.
- (20) A Ballota, HZ Saleh, HW El Baghdady, M Gomaa, F Belloli, H Kandil, Y Balbaa, F Bettinin, E Bossone, L Menicanti, A Frigiola, C Belluci, RH Mehta. Comparison of early platelet activation in patients undergoing on-pump versus off-pump coronary artery bypass surgery. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2007; 134: 132-8
- (21) E Lindhoff-Last, R Nakov, F Misselwitz, HK Breddin, R Bauersachs. Incidence and clinical relevance of heparin-induced antibodies in patients with deep vein thrombosis treated with unfractionated or low-molecular-weight heparin. *Br J Haematol* 2002; 118: 1137-42.
- (22) AF Klenner, N Lubenow, R Raschke, A Greinacher. Heparin-induced thrombocytopenia in children: 12 new cases and review of the literature. *Thromb Haemost* 2004; 91: 719-24.
- (23) MB Fausett, M Vogtlander, RM Lee, et al. Heparin-induced thrombocytopenia is rare pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 2001; 185: 148-52
- (24) SI O'Shea, JJ Sands, SA Nudo, TL Ortel. Frequency of anti-heparin-platelet factor 4 antibodies in hemodialysis patients and correlation with recurrent vascular access thrombosis. *Am J Hematol* 2002; 69: 72-3.
- (25) M Carrier, MA Rodger, D Fergusson, S Doucette, MJ Kovacs, J Moore, JG Kelton, GA Knoll. Increased mortality in haemodialysis patients having specific antibodies to the platelet factor 4-heparin complex. *Kidney international advance online publication* 2007.
- (26) JJY Chang, CR Parikh. When heparin causes thrombosis: significance, recognition and management of heparin-induced thrombocytopenia in dialysis patients. *Seminars in Dialysis* 2006; 19: 297-04
- (27) N Martel, J Lee, PS Wells. Risk for heparin-induced thrombocytopenia with unfractionated and low-molecular-weight heparin thromboprophylaxis: a meta-analysis. *Blood* 2005; 106: 2710-15.
- (28) P Prandoni, S Siragusa, B Girolami, F Fabris. The incidence of heparin-induced thrombocytopenia in medical patients treated with low-molecular-weight heparin: a prospective cohort study. *Blood* 2005; 106: 3049-54.



- (29) B Untch, S Ahmad, W Jeske, HL Messmore, DA Hoppensteadt, JM Walenga, H Lietz, J Fareed. Prevalence, isotype, and functionality of antiheparin-platelet factor 4 antibodies in patients treated with heparin and clinically suspected for heparin-induced thrombocytopenia: the pathogenic role of IgG. *Thrombosis Research* 2002; 105: 117-23.
- (30) A Greinacher, M Gopinadhan, JU Gunther, MA Omer-Adam, U Strobel, TE Warkentin, G Papastavrou, W Weischies, CA Helm. Close approximation of two platelet factor 4 tetramers by charge neutralization forms the antigens recognized by HIT antibodies. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, ahead of print
- (31) S Suvarna, B Espinasse, R Qi, R Lubica, M Poncz, DB Cines, MR Wiesner, GM Arepally. Determinants of PF4/heparin immunogenicity. *Blood* 2007; 110: 4253-60
- (32) C Pouplard, J Amiral, J-Y Borg, A-M Vissac, B Delahousse, Y Gruel. Differences in specificity of heparin-dependent antibodies developed in heparin-induced thrombocytopenia and consequences on cross-reactivity with danaparoid sodium. *Br J Haematol* 1997; 99: 273-80
- (33) J Amiral, A Marfaing-Koka, M Wolf, MC Alessi, B Tardy, C Boyer-Neumann, AM Vissac, W Fressinaud, M Poncz, D Meyer. Presence of autoantibodies to IL-8 or neutrophil-activating peptide-2 in patients with heparin-associated thrombocytopenia. *Blood* 1996; 88: 410-16.
- (34) E Brandt, HD Flad. Structure and function of platelet-derived cytokines of the  $\beta$ -thromboglobulin/interleukin 8 family. *Platelets* 1992; 3: 295.
- (35) M Baggiolini, A Walz, SL Kunkel. Neutrophil-activating peptide-1/interleukin-8, a novel cytokine that activates neutrophils. *J Clin Invest* 1989; 84: 1045-9.
- (36) L Sylvester, T Yoshimura, M Sticherling, JM Schröder, M Ceska, P Peichi, EJ Leonard. Neutrophil attractant protein-1-immuno-globulin G immune complexes and free anti-NAP- antibody in normal human serum. *J Clin Invest* 1992; 90: 471-81.
- (37) L Sylvester, AF Suffredini, AJ Boujoukos, GD Martich, RL Danner, T Yoshimura, EJ Leonard. Neutrophil attractant protein-1 and monocyte chemoattractant protein-1 in human serum. *J Immunol* 1993; 151: 3292-8.
- (38) K Bendtzen, MB Hansen, C Ross, LK Poulsen, M Svenson. Cytokines and autoantibodies to cytokines. *Stem Cells* 1995; 13: 206-22.
- (39) TK Liem, R Teel, S Shukla, D Silver. The glycoprotein IIb/IIIa antagonist c7E3 inhibits platelet aggregation in the presence of heparin-associated antibodies. *J Vasc Surg* 1997; 25: 124-30.

- (40) JP Héroult, A Lalé, P Savi, AM Pfliger, JM Herbert. In vitro inhibition of heparin-induced platelet aggregation in plasma from patients with HIT by SR 121566, a newly developed GPIIb/IIIa antagonist. *Blood Coag Fibrinol* 1997; 8: 206-7.
- (41) WP Jeske, JM Walenga, E Szatkowski, M Ero, JM Herbert, M Bakhos. Effect of glycoprotein IIb/IIIa antagonists on the HIT serum induced activation of platelets. *Thromb Res* 1997; 88: 271-81.
- (42) J-M Herbert, P Savi, W Jeske, J Walenga. Effect of SR 121566A, a potent GP IIb-IIIa antagonist, on the HIT serum/heparin-induced platelet mediated activation of human endothelial cells. *Thromb Haemost* 1998; 80: 326-31
- (43) A Amirkhosravi, M Alexander, K May, DA Francis, G Warnes, J Biggerstaff, JL Francis. The importance of platelets in the expression of monocyte tissue factor antigen measured by a new whole blood flow cytometric assay. *Thromb Haemost* 1996; 75: 87-95
- (44) TE Warkentin, CPM Hayward, LK Boshkov, AV Santos, JAI Sheppard, AP Bode, JG Kelton. Sera from patients with heparin-induced thrombocytopenia generate platelet-derived microparticles with procoagulant activity: an explanation for the thrombotic complications of heparin induced thrombocytopenia. *Blood* 1994; 84: 3691-99.
- (45) PE Stenberg, RP McEver, MA Shuman et al. A platelet  $\alpha$ -granule membrane protein (GMP-140) is expressed on the plasma membrane after activation. *J Cell Biol* 1985; 101: 880-6.
- (46) R Fijnheer, CJ Frijns, J Kortuweg, et al. The origin of P-selectin as a circulating plasma protein. *Thromb Haemost* 1997; 77: 1081-85.
- (47) E Papalambros, F Sigala, A Travlou, E Bastounis, P Mirilas. P-Selectin and antibodies against heparin-platelet factor 4 in patients with venous or arterial diseases after a 7-day heparin treatment. *J Am Coll Surg* 2004; 199: 69-77
- (48) A Greinacher, B Potzsch, J Amiral, V Dummel, A Eichner, C Mueller-Eckhardt. Heparin-associated thrombocytopenia: isolation of the antibody and characterization of a multimolecular PF4-heparin complex as the major antigen. *Thromb Haemost* 1994; 71: 247-51.
- (49) BH Chong, I Fawaz, CN Chesterman, MC Berndt. Heparin-induced thrombocytopenia: a mechanism of interaction of the heparin-dependent antibody with platelets. *Br J Haematol* 1989; 73: 235-40.

- (50) JG Kelton, D Sheridan, A Santos, J Smith. Heparin-induced thrombocytopenia: Laboratory studies. *Blood* 1988; 72: 925-30.
- (51) GP Visentin, SE Ford, JP Scott, RH Aster. Antibodies from patients with heparin-induced thrombocytopenia/thrombosis are specific for platelet factor 4 complexed with heparin or bound to endothelial cells. *J Clin Invest* 1994; 93: 81-8.
- (52) MF Alberto, EI Bermejo, MA Lazzari. Fcγ receptors on human umbilical vein endothelial cells. Evaluation by flow cytometry. *Thromb Haemost* 1997; suppl 1:142.
- (53) DB Cines, A Tomaski, S Tannenbaum. Immune endothelial-cell injury in heparin-associated thrombocytopenia. *N Engl J Med* 1987; 316: 581-9.
- (54) P Prandoni, A Falanga, A Piccioli. Cancer, thrombosis and HIT. *Thromb Res* 2007; 120: 137-40.
- (55) A Greinacher, B Farner, H Kroll, T Kohlmann, TE Warkentin, P Eichler. Clinical features of heparin-induced thrombocytopenia including risk factors for thrombosis: a retrospective analysis of 408 patients. *Thromb Haemost* 2005; 94: 132-5.
- (56) TE Warkentin, JG Kelton. A 14-year study of heparin-induced thrombocytopenia. *Am J Med* 1996; 101: 502-7.
- (57) B Girolami, P Prandoni, PM Stefani, et al. The incidence of heparin-induced thrombocytopenia in hospitalized medical patients treated with subcutaneous unfractionated heparin: a prospective cohort study. *Blood* 2003; 101: 2955-59.
- (58) Y Gruel, A Rupin, H Watier, S Vigier, P Bardos, J Leroy. Anticardiolipin antibodies in heparin-associated thrombocytopenia. *Thromb Res* 1992; 67: 601-6.
- (59) BE Lewis, DE Wallis, SD Berkowitz, et al. Argatroban anticoagulant therapy in patients with heparin-induced thrombocytopenia. *Circulation* 2001; 103: 1838-43.
- (60) N Lubenow, P Eichler, T Lietz, A Greinacher. Lepirudin in patients with heparin-induced thrombocytopenia: results of the third prospective study (HAT-3) and a combined analysis of HAT-1, HAT-2, and HAT-3. *J Thromb Haemost* 2005; 3: 2428-36.
- (61) R Pendleton, MM Wheeler, GM Rodgers. Argatroban dosing of patients with heparin-induced thrombocytopenia and an elevated aPTT due to antiphospholipid antibody syndrome. *The Annals of Pharmacotherapy* 2006; 40: 972-6.
- (62) A Greinacher, B Farner, H Kroll, T Kohlmann, TE Warkentin, P Eichler. Clinical features of heparin-induced thrombocytopenia including risk factors for thrombosis: a retrospective analysis of 408 patients. *Thromb Haemost* 2005; 94: 132-5.

- (63) BH Chong, J Burgess, F Ismail. The clinical usefulness of the platelet aggregation test for the diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia. *Thromb Haemost* 1993; 69: 344-50.
- (64) TE Warkentin. Laboratory testing for heparin-induced thrombocytopenia. *J Thromb Thrombolysis* 2000; 10: 35-45.
- (65) EJ Favaloro, E Bernal-Hoyos, T Wxner, J Koutts. Heparin-induced thrombocytopenia: laboratory investigation and confirmation of diagnosis. *Pathology* 1992; 24: 177-83.
- (66) TE Warkentin, J-Al Sheppard, JC Moore, KM Moore, CS Sigouin, JG Kelton. Laboratory testing for the antibodies that cause heparin-induced thrombocytopenia: how much class do we need ? *J Lab Clin Med* 2005; 146: 341-6.
- (67) TE Warkentin, A Greinacher. Heparin-induced thrombocytopenia: recognition, treatment, and prevention: the Seventh ACCP Conference on Antithrombotic and Thrombolytic Therapy. *Chest* 2004; 126: suppl: 311S-337S.
- (68) C Pouplard, P Gueret, M Fouassion, C Ternisien, M Trossaert, S Régina, Y Gruel. Prospective evaluation of the "4Ts" score and particle gel immunoassay specific to heparin/PF4 for the diagnosis of HIT. *J Thromb Haemost* 2007; 5: 1373-9.
- (69) C Pouplard, J Amiral, JY Borg, S Laporte-Simitsidis, B Delahousse, Y Gruel. Decision analysis for use of platelet aggregation test, carbon 14-serotonin release assay, and heparin-platelet factor 4 enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia. *Am J Clin Pathol* 1999; 111: 700-6.
- (70) AK Berma, M Levine, SJ Shalansky, CJ Carter, JG Kelton. Frequency of heparin-induced thrombocytopenia in critical care patients. *Pharmacotherapy* 2003; 23: 745-53.
- (71) GK Lo, D Juhl, TE Warkentin, CS Sigouin, P Eichler, A Greinacher. Evaluation of pretest clinical score (4T's) for the diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia in two clinical settings. *J Thromb Haemost* 2006; 4: 759-65.
- (72) D Sheridan, C Carter, JG Kelton. A diagnostic test for heparin-induced thrombocytopenia. *Blood* 1986; 67: 27-30.
- (73) SL Pfueller, R David. Different platelet specificities of heparin-dependent platelet aggregating factors in heparin-associated immune thrombocytopenia. *Br J Haematol* 1986; 64: 149-59.

- (74) J Harenberg, G Huhle, CH Giese, LC Wang, M Feuring, XH Song, U Hoffmann. Determination of serotonin release from platelets by enzyme immunoassay in the diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia. *Br J Haematol* 2000; 109: 182-6.
- (75) TE Warkentin, LJ Elavathil, CP Hayward, MA, Hohnston, JI Russett, JG Kelton. The pathogenesis of venous limb gangrene associated with heparin-induced thrombocytopenia. *Ann Intern Med* 1997; 127: 804-12.
- (76) K Hassell. The management of patients with heparin-induced thrombocytopenia who require anticoagulant therapy. *Chest* 2005; supplement 127:1S-8S.
- (77) TE Warkentin, JG Kelton. Delayed-onset heparin-induced thrombocytopenia and thrombosis. *Ann Intern Med* 2001; 135: 502-6.
- (78) LMD Rice, WKMD Attisha, AMSRN Drexler, JLP Francis. Delayed-onset heparin-induced thrombocytopenia. *Ann Intern Med* 2002; 136: 210-15.
- (79) JP Wester, A Leyte, HM Oudemans-van Staaten, RJ Bosman, JI van der Spoel, EA Haak, L Porcelijn, DF Zandstra. Low-dose fondaparinux in suspected heparin-induced thrombocytopenia in critically ill. *Neth J Med* 2007; 65: 101-8.
- (80) HN Magnani, A Gallus. Heparin induced thrombocytopenia (HIT): a report of 1478 clinical outcomes of patients treated with danaparoid (Orgaran) from 1982 to mid-2004. *Thromb Haemost* 2006; 95: 967-81.
- (81) B Farner, P Eichler, H Kroll, A Greinacher. A comparison of danaparoid and leprudin in heparin-induced thrombocytopenia. *Thromb Haemost* 2001; 85: 950-57.
- (82) B Tardy, T Lecompte, F Boehlen, B Tardy-Poncet, I Elalamy, P Morange, Y Gruel, M Wolf, D François, E Racadot, P Camarasa, MT Blouch, F Nguyen, S Doubine, F Dutrillaux, M Alhenc-Gelas, I Martin-Toutain. Predictive factors for thrombosis and major bleeding in an observational study in 181 patients with heparin-induced thrombocytopenia treated with lepirudin. *Blood* 2006;108: 1492-6.
- (83) N Lubenow, P Eichler, T Lietz, B Farner, A Grenacher. Lepirudin for prophylaxis of thrombosis in patients with acute isolated heparin-induced thrombocytopenia: an analysis of 3 prospective studies. *Blood* 2004; 104: 3072-7.
- (84) SL Perry, SI O'Shea, TL Ortel. Management of lepirudin therapy for a patient with antiphospholipid antibody syndrome using the whole blood ecarin clot time and activated partial thromboplastin time. *Blood Coag Fibrinolysis* 2003; 14: 601-4.
- (85) A Greinacher, N Lubenow, P Eichler. Anaphylactic and anaphylactoid reactions associated with lepirudin in patients with heparin-induced thrombocytopenia. *Circulation* 2003; 108: 2062-5.

- (86) A Wasserman, A Neisser, C Bruck. Eine serodiagnostische reaktion bei syphilis. Deutsche Med Wochenschr 1906; 32: 745.
- (87) S Mayakis, MD Lockshin, T Atsumi, DW Branch, RL Brey, R Cervera, RHWM Derkesen, PG De Groot, T Koike, PL Meroni, G Reber, Y Shoenfeld, A Tincani, PG Vlachoyiannopoulos, SA Krilis. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). J Thromb Haemost 2005; 4: 295-306.
- (88) M Kaul, D Erkan, L Sammaritano, MD Lockshin. Assessment of the 2006 revised antiphospholipid syndrome classification criteria. Ann Rheum Dis 2007; 66: 927-30.
- (89) L Darnige. Laboratory diagnosis of antiphospholipid syndrome. Rev Med Int 2006 ; 27 : 296-301.
- (90) P Vila, MC Hernandez, MF Lopez-Fernandez, J Batlie. Prevalence, follow-up and clinical significance of the anticardiolipin antibodies in normal subjects. Thromb Haemost 1994; 72: 209-13.
- (91) AA Long, JS Ginsberg, P Brill-Edwards, et al. The relationship of antiphospholipid antibodies to thromboembolic disease in systemic lupus erythematosus: a cross-sectional study. Thromb Haemost 1991; 66: 520-4.
- (92) RT Canosa, RM de Oliveira, RA Nixon. Neuroleptic-associated autoantibodies: a prevalence study. Biol Psychiatry 1990; 27: 863-70.
- (93) DP Lillicrap, M Pinto, K Benford, PM Ford, S Ford. Heterogeneity of laboratory test results for antiphospholipid antibodies in patients treated with chlorpromazine and other phenothiazine. Am J Clin Pathol 1990; 93: 771-5.
- (94) JS Ginsberg, PS Wells, P Brill-Edwards, et al. Antiphospholipid antibodies and venous thrombo-embolism. Blood 1995; 86: 2385-91.
- (95) J Mateo, A Oliver, M Borrell, N Sala, J Fontcuberta. Laboratory evaluation and clinical characteristics of 2132 consecutive unselected patients with venous thromboembolism: results of the Spanish Multicentric Study on Thrombophilia (EMET-Study). Thromb Haemost 1997; 77: 444-51.
- (96) LW Chamley, EJ McKay, NS Pattison. Inhibition of heparin/antithrombin III cofactor activity by anticardiolipin antibodies: a mechanism for thrombosis. Thromb Res 1993; 71: 103-11.
- (97) EM Lafer, J Rauch, C Andrezejewski, D Mudd, B Furie, RS Schwartz, BD Stoller. Polyspecific monoclonal lupus autoantibodies reactive with both polynucleotides and phospholipids. J Exp Med 1981; 153: 897-909.

- (98) Y Schoenfeld, J Rauch, H Massicotte, SK Datta, J Andre-Schwartz, BD Stoller, RS Schwartz. Polyspecificity of monoclonal lupus auto-antibodies produced by human-human hybridomas. *N Engl J Med* 1983; 308: 414-20.
- (99) P Faaber, PJA Capel, GPM Ruke, G Vier Winden, LBA Van De Putte, RAP Koene. Cross-reactivity of anti-DNA antibodies with proteoglycans. *Clin Exp Immunol* 1984; 55: 502-8.
- (100) P Faaber, TPM Ruke, LBA Van De Putte, PJA Capel JHM Berden. Cross-reactivity of human and murine anti-DNA antibodies with heparin sulphate. *J Clin Invest* 1986; 77: 1824-30.
- (101) EN Harris, SS Pierangeli. Revisiting the anticardiolipin test and its standardization. *Lupus* 2002; 11: 2269-75.
- (102) M Galli, S Cortelazzo, T Barbui. Lack of cross-reactivity between anticardiolipin antibodies and glycosaminoglycans. *Thromb Res* 1990; 59: 363-7.
- (103) DR Wagenknecht, JA McIntyre. Interaction of heparin with beta2-glycoprotein I and antiphospholipid antibodies *in vitro*. *Thromb Res* 1992; 68: 495-500.
- (104) DA Triplett. Antiphospholipid antibodies. *Arch Pathol Lab Med* 2002; 126: 1424-9.
- (105) A Tripodi, V Chantarangkul, M Clerici, PM Mannucci. Laboratory diagnosis of lupus anticoagulants for patients on oral anticoagulant treatment: performance of dilute Russell viper venom test and silica clotting time in comparison with Staclot LA. *Thromb Haemost* 2002; 88:583-6.
- (106) W Shi, SA Krilis, BH Chong, S Gordon, CN Chesterman. Prevalence of lupus anticoagulant and anticardiolipin antibodies in a healthy population. *Aust N Z J Med* 1990; 20: 231-6.
- (107) JT Brandt, DA Triplett, B Alving, I Scharrer. Criteria for the diagnosis of lupus anticoagulants: an update. *Thromb Haemost* 1995; 74: 1185-90.
- (108) J Nimpf, EM Bevers, P Bomans, W Till, H Wurm, GM Kostner, RFA Zwaal. Prothrombinase activity of human platelets is inhibited by beta-2-glycoprotein-I. *Biochimica et Biophysica Acta* 1986; 884: 142-9.
- (109) T McNally, SE Cotterell, IJ Mackie, DA Isenberg, SJ Machin. The interaction of beta2-glycoprotein-I and heparin and its effect on beta2-glycoprotein-I antiphospholipid antibody cofactor function in plasma. *Thromb Haemost* 1994; 72: 578-81.

- (110) S Shibata, PC Harpel, A Gharavi, J Rand, H Fillit. Autoantibodies to heparin from patients with antiphospholipid antibody syndrome inhibit formation of antithrombin III-thrombin complexes *Blood* 1994; 83: 2532-40.
- (111) MD Lockshin. Antiphospholipid antibody and antiphospholipid syndrome. *Curr Opin Rheum* 1991; 3: 797-802.
- (112) HP McNeil, CM Chesterman, SA Krilis. Immunology and clinical importance of antiphospholipid antibodies. *Adv Immunol* 1991; 49: 193-280.
- (113) JA Marcum, DH Atha, LMS Fritze, P Nawroth, D Stern, RDR Rosenberg. Cloned bovine aortic endothelial cells synthesize anticoagulant active heparin sulphate proteoglycan. *J Biol Chem* 1986; 261: 7507-17.
- (114) P Faaber, TPM Rijke, LBA Van De Putte, PJA Capel, JHM Berden. Cross-reactivity of human and murine anti-DNA antibodies with heparan sulfate. The major glycosaminoglycan in glomerular basement membrane. *J Clin Invest* 1986; 77: 1824-30.
- (115) RM Termaat, K Brinkman, JC Nossent, AJG Swaak, RJT Smeenk, JHM Berden. Anti-heparan sulfate reactivity in sera from patients with systemic lupus erythematosus with renal or non-renal manifestations. *Clin Exp Immunol* 1990; 82: 268-74.
- (116) H Fillit, R Lahita. Antibodies to vascular heparan sulfate proteoglycan in patients with systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity* 1991; 9:159-64.
- (117) W Lim, MA Crowther, JW Eikelboom. Management of antiphospholipid antibody syndrome. *JAMA* 2006; 295: 1050-7.
- (118) HP McNeil, RJ Simpson, CN Chesterman, SA Krilis. Anti-phospholipid antibodies are directed against a complex antigen that includes a lipid-binding inhibitor of coagulation: beta2-GPI. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 4120-4.
- (119) M Galli, D Luciani, G Bertolini, T Barbui. Anti-beta2GPI, antiprothrombin antibodies and the risk of thrombosis in the antiphospholipid syndrome. *Blood* 2003; 102: 2717-23.
- (120) PG de Groot, RH Derksen. Pathophysiology of the antiphospholipid syndrome. *J Thromb Haemost* 2005; 3: 1854-60.
- (121) A Satoh, K Suzuki, E Takayama. Detection of anti-annexin IV and V antibodies in patients with antiphospholipid syndrome and systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 1999; 26: 1715-20.



- (122) HR Buller, G Agnelli, RD Hull, TM Hyers, MH Prins, GE Raskob. Antithrombotic therapy for venous thromboembolic disease: the Seventh ACCP Conference on antithrombotic and thrombolytic therapy. *Chest* 2004; 126: 401S-28S.
- (123) J Jackson, M McDonald, E Casey, S Kelleher, A Murray, I Temperley, G Shanik, C Feighery, F Jackson. Mixed connective tissue disease with arterial thrombosis antiphospholipid antibodies and heparin induced thrombocytopenia. *J Rheumatol* 1990; 17: 1523-4.
- (124) J Arnout. The pathogenesis of the antiphospholipid syndrome: a hypothesis based on parallelisms with heparin-induced thrombocytopenia. *Thromb Haemost* 1996; 4: 536-41.
- (125) G Finazzi, R Marchioli, V Brancaccio. A randomized clinical trial of high-intensity warfarin vs conventional antithrombotic therapy for the prevention of recurrent thrombosis in patients with the antiphospholipid syndrome. *J Thromb Haemost* 2005; 3: 848-53.
- (126) G Finazzi, B Brancaccio, M Moia. Natural history and risk factors for thrombosis in 360 patients with antiphospholipid antibodies: a four-year prospective study from the Italian registry. *Am J Med* 1996; 100: 530-6.
- (127) F Dentali, E Manfredi, M Crowther, W Ageno. Long duration therapy with low molecular weight heparin in patients with antiphospholipid antibody syndrome resistant to warfarin therapy. *J Thromb Haemost* 2005; 3: 2121-3.
- (128) RA Asherson, R Cervera, PG de Groot. Catastrophic antiphospholipid syndrome: international consensus statement on classification criteria and treatment guidelines. *Lupus* 2003; 12: 530-4.
- (129) The APASS Writing Committee. Antiphospholipid antibodies and subsequent thrombo-occlusive events in patients with ischemic stroke. *JAMA* 2004; 291: 576-84.
- (130) RL Brey, J Chapman, SR Levine. Stroke and the antiphospholipid syndrome : consensus meeting Taormina 2002. *Lupus* 2003; 12: 508-13.
- (131) SM Bates, IA Greer, J Hirsh, JS Ginsberg. Use of antithrombotic agents during pregnancy: the Seventh ACCP Conference on antithrombotic and thrombolytic therapy. *Chest* 2004; 126: 627S-644S.
- (132) A Greinacher, M Gopinadhan, JU Günther, MA Omer-Adam, U Strobel, TE Warkentin, G Papastavron, W Weitschies, CA Helm. Close approximation of two platelet factor 4 tetramers by charge neutralization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26: 2386-93.

- (133) D Lasne, R Saffroy, C Bachelot, A Vincenot, F Rendu, T Papo, M Aiach, JC Piette. Tests for heparin-induced thrombocytopenia in primary antiphospholipid syndrome. *Br J Haematol* 1997; 97: 927-940.
- (134) ME Martinuzzo, RR Forastiero, Y Adamczuk, G Pombo, LO Carreras. Antiplatelet factor4-heparin antibodies in patients with antiphospholipid antibodies *Thromb Res* 1999; 95: 271-9.
- (135) Y Gruel. Antiphospholipid syndrome and heparin-induced thrombocytopenia: update on similarities and differences. *J Autoimmunity* 2000; 15: 265-8.