



HAL
open science

Syndrome des antiphospholipides “ séronégatif ” : mythe ou réalité ?

V. Salle

► **To cite this version:**

V. Salle. Syndrome des antiphospholipides “ séronégatif ” : mythe ou réalité ?. La Revue de Médecine Interne, 2020, 41, pp.265 - 274. <10.1016/j.revmed.2020.02.005>. <hal-03489740>

HAL Id: hal-03489740

<https://hal.science/hal-03489740v1>

Submitted on 22 Aug 2022

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

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



Distributed under a Creative Commons CC BY-NC 4.0 - Attribution - Non-commercial use - International License

Syndrome des antiphospholipides « séronégatif » : mythe ou réalité ?

Seronegative antiphospholipid syndrome : myth or reality ?

^{1,2} V. Salle

1 Service de Médecine Interne, 2 Laboratoire de Biochimie Recherche, CHU Amiens-Picardie, Amiens

Correspondence to: Dr V. Salle, Department of Internal Medicine, Amiens University Hospital, 1 place Victor Pauchet, F-80054 Amiens cedex 1 , France.

Phone: +33 322 668230

Fax: +33 322 668239

E-mail: salle.valery@chu-amiens.fr

Mots clés : syndrome des antiphospholipides séronégatif, anticorps antiphospholipides

Keywords : seronegative antiphospholipid syndrome, antiphospholipid antibodies

RÉSUMÉ

Le syndrome des antiphospholipides (SAPL) est une maladie systémique auto-immune caractérisée par l'association de manifestations thrombotiques et/ou de complications obstétricales à la présence persistante à 12 semaines d'anticorps antiphospholipides (aPL) : anticoagulant circulant de type lupique ou « lupus anticoagulant » (LA) et/ou anticorps anticardiolipine (ACL) et/ou anticorps anti- β 2 glycoprotéine I (a β 2GPI). La découverte de patients avec un tableau clinique très évocateur de SAPL en l'absence des critères biologiques conventionnels a conduit au concept de SAPL « séronégatif ». Durant ces dernières années, de nouvelles cibles antigéniques et de nouvelles approches méthodologiques ont été utilisées afin d'identifier plus clairement ce syndrome chez des patients présentant des thromboses ou des complications obstétricales en l'absence d'aPL conventionnels. Bien que le SAPL « séronégatif » fait encore l'objet de controverse, il existe une reconnaissance croissante de l'existence de ce sous-groupe. Cependant, l'utilité clinique des aPL non conventionnels nécessite d'être confirmée par des efforts de standardisation de ces nouveaux outils biologiques et par des études longitudinales impliquant de larges cohortes de patients.

ABSTRACT

The antiphospholipid syndrome (APS) is a systemic autoimmune disease characterized by thrombosis and/or obstetrical manifestations and the persistent presence, at least 12 weeks apart, of antiphospholipid antibodies (aPL) such as lupus anticoagulant (LA) and/or anticardiolipin antibodies (ACL) and/or anti- β 2 glycoprotein I antibodies (a β 2GPI). The finding of patients with clinical profile highly suggestive of APS but who are negative for conventional biological criteria has led to the concept of seronegative APS. In the last few years, new antigen targets and methodological approaches have been employed to more clearly identify this syndrome in patients with thrombosis or obstetrical complications without conventional aPL. Although seronegative APS is still controversial, there is increasing recognition of the existence of this subgroup. However, clinical relevance of non conventional aPL need to be confirmed by efforts toward standardizing new biological tools and longitudinal studies involving large cohort of patients.

Le syndrome des antiphospholipides (SAPL) est une maladie systémique auto-immune caractérisée par l'association d'un événement thrombotique (thrombose artérielle et/ou veineuse) et/ou d'une manifestation obstétricale (fausses couches spontanées récurrentes et/ou mort foetale inexpliquée et/ou insuffisance placentaire) à la présence persistante d'anticorps antiphospholipides (aPL) : anticoagulant circulant de type lupique ou « lupus anticoagulant » (LA) et/ou anticorps anticardiolipine (ACL) IgG ou IgM à un titre moyen ou élevé et/ou anticorps anti- β 2 glycoprotéine I ($\alpha\beta$ 2GPI) IgG ou IgM (taux > 99^e percentile). Le critère biologique doit être retrouvé sur au moins deux prélèvements espacés d'au moins 12 semaines [1]. Initialement individualisé au sein du lupus érythémateux systémique (LES), le SAPL s'est progressivement autonomisé, conduisant à la reconnaissance du SAPL primaire, en l'absence de LES ou d'autres maladies auto-immunes associées. Le concept de SAPL primaire est apparu dans des premiers éditoriaux en 1988 [2, 3].

Bien que le diagnostic de SAPL repose sur la combinaison d'au moins un critère clinique et la détection d'aPL circulants, certains patients présentent parfois un tableau clinique évocateur de SAPL en l'absence des critères biologiques conventionnels internationaux, conduisant au concept de SAPL « séronégatif ». Les deux premières observations de SAPL « séronégatif » ont été rapportées dans les années 1990. Il s'agissait de 2 patientes ayant présenté un livedo reticularis, plusieurs manifestations thrombotiques artérielles et/ou veineuses et obstétricales (perte(s) foetale(s)) en l'absence d'aPL [4, 5]. Le terme de « SAPL séronégatif » a été pour la première fois introduit par McCarty à partir d'une étude sur une série de 53 patients [6]. Il a été ensuite repris par d'autres auteurs [7]. Ainsi, en 2003, Hughes et Kamashta suggèrent le terme de SAPL « séronégatif » en présence de caractéristiques cliniques de SAPL mais en l'absence d'aPL « classiques » [7]. Depuis, plusieurs cas cliniques de SAPL « séronégatif » ont été rapportés, notamment au cours du LES [8-11]. A l'image du SAPL « classique », le SAPL « séronégatif » peut aussi évoluer vers un tableau de coagulopathie disséminée, variant clinique connu sous le nom de SAPL catastrophique (CAPS). Le CAPS, individualisé par Asherson en 1992, est caractérisé par la survenue simultanée de thromboses, leur diffusion et leur prédominance pour la microcirculation, conduisant à un tableau de défaillance multiviscérale [12, 13]. Trois observations de CAPS « séronégatif » ont aussi été rapportées [14-16].

Une étude a montré que les patients avec un SAPL « séronégatif » présentaient un profil clinique similaire à ceux avec un SAPL « classique », à la fois en termes de fréquence d'événement thrombotique ou de morbidité obstétricale [17]. Cependant, les auteurs n'avaient pas réalisé un bilan de thrombophilie chez tous les patients. Même si en pratique clinique, le diagnostic de SAPL « séronégatif » peut être évoqué chez certains patients, la réalité de cette entité au sein du SAPL est l'objet de controverse. En 2011, Cervera et al. ont proposé un algorithme diagnostique du SAPL « séronégatif » [18]. Le syndrome de Sneddon associe un livedo à des accidents vasculaires cérébraux ischémiques avec la présence très variable d'aPL, de 0 à 85% selon les séries [19, 20], dont les frontières nosologiques avec le SAPL « séronégatif » sont assez floues. Il n'existe pas de marqueur permettant de distinguer le SAPL « séronégatif » du syndrome de Sneddon. Compte tenu que ces deux entités partagent la plupart des mêmes caractéristiques cliniques et la même caractéristique pathologique (« artériolopathie occlusive »), certains en viennent à considérer que le syndrome de Sneddon pourrait représenter un véritable SAPL « séronégatif » [21].

Situations pouvant négativer la recherche des aPL

Différents événements cliniques peuvent négativer les aPL. Une diminution des taux d'aPL IgG et IgM a été observée chez 6 patients lupiques présentant un syndrome néphrotique [22]. Les facteurs pouvant alors influencer les taux d'anticorps chez ces patients avec syndrome néphrotique pourraient être représentés par la diminution de leur synthèse et/ou l'augmentation de leur catabolisme, la perte urinaire touchant uniquement les IgG [22]. Les titres d'aPL peuvent aussi diminuer durant un traitement par corticostéroïdes [23]. La recherche d'aPL peut aussi se révéler négative au cours de l'événement thrombotique aigu du fait de leur consommation [24, 25]. Ainsi, des résultats négatifs d'aPL immédiatement après l'épisode thrombotique ne peuvent être considérés comme étant définitifs. En effet une séroconversion positive des IgG ACL a été observée chez 2 patients respectivement à 2 et 7 mois après l'événement thrombotique [25].

Du point de vue biologique, différentes situations peuvent aussi expliquer la négativité de la recherche des aPL. La détection du LA est réalisée selon les recommandations de 2009 de l'ISTH/SSC (International Society on Thrombosis and Haemostasis/Scientific and Standardisation Committee) [26]. Il existe d'autres

recommandations pour la détection du LA, celles du British Committee for Standards in Haematology [27] et enfin celles plus récentes du CSLI (Clinical and Laboratory Standards Institute), publiées en 2014 [28]. Cependant, certains facteurs biologiques peuvent conduire à des résultats « faux » négatifs tels qu'une préparation inadéquate du plasma (absence de double centrifugation avec présence de plaquettes résiduelles représentant une source de phospholipides interférant avec les tests de détection du LA) ou des taux élevés du facteur VIII durant la phase aiguë de l'événement thrombotique pouvant masquer le LA [26]. Durant la grossesse, les taux élevés de facteur VIII peuvent aussi conduire à un raccourcissement du TCA et le temps de venin de vipère Russel dilué (dRVVT) peut changer pour des raisons inconnues [26]. Il existe aussi un risque de « faux » négatifs lors du dernier trimestre de la grossesse par dilution des anticorps [29]. L'hydroxychloroquine (HCQ) réduit la liaison des complexes IgG aPL/ β 2GPI aux bicouches phospholipidiques et peut interférer faiblement avec le test de dépistage du LA [30], l'aspirine et le clopidogrel n'interférant pas [26]. L'HCQ peut aussi avoir des effets sur les tests ELISA de dépistage des IgG ACL et des IgG α 2GPI en réduisant significativement les taux d'anticorps [30].

Plusieurs facteurs peuvent interférer avec les techniques ELISA commerciales de détection des ACL et des α 2GPI tels qu'une hypergammaglobulinémie, une gammopathie monoclonale ou encore la présence d'un facteur rhumatoïde IgM [29, 31-33]. Des recommandations pour la recherche des ACL et α 2GPI par des essais en phase solide ont été publiées en 2014 par les experts d'une sous-commission sur le LA et les aPL de l'ISTH [33]. Toutefois, le manque de standardisation des différentes techniques ELISA conduit à une grande variabilité inter-essai et entre les laboratoires [34]. De nouvelles techniques pour la détection des aPL ont été développées au cours de ces dernières années [35].

Avancées technologiques dans la détection des aPL

De nouvelles méthodes de détection des aPL diffèrent des techniques ELISA standard en termes de présentation antigénique des protéines et/ou des complexes phospholipides/protéine [35].

Chimiluminescence

L'immunodosage par chimiluminescence entièrement automatisé est une méthode alternative à la technique ELISA, pouvant améliorer la reproductibilité et réduire les

variations inter-laboratoires [34, 35]. Même si la variation inter-laboratoire reste faible [36], il existe une large variabilité inter-essai [37]. Différents auteurs ont évalué les performances diagnostiques de cette technique en comparaison avec l'ELISA pour la détection des aPL. Celle-ci est similaire aux techniques ELISA (kits commerciaux et techniques « maison ») [37-39]. Des auteurs ont rapporté que la sensibilité de la technique de chimiluminescence était inférieure à celle de l'ELISA [39, 40]. Cependant d'autres études semblent montrer que la technique de chimiluminescence présente une meilleure sensibilité dans la détection des IgG a β 2GPI [41-43]. Une autre étude montre aussi que cette technique est performante dans la détection des IgG ACL chez les patients suspects de SAPL avec une sensibilité de 100% et une spécificité de 72.3% [44]. Il semble donc que la sensibilité soit meilleure. Meneghel et al. ont évalué cette technique chez des patients présentant un SAPL primaire mais aussi chez des patients avec un SAPL « séronégatif » [39]. Parmi 88 patients avec SAPL « séronégatif », en utilisant cette technique de chimiluminescence pour la détection des aPL, ils ont pu classifier 17 d'entre eux comme ayant un SAPL, répondant alors aux critères cliniques et biologiques [39]. Cela pourrait provenir d'une différence de conformation du site de liaison à l'antigène entre les techniques ELISA et de chimiluminescence. En effet, dans l'une, il s'agit de particules magnétiques et dans l'autre, on utilise la surface de micropuits [35, 39]. On peut supposer que les antigènes fixés exposent différents épitopes reconnus par les aPL et cette technique de chimiluminescence permet ainsi de détecter certains ACL et a β 2GPI non dépistés en ELISA [39].

Immuno-DOT

La technique de multiplexage par immuno-Dot peut être utilisée pour dépister simultanément différents aPL. Une étude a évalué l'intérêt de l'immuno-Dot dans la détection de multiples aPL IgG et IgM. Les auteurs n'ont pas trouvé de différence significative entre les techniques ELISA et d'Immuno-Dot en ce qui concerne le diagnostic biologique du SAPL [45]. Ces nouveaux tests en phase solide devraient fournir les mêmes propriétés que les techniques ELISA en ce qui concerne les changements conformationnels du cofacteur [35].

Chromatographie en couche mince

La chromatographie en couche mince est une technique non quantitative utilisée pour la détection des aPL. Cette méthode a été employée pour la première fois en 1994 [46]. Cette technique semble moins sensible mais plus spécifique dans la détection des aPL [46]. Elle a été utilisée par Conti et al. pour la détection des aPL dans un groupe de 36 patients présentant des caractéristiques cliniques de SAPL « séronégatif ». Des aPL ont été retrouvés chez 58.3% des patients (ACL : 47.2%, anticorps dirigés contre l'acide lyso(bis) phosphatidique : 41.7%, anticorps anti-phosphatidyléthanolamine : 30.5%) [47]. Les auteurs ont aussi montré dans cette étude que l'incubation de cellules endothéliales d'origine humaine avec les IgG provenant du sérum de 3 patients avec SAPL « séronégatif » induisait une phosphorylation d'IRAK, une activation de NF- κ B, l'expression à la surface cellulaire de VCAM-1 et la production de facteur tissulaire [47]. Actuellement, cette technique ne semble pas appropriée pour le diagnostic biologique de SAPL mais peut représenter une aide au diagnostic biologique chez des patients avec des signes cliniques de SAPL en l'absence persistante d'aPL conventionnels [48].

Anticorps antiphospholipides non conventionnels

Les aPL représentent une famille hétérogène d'anticorps reconnaissant des phospholipides variés, des protéines plasmatiques associées aux phospholipides appelées cofacteurs ou encore des complexes phospholipides/protéine. Cependant, au cours des dernières années, des anticorps contre de nouvelles cibles antigéniques ont été détectés au cours du SAPL, en présence ou en l'absence d'aPL classiques, représentant une mosaïque du SAPL [49]. La présence de ces anticorps non conventionnels a aussi été rapportée au cours du SAPL « séronégatif ».

Anticorps dirigés contre le domaine I de la β 2 glycoprotéine I

La β 2 glycoprotéine I (β 2GPI) est une glycoprotéine de 50 kD présente dans le plasma à la concentration approximative de 200 μ g/mL et représente la principale cible antigénique des aPL. Elle est composée de 5 domaines homologues. Elle se lie par l'intermédiaire de son 5^{ème} domaine aux phospholipides anioniques tels que la phosphatidylsérine ou la cardiolipine [35]. Dans la circulation sanguine, elle présente une conformation circulaire due à l'interaction entre le domaine I et le domaine V [50]. Suite à la liaison aux phospholipides,

la β 2GPI change de conformation et expose un épitope cryptique (conformation ouverte) auquel les anticorps pathogènes peuvent se lier. Les a β 2GPI sont dirigés contre des épitopes présents sur les 5 domaines de la β 2GPI [51, 52]. L'épitope Glycine40-Arginine43 localisé dans le domaine I représente une cible antigénique importante impliquée dans la liaison β 2GPI/a β 2GPI [51]. Cependant, l'arginine 39 semble représenter un épitope majeur [53]. La liaison des aPL au domaine I de la β 2GPI est complexe et implique aussi le domaine d'interliaison I-II et possiblement l'acide aspartique 8 et l'acide aspartique 9 [53]. Les anticorps anti-domaine I de la β 2GPI sont fortement corrélés avec la présence d'un événement thrombotique et l'activité LA [51]. Dans une étude internationale multicentrique ayant inclus des patients porteurs d'a β 2GPI, les auteurs ont montré que les anticorps dirigés contre le domaine I de la β 2GPI sont fortement associés à la survenue de thrombose [odds ratio (OR) 3.5 (IC 95% : 2.3-5.4)] et dans une moindre mesure aux complications obstétricales [OR 2.4 (IC 95% : 1.4-4.3)] [54]. Les anticorps dirigés contre le domaine I de la β 2GPI sont aussi associés aux complications obstétricales tardives et leurs titres sont statistiquement plus élevés en cas de triple positivité des aPL [55]. En 2014, Agostinis et al. ont montré qu'un anticorps recombinant dirigé contre le domaine I de la β 2GPI induisait une perte fœtale chez des souris gestantes ainsi qu'une thrombose dans la microcirculation mésentérique chez des rats après administration de lipopolysaccharide (LPS) [56]. Par ailleurs le domaine I de la β 2GPI recombinant humain est capable de réduire la taille du thrombus induit par les aPL *in vivo* [57]. La recherche des anticorps anti-domaine I de la β 2GPI n'apporte pas d'aide diagnostique supplémentaire par rapport au panel standard des aPL « classiques » [58, 59]. La prévalence des anticorps anti-domaine I de la β 2GPI détectés par chimiluminescence chez 63 patients avec SAPL « séronégatif » n'était pas significativement différente de celle retrouvée chez 166 sujets « contrôles » parmi lesquels 120 étaient des donneurs de sang (1.6% vs 0.6%, $p = 0.44$) [60]. Dans une autre étude, la prévalence des IgG anti-domaine I de la β 2GPI détectés par ELISA chez 40 patients avec SAPL « séronégatif » était de 7.5% vs 27.5% au cours du SAPL « classique » séropositif [61].

En cas de négativité des a β 2GPI, l'intérêt de la recherche des anticorps anti-domaine I de la β 2GPI semble donc limité dans la mesure où ces anticorps représentent un sous-groupe des a β 2GPI.

Anticorps anti-phosphatidyléthanolamine

La phosphatidyléthanolamine (PE) est un phospholipide neutre (zwitterionique) principalement localisé au niveau du versant interne des membranes plasmiques et constitue 20-50% des phospholipides totaux des biomembranes [62, 63]. La PE agit comme un anticoagulant mais exerce aussi une action procoagulante dans certaines conditions [62, 63]. A l'image de l'hétérogénéité des ACL selon leur dépendance vis-à-vis de la β 2GPI, certains anticorps anti-PE sont indépendants de protéines plasmatiques liant la PE tandis que la positivité d'autres anti-PE dépend de la présence de kininogènes de haut et bas poids moléculaire et aussi de la prothrombine [64]. Les anti-PE d'isotype IgG, sont le plus souvent dirigés contre les kininogènes et/ou les protéines liant les kininogènes de haut poids moléculaire [65]. La PE induit ainsi des changements conformationnels des kininogènes reconnus par les anticorps anti-PE [66]. D'autres anti-PE reconnaissent le facteur XI et la prékallikréine indépendamment ou en association avec les kininogènes de haut poids moléculaire [67].

De nombreuses études ont montré l'association entre la présence des anticorps anti-PE et la morbidité obstétricale ou les événements thrombotiques. Dans une étude rétrospective, Sugi et al. ont montré une plus forte association des anticorps anti-PE avec les fausses couches récurrentes (≥ 2) et précoces [$< 10^{\text{ème}}$ semaine d'aménorrhée (SA)] en comparaison avec les anticorps contre les PL anioniques (anti-phosphatidylsérine, ACL) ou le LA [68]. La fréquence des anticorps anti-PE dans leur cohorte de 139 patientes était de 31.7%. Il est intéressant de noter que la positivité des IgG anti-PE était dépendante pour 90.5% d'entre eux des kininogènes. Les IgG anti-PE dépendant des kininogènes augmentent l'agrégabilité plaquettaire induite par la thrombine [69]. Ces données de prévalence des anticorps anti-PE ont été confirmées par la même équipe au cours d'une autre étude chez 145 patientes avec fausses couches précoces (< 10 SA) récurrentes (≥ 2) (27.6%) mais aussi chez 26 patientes avec fausses couches plus tardives (≥ 10 SA, ≥ 1) (23%) [70]. Dans une large étude cas-contrôle, Gris et al. ont montré que les IgM anti-PE représentaient un facteur de risque indépendant de pertes fœtales précoces inexplicées plus élevé que les IgG anti- β 2GPI, les IgG anti-annexine A5 ou le LA (OR : 6.0 ; IC 95% : 2.3-15.7 ; $p = 0.0003$) [71]. L'immunisation passive d'anticorps anti-PE chez la souris induit des thromboses et des hémorragies placentaires associées à une apoptose placentaire accrue, soulignant

l'importance de la PE dans l'homéostasie placentaire et conférant à ces anticorps un probable rôle pathogène dans certaines complications obstétricales [72].

Plusieurs études ont aussi montré une association entre les anticorps anti-PE et la survenue de thromboses en l'absence d'anomalies de la coagulation. Chez 98 patients ayant présenté une thrombose inexpliquée et en l'absence d'ACL, d' $\alpha\beta$ 2GPI ou de LA, la prévalence des anticorps anti-PE était de 18% et significativement plus élevée que celle retrouvée chez 100 sujets « contrôles » donneurs de sang (4%) ($p=0.001$) [73]. Dans une autre étude multicentrique incluant 270 patients présentant un événement thrombotique majoritairement d'origine veineuse avec ou sans facteurs de risque cliniques ou biologiques de thrombose, la prévalence des anticorps anti-PE chez les patients et les sujets « contrôles » était respectivement de 15% et de 3% ($p<0.0001$) [74]. Il est important de souligner que 63% des patients positifs pour les anticorps anti-PE étaient négatifs pour les aPL « classiques » des critères biologiques du SAPL. De plus, dans une analyse multivariée en sous-groupe cas-témoins portant sur 158 patients avec thrombose veineuse, appariés à 158 sujets sains selon l'âge, le sexe, le traitement hormonal et le tabac, les IgG anti-PE représentaient un facteur de risque indépendant de thrombose veineuse (OR 6.0 ; IC 95% : 1.7-22 ; $p = 0.005$) [74]. Récemment, des auteurs ont observé des taux élevés d'anticorps anti-PE chez 3 enfants ayant présenté un infarctus cérébral en l'absence d'aPL « classiques » [75]. Récemment, dans une étude rétrospective française, les auteurs ont retrouvé la présence d'anticorps anti-PE de façon persistante dans le temps chez 10% de patients suspects de présenter un SAPL « séronégatif » [76].

Ainsi les anticorps anti-PE sont significativement associés aux principales manifestations du SAPL telles que les thromboses et les pertes fœtales en l'absence des critères biologiques du SAPL. La détection de ces anticorps dans le cadre du SAPL « séronégatif » semble donc assez prometteuse.

APL dirigés contre des phospholipides chargés négativement autres que la cardiolipine

Les PL anioniques tels que le phosphatidylinositol (PI), l'acide phosphatidique (PA) ou la phosphatidylsérine (PS) sont présents en proportion variable sur les faces interne et externe de la plupart des cellules [35, 62]. Précédemment, une forte corrélation a été démontrée entre les ACL et les anticorps dirigés contre le PI et la PS [77]. La recherche

d'anticorps dirigés contre le PI, le PA et la PS n'améliore pas la probabilité du diagnostic de SAPL [78]. Dans un groupe de 26 patients lupiques avec manifestations cliniques de SAPL mais en l'absence d'ACL et de LA, seul un patient était positif pour les IgA anti-PE [78]. Des auteurs ont suggéré l'intérêt éventuel de la recherche de ces aPL « non classiques » au cours du SAPL obstétrical « séronégatif ». En effet, des auteurs ont suggéré que la recherche d'aPL autres que le LA ou les ACL (anticorps dirigés contre le PI, le phosphatidylglycérol (PG) et/ou la PE) permettait d'identifier des patientes avec fausses couches à répétition pouvant bénéficier d'un traitement [79]. Dans une étude incluant 866 patientes avec fausses couches répétées, 10.1% des patientes négatives pour les ACL étaient positives pour un anticorps dirigé contre d'autres PL (PI, PG, PE, PS) [80]. *In vitro*, un anticorps monoclonal dirigé contre la PS peut inhiber le développement et l'invasion trophoblastique [81]. Cependant, une étude testant le sérum de patientes vis-à-vis d'un panel de PL (PA, PE, PS, phosphatidylcholine (PC) et PI) montre que la recherche d'anticorps contre les PL autres que les ACL ou le LA ne revêt d'aucune utilité clinique dans l'évaluation des patientes avec fausses couches à répétition [82]. Ces données ont été confirmées dans une autre étude plus récente [83].

Anticorps anti-prothrombine : aPT et aPS/PT

La prothrombine (PT) est une glycoprotéine plasmatique convertie en thrombine en présence de la thromboplastine extrinsèque et d'ions calcium durant la seconde étape de la coagulation sanguine [35, 62, 84]. La PT a été décrite comme un cofacteur de l'anticoagulant circulant par Loeliger en 1959 [85]. Fleck et al. ont montré que les anticorps anti-PT (aPT) étaient présents chez 74% (31/42) des patients positifs pour un anticoagulant circulant [86]. Il est important aussi de noter que 3 des 31 patients positifs n'avaient pas de PT plasmatique mesurable. La présence d'aPT peut induire un syndrome « lupus anticoagulant-hypoprothrombinémie ». Ce syndrome a été décrit pour la première fois en 1960 par Rapaport et al. [87]. Ce syndrome est une entité distincte au cours de laquelle la présence d'aPT chez les patients porteurs aussi d'un LA conduit à un déficit acquis en facteur II [88]. Les manifestations principales de ce syndrome sont hémorragiques mais des formes thrombotiques ont été rapportées chez 10% des patients [88]. La prévalence des IgG aPT chez les patients avec LA est plus faible en comparaison avec celle des IgG aβ2GPI sans signification clinique particulière [89]. Les aPT représentent un groupe hétérogène

d'anticorps [90]. Les aPT peuvent être détectées par une technique ELISA soit en utilisant des plaques irradiées recouvertes de PT soit en utilisant le complexe PS/PT comme antigène en présence de calcium [90]. En effet, la PT présente des changements conformationnels suite à la liaison aux surfaces contenant la PS en présence d'ions Ca⁺⁺ [91]. Les aPT et les anticorps dirigés contre le complexe PS/PT (aPS/PT) représentent 2 populations distinctes d'auto-anticorps mais peuvent coexister chez un même patient [90, 92].

Plusieurs études ont rapporté la présence des anticorps dirigés contre la prothrombine chez des patients porteurs d'aPL avec une fréquence variable (50-90%) selon la technique utilisée [93]. Une revue récente de la littérature montre que les aPS/PT représentent un facteur de risque de thrombose artérielle et/ou veineuse plus élevé que les aPT [92].

Seules quelques études ont rapporté la fréquence des aPT au cours d'une situation clinique de maladie thrombo-embolique veineuse (MTEV) et en l'absence de LES ou de SAPL. Dans une étude cas-contrôle (n = 265 dans chaque groupe), Palosuo et al. ont montré que les taux élevés d'aPT sont associés à la survenue d'une thrombose veineuse profonde des membres inférieurs ou d'une embolie pulmonaire chez des hommes d'âge moyen (OR 6.56 ; IC 95% : 1.73-25.0) [94]. Dans une étude française incluant 398 patients avec suspicion de maladie thrombo-embolique veineuse (MTEV) dont 61% présentaient une MTEV, les auteurs ont observé que la fréquence des aPT était significativement plus élevée chez les patients avec MTEV dans un sous-groupe sans facteur de risque de thrombose veineuse (p=0.04) [95]. Enfin Ishikura et al. ont aussi observé une prévalence élevée des IgG aPT (29.1%) chez les patients avec thrombose veineuse profonde [96]. Les anticorps dirigés contre la PT pourraient représenter aussi un facteur de risque de récurrence d'épisodes thromboemboliques veineux [97]. Cependant, les études portant sur la signification clinique des anticorps anti-prothrombine au cours de la MTEV ont montré des résultats controversés. Bardin et al. ont étudié rétrospectivement la prévalence des aPT et aPS/PT chez des patients avec une histoire de thrombose idiopathique sans aPL et sans anomalies héréditaires de la coagulation [90]. La prévalence des anticorps anti-prothrombine chez les patients (10%) n'était pas significativement différente de celle des sujets « contrôles » (5%) quelle que soit la technique ELISA utilisée pour leur détection. Dans une autre étude portant sur 79 patients

avec thrombose artérielle et/ou veineuse sans LA, ACL et LES, les aPT ne représentaient pas un facteur de risque de thrombose [98].

Peu d'études ont concerné la signification clinique des anticorps anti-prothrombine au cours des thromboses artérielles. Dans une étude prospective incluant des hommes d'âge moyen, Vaarala et al. ont montré que les taux d'aPT (exprimés en densités optiques) étaient significativement plus élevés chez les patients présentant un infarctus du myocarde ou une mort cardiaque en comparaison avec les sujets « contrôles » ($p < 0.002$). Les taux élevés d'aPT (tertile supérieur de la distribution) sont associés à un risque plus élevé d'infarctus du myocarde ou de mort cardiaque (risque $\times 2.5$) (IC 95% : 1.2-5.3) [99]. Dans une autre étude, la prévalence des IgG aPS/PT au cours de l'infarctus cérébral était de 7.5% et 2 parmi les 7 patients de l'étude positifs pour les IgG aPS/PT étaient négatifs pour le LA et les ACL dépendant de la $\beta 2$ GPI [100]. Enfin, dans une étude roumaine incluant 46 jeunes patientes (35-45 ans) ayant présenté un AVC ischémique, les aPT étaient présents chez 11 patientes en l'absence d'aPL « classiques » [101].

Les aPT ont aussi été étudiés au cours de la morbidité obstétricale. Sabatini et al. ont observé chez des femmes gestantes, avec un antécédent de fausses couches répétées (< 20 SA), des concentrations moyennes d'aPT (IgG et IgM) significativement plus élevées en comparaison avec des femmes sans aucun passé de morbidité obstétricale [102]. La prévalence des aPT est aussi plus élevée chez les femmes négatives pour les aPL avec un antécédent de pathologie vasculaire placentaire [103]. Une plus forte association de ces anticorps avec un antécédent de mort fœtale *in utero* a été observée [103]. Une étude récente a montré que les IgG et les IgM aPS/PT sont retrouvées respectivement avec une fréquence de 5.8% et 17.6% dans un groupe de 17 patients avec SAPL « séronégatif » [104]. Dans une étude multicentrique internationale, les auteurs ont évalué la présence des aPS/PT chez des patients présentant un SAPL « clinique » avec et sans critères biologiques, sans SAPL « clinique » (avec et sans maladie systémique auto-immune associée pour les 2 groupes) et des sujets sains. Ils ont trouvé une concordance modérée à substantielle entre 2 kits ELISA de détection des IgG aPS/PT [105]. La présence des IgG aPS/PT était significativement associée à la positivité du LA [105]. Les aPS/PT ne figurent pas dans les critères biologiques du SAPL mais leur recherche est nécessaire à l'évaluation du score GAPSS (« Global Anti-Phospholipid Syndrome Score »). Le score GAPSS est un score clinico-

biologique prédictif du risque de thrombose (lors d'un premier événement thrombotique ou d'une récurrence thrombotique) [106, 107]. Ce score a été validé au cours du SAPL et du LES avec aPL sans événements thrombotiques antérieurs [108, 109]. Il varie de 0 à 20. Enfin, Zuily et al. ont évalué le score GAPSS dans une étude prospective multicentrique incluant des patients avec aPL ou LES. Dans une analyse multivariée, un score supérieur à 16 est significativement prédictif de la survenue d'événements thrombotiques [hazard ratio (HR) = 6.17 (IC 95% : 1.70-22.40)] [110]. La présence d'IgG aPS/PT était significativement associée aux thromboses [110].

Anticorps anti-annexine A5

L'annexine A5 (ANXA5) est une protéine de 36 kD capable de lier avec une haute affinité les phospholipides chargés négativement [111]. Elle possède des propriétés anticoagulantes en interférant avec la liaison des facteurs de coagulation aux membranes procoagulantes [111]. L'ANXA5 est exprimée en abondance dans les cellules endothéliales et les cellules du trophoblaste placentaire. L'ANXA5 joue aussi un rôle important dans l'intégrité placentaire. Une réduction du taux d'ANXA5 a été observée à la surface des cellules endothéliales et des cellules trophoblastiques exposées aux IgG purifiées provenant du plasma de 3 patients avec SAPL sévère [111]. Des IgG anti-ANXA5 sont capables d'induire une apoptose des cellules endothéliales et possèdent aussi une activité « LA » [112]. Les résultats concernant l'association entre la présence d'anticorps anti-ANXA5 et la survenue d'un événement thrombotique au cours du LES sont controversés [113]. Rand et al. ont mis au point un test de coagulation évaluant la résistance à l'ANXA5 [114]. Des données à partir de 3 études montrent que la résistance à l'ANXA5 est présente chez 53.3% des patients avec SAPL [115]. Les IgG aPL réduisent significativement la liaison de l'ANXA5 à la bicouche phospholipidique. Rand et al. ont montré que l'hydroxychloroquine permet de rétablir le bouclier « anticoagulant » de l'ANXA5 [116]. Le rôle possible de l'ANXA5 dans la pathogénèse du SAPL a davantage été souligné par des études décrivant l'association entre la présence d'anticorps anti-ANXA5 et des fausses couches répétées [113]. Cependant, dans une large cohorte de patients avec LES, SAPL primaire ou syndrome lupique, de Laat et al. ont montré l'absence d'association entre la présence des anticorps anti-ANXA5 et un événement thrombotique ou la morbidité obstétricale. Seuls les titres élevés d'anticorps

anti-ANXA5 étaient associés à un risque de fausses couches [117]. L'association entre la présence des anticorps anti-ANXA5 et le risque de fausses couches est aussi controversée dans la population générale [113]. Une large étude incluant 1038 patientes prégnantes en début de grossesse a montré que la présence des anticorps anti-ANXA5 n'est pas prédictive de fausse couche [118]. A l'exclusion du LES ou du SAPL, peu d'études ont concerné le lien éventuel entre la présence d'anticorps anti-ANXA5 et un événement thrombotique. Chez 37 patients avec une maladie cérébrovasculaire thromboembolique, 2 d'entre eux avaient des IgG anti-ANXA5 significativement augmentées [119]. Dans une autre étude coréenne incluant 187 patients dans un contexte d'AVC constitué ou transitoire, les auteurs ont observé une fréquence plus élevée des IgG anti-ANXA5 chez les patients (13.9%) en comparaison avec celle de 66 sujets « contrôles » (4.5%, $p=0.043$). Parmi les 26 patients positifs, seuls 5 étaient aussi positifs pour le LA ou les ACL [120].

Anticorps anti-annexine A2

L'annexine A2 (ANXA2) est une protéine de 36 kD appartenant, comme l'ANXA5, à la famille des annexines, protéines liant les phospholipides chargés négativement en présence de calcium. Elle est fortement exprimée dans le tissu vasculaire et placentaire. Elle existe sous forme de monomère ou de complexe hétérotétramérique comportant 2 sous-unités d'ANXA2 et 2 sous-unités de protéine S100A10 (encore appelée p11) [121]. A la surface de la cellule endothéliale, ce complexe constitue le co-récepteur pour l'activateur tissulaire du plasminogène (tPA) et le plasminogène. Ainsi, l'ANXA2 joue un rôle important dans la fibrinolyse *in vitro* mais aussi *in vivo* [121]. Différentes études ont montré l'implication de l'ANXA2 dans la physiopathologie du SAPL. L'ANXA2 a été identifiée comme une protéine liant la β 2GPI à la surface des cellules endothéliales et elle participe à l'activation des cellules endothéliales et des monocytes, induite par les $a\beta$ 2GPI en présence de β 2GPI [122]. L'équipe de Pierangeli a mis en évidence l'implication de l'ANXA2 dans les effets thrombogènes *in vivo* induits par les aPL [123]. L'ANXA2 a aussi été identifiée comme un nouvel auto-antigène au cours du SAPL. Selon les études, la prévalence des IgG anti-ANXA2 au cours du SAPL varie de 11,3 à 21.8% [124-126]. Il a été observé une corrélation inverse entre les anticorps anti-ANXA2 et les aPL (ACL et $a\beta$ 2GPI) [125]. La nature des épitopes immunodominants de l'ANXA2 reste inconnue [127]. Des IgG anti-ANXA2 induisent une activation endothéliale et bloquent la génération de plasmine dépendante du tPA à la surface de la cellule endothéliale

[124]. Des anticorps anti-ANXA2 ont aussi été détectés chez des patientes ayant présenté une morbidité obstétricale avec une prévalence de 15.2%, indépendamment des aPL et des anticorps anti-ANXA5 [128]. Dans un groupe de 36 patientes avec SAPL « séronégatif », les IgG anti-ANXA2 ont été détectées chez 16.7% d'entre eux [47]. La protéine S100A10, partenaire de l'ANXA2, avec laquelle elle forme un hétérocomplexe, appartient à la famille des protéines S100, petites protéines dimériques de bas poids moléculaire (10-12 kD) liant le calcium. La protéine S100A10 joue aussi un rôle important dans la régulation de la fibrinolyse [129]. Elle a été identifiée récemment comme une nouvelle cible antigénique au cours du SAPL [130]. La prévalence des anticorps anti-S100A10 au cours du SAPL était significativement plus élevée (11.9%) comparativement à celle retrouvée chez les sujets sains (1.7%) [130]. Cependant, l'intérêt de la recherche des anticorps anti-ANXA2 et anti-S100A10 au cours du SAPL « séronégatif » reste à évaluer.

Anticorps anti-vimentine/cardioline

La vimentine est une protéine des filaments intermédiaires de type III du cytosquelette dont l'expression est ubiquitaire [35, 131]. Par une approche protéomique en analysant des protéines membranaires de la surface cellulaire endothéliale, la vimentine a été identifiée comme un auto-antigène cible au cours du SAPL [132]. La vimentine et la cardioline pourraient interagir à la surface des cellules apoptotiques pour former une particule immunogénique [133]. La liaison de la vimentine à la cardioline est la résultante d'une interaction électrostatique entre les acides aminés de la vimentine chargés positivement et la cardioline chargée négativement [35]. Des IgG dirigées contre le complexe vimentine/CL ont été détectées chez 92.5 et 55.2% des patients respectivement avec SAPL « classique » (n = 40) et SAPL « séronégatif » (n = 29). Aucun anticorps n'a été détecté chez les sujets sains (n = 32) [132]. Une autre étude menée par Conti et al. a révélé la positivité de ces anticorps d'isotype IgG chez 48.8% des patients avec SAPL « séronégatif » (n = 24) [49]. Ainsi la recherche de ces anticorps pourrait représenter un outil diagnostique utile en cas de SAPL « séronégatif ». Les IgG anti-vimentine/CL induisent une phosphorylation d'IRAK-1 et une activation de NF- κ B dans les cellules endothéliales [132]. Des anticorps anti-vimentine/CL ont aussi été détectés au cours du LES et de la polyarthrite rhumatoïde. Des anticorps anti-vimentine citrullinée ont aussi été détectés chez 26.6% des

patients avec SAPL et il existe une corrélation statistiquement significative entre les titres des anticorps anti-vimentine citrullinée et ceux des anticorps anti-vimentine/CL [134].

APL d'isotype IgA

Le rôle des aPL d'isotype IgA comme marqueurs diagnostiques de SAPL est encore sujet à débat [34]. Des études ont mis en évidence une association positive entre les aPL d'isotype IgA et les caractéristiques cliniques du SAPL tandis que d'autres études n'ont pas réussi à prouver l'utilité de rajouter un test aPL IgA, compte tenu de leur faible prévalence et de leur association avec les autres aPL dans la plupart des cas. Il s'agit pour la plupart d'entre elles d'études rétrospectives. Différents facteurs participent à la disparité des résultats de ces différentes études tels que le type d'étude, les essais non standardisés utilisés pour la détection des IgA aPL (ELISA « maison », kits commerciaux), le cut-off choisi pour définir le seuil de positivité ou encore l'hétérogénéité des populations étudiées [135, 136]. Une large étude de 2013 a évalué la fréquence des IgA aPL dans les prélèvements de 5892 patients provenant de 3 cohortes (2 cohortes de patients lupiques, LUMINA et John Hopkins, et la cohorte du laboratoire de référence du SAPL) [137]. Les auteurs ont montré que 54% des IgA a β 2GPI réagissaient avec le domaine IV/V de la β 2GPI. Des IgA a β 2GPI isolées sont détectées chez 57 patients et sont associées à un risque augmenté de thrombose et plus particulièrement de thrombose artérielle. La pathogénicité des IgA a β 2GPI a été démontrée dans un modèle murin avec augmentation de la taille du thrombus et de l'expression du facteur tissulaire [137]. Dans une étude de 2016 incluant 211 patients dont 61 avec SAPL, 140 avec différentes pathologies (LES, autres connectivites, hépatite virale chronique, thrombose non auto-immune) et 10 sujets sains, les auteurs ont montré une corrélation entre la positivité des IgA aPL détectées par une technique de chimiluminescence et la présence d'au moins deux aPL conventionnels [138]. D'autres auteurs ont retrouvé une association des IgA anti- β 2GPI avec des fausses couches récurrentes inexplicées [139, 140]. Des études ont aussi souligné le lien entre la maladie athérosclérotique (AVC, infarctus du myocarde, artériopathie oblitérante des membres inférieurs) et la présence d'IgA a β 2GPI seules en l'absence d'autres aPL [135]. Peu d'études ont concerné le SAPL « séronégatif » et les résultats sont aussi discordants. Dans une cohorte de 40 patients avec SAPL « séronégatif », les IgA ACL et IgA anti-domaine I de la β 2GPI n'ont pas été détectées et les IgA a β 2GPI sont retrouvées uniquement chez 2.5% des patients [61]. A l'inverse, une autre

étude a montré que les IgA a β 2GPI isolées étaient présentes chez 22% des patients (n = 156) présentant des caractéristiques cliniques de SAPL [141]. Enfin des porteurs asymptomatiques d'IgA a β 2GPI sont à haut risque de survenue d'événements thromboemboliques indépendamment d'autres facteurs de risque cardiovasculaire connus [142]. La recherche d'IgA ACL et d'IgA a β 2GPI ne pourrait être restreinte qu'aux patients avec une forte suspicion de SAPL avec les tests de détection d'aPL « conventionnels » négatifs [143].

En dépit de l'utilisation depuis plusieurs décennies des tests conventionnels pour la détection des aPL, la standardisation des ACL et la détermination exacte du LA demeurent une préoccupation constante [144]. Même si ces tests sont performants, ils ne permettent pas de dépister certains patients ayant un phénotype clinique typique de SAPL. L'identification de ce sous-groupe de patients a conduit au concept de SAPL « séronégatif ». Au cours de ces dernières années, différents auto-anticorps autres que les aPL « classiques » ont été identifiés au cours du SAPL et pourraient jouer un rôle important dans sa pathogénèse. Ces aPL non conventionnels représentent une grande variété d'anticorps dirigés contre des phospholipides chargés négativement autres que la cardiolipine, des protéines liant les phospholipides et des complexes PL/protéine.

Différents groupes ont évalué l'intérêt de la recherche des aPL non conventionnels chez des patients suspects de SAPL « séronégatif » [49, 61, 104]. Des auteurs au cours d'une étude récente ont utilisé un panel de 11 tests afin de dépister divers aPL non conventionnels dans une série de 175 patients provenant de l'unité « Lupus » du « St Thomas's hospital » de Londres. Parmi ces patients, 68 présentaient des caractéristiques de SAPL « séronégatif » dont un tiers (36,8%) étaient positifs pour au moins un aPL non conventionnel [144]. Les aPS/PT représentaient le biomarqueur le plus sensible dans le groupe de patients avec SAPL « séronégatif ». Une conférence d'experts durant le 13^{ème} congrès international sur les aPL en 2010 (« Task Force Report on non-criteria aPL tests ») recommandait de tester les IgA ACL et les IgA a β 2GPI chez les patients négatifs pour les tests conventionnels avec forte suspicion de SAPL et considérait les aPS/PT comme des marqueurs diagnostiques potentiels du SAPL [143]. La présence des aPS/PT est étroitement associée à celle du LA. Ainsi, la recherche des aPS/PT pourrait représenter un intérêt quand la détection du LA n'est pas possible dans le

cadre d'une interférence avec des traitements anticoagulants (héparine de bas poids moléculaire, héparine non fractionnée, anticoagulants oraux directs (AOD)). Cependant, chez les patients sous AOD, il existe actuellement de nouvelles méthodes permettant de pallier les interférences analytiques de la recherche de LA (DOAC-Stop™, DOAC-Remove™). [145-147]. Une autre stratégie est l'utilisation d'inhibiteur spécifique des AOD. L'idarucizumab (fragment d'anticorps humanisé (Fab) dirigé contre le dabigatran) est efficace dans la neutralisation du dabigatran dans les prélèvements plasmatiques citratés [146].

Deux études ont évalué la prévalence d'aPL non conventionnels chez des patientes présentant seulement un SAPL obstétrical « séronégatif ». En 2016, une étude a montré que 68% des patientes présentant des critères cliniques de SAPL obstétrical « séronégatif » étaient positives pour des aPL non conventionnels [148]. En 2018, l'utilisation de nouveaux antigènes cibles et de nouvelles approches méthodologiques dans une cohorte de 61 patientes suspectes de présenter un SAPL obstétrical « séronégatif », 81.9% d'entre elles étaient positives avec au moins un test non conventionnel utilisé [149]. L'intérêt de cette étude est représenté par le suivi de 35 patientes parmi lesquelles 26 confirment leur positivité lors d'un deuxième test.

Conclusion

Alors que le concept de SAPL « séronégatif » reste encore l'objet de débat et qu'il n'existe actuellement aucun consensus quant à l'identification de cette entité en marge du SAPL, il y a une reconnaissance croissante dans la communauté d'experts du SAPL de l'existence de ce sous-groupe [17, 18, 34, 49, 150]. Les performances diagnostiques des nouveaux tests permettant la détection des aPL non conventionnels restent encore incertaines, souffrant d'un manque de standardisation. Des efforts entre les laboratoires vers une standardisation de ces nouveaux tests ainsi que des études longitudinales sur de larges cohortes de patients seront nécessaires. Chez les patients avec suspicion de SAPL « séronégatif », nous pourrions proposer la démarche diagnostique suivante :

- recherche de facteurs prothrombotiques acquis ou génétiques
- recherche de situations pouvant négativer ou obérer la recherche des aPL avec répétition des tests aPL « classiques » à 3 et 6 mois en cas de « séronégativité » transitoire

Après exclusion de ces 2 situations précédentes, nous proposons la recherche des ACL et a β 2GPI d'isotype IgA et des aPL non conventionnels de spécificités antigéniques variées tels que les aPE, aPS/PT, anti-vimentine/CL, anti-annexine A5 et anti-annexine A2. Ainsi, l'utilisation de ces nouveaux biomarqueurs et la validation d'algorithmes diagnostiques représenteront une aide diagnostique chez les patients avec forte suspicion de SAPL en l'absence des marqueurs conventionnels, permettant de mieux définir leur prise en charge thérapeutique et leur suivi.

Tableau 1

Critères de classification du SAPL (1)

Critères cliniques

1. Thrombose vasculaire :

- au moins un épisode de thrombose veineuse ou artérielle ou des petits vaisseaux dans n'importe quel tissu ou organe. La thrombose doit être confirmée par une méthode objective validée d'imagerie ou à l'examen histologique. En cas de confirmation histologique, la thrombose doit être présente sans signe inflammatoire de la paroi vasculaire

2. Morbidité gravidique

- Survenue d'au moins une mort fœtale après la 10^{ème} semaine d'aménorrhée, le fœtus étant morphologiquement normal sur les données échographiques ou de l'examen macroscopique
- Survenue d'au moins une naissance prématurée d'un nouveau-né morphologiquement normal avant la 34^{ème} semaine d'aménorrhée suite à une éclampsie, une pré-éclampsie sévère ou une insuffisance placentaire documentée
- Survenue d'au moins 3 fausses couches spontanées consécutives avant la 10^{ème} semaine d'aménorrhée après exclusion de toutes les causes anatomiques ou hormonales maternelles et de toutes les causes chromosomiques d'origine parentale

Critères biologiques

1. Présence d'un lupus anticoagulant dans le plasma à au moins 2 déterminations espacées d'au moins 12 semaines, dépisté selon les recommandations de l'ISTH (26)
2. Présence d'anticorps anticardioplipine de type IgG et/ou IgM, dans le sérum ou le plasma à un taux intermédiaire ou élevé (> 40 unités GPL ou MPL, ou > 99^{ème} percentile) à deux occasions espacées d'au moins de 12 semaines, utilisant une méthode ELISA standardisée
3. Présence d'anticorps anti-β2GPI IgG ou IgM dans le sérum ou le plasma (taux > 99^{ème} percentile) à deux occasions espacées d'au moins 12 semaines utilisant une méthode ELISA standardisée

Le SAPL est défini par la présence d'au moins un signe clinique et un critère biologique (le diagnostic ne peut être retenu s'il y a moins de 12 semaines ou plus de 5 ans entre les manifestations cliniques et la positivité des antiphospholipides). ISTH : International Society on Thrombosis and Haemostasis ; UGPL : unit G phospholipid ; UMPL : unit M phospholipid.

Tableau 2

Principaux anticorps antiphospholipides (non critères diagnostiques) au cours de l'exploration du SAPL « séronégatif »

Anticorps anti-domaine I de la β 2 GPI

Anticorps anti-phosphatidyléthanolamine

Anticorps dirigés contre des phospholipides chargés négativement autres que la cardiolipine : PA, PS et PI

Anticorps anti-prothrombine : anti-PT et anti-PS/PT

Anticorps anti-annexine A5

Anticorps anti-annexine A2

Anticorps anticardiolipine d'isotype IgA et anticorps anti- β 2 GPI d'isotype IgA

PA : acide phosphatidique ; PS : phosphatidylsérine ; PI : phosphatidylinositol ; PT : prothrombine

Déclaration d'intérêts

Les auteurs déclarent ne pas avoir de conflits d'intérêts en relation avec cet article.

Références

1. Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T, Branch DW, Brey RL, Cervera R et al. International consensus statement on an update of the classification criteria for antiphospholipid syndrome (APS). *J Thromb Haemost.* 2006;4:295-306.
2. Asherson RA. A "primary" antiphospholipid syndrome? *J Rheumatol.* 1988;15:1742-6.
3. Font J, Cervera R. Primary antiphospholipid syndrome: a new entity?. *Med Clin (Barc).* 1988;91:736-8.
4. Sabbaga J, Neto JF, Chaddad R, Ceconello I, De Oliveira RM. A "primary" thrombotic syndrome: absence of anti-phospholipid antibodies. *Clin Rheumatol.* 1991;10:81-3.
5. Joseph J, Scopelitis E. Seronegative antiphospholipid syndrome associated with plasminogen activator inhibitor. *Lupus.* 1994;3:201-3.
6. McCarty GA. Seronegative antiphospholipid syndrome (SNAPS) in 53 patients : seroconversion rate at 3.5 years [Abstract]. *J Autoimmun.* 2000 ;15:OC35.
7. Hughes GR, Khamashta MA. Seronegative antiphospholipid syndrome. *Ann Rheum Dis.* 2003;62:1127.
8. Ruan Y, Bridges JS, Kumar K, Raphael JA, Acharjee S, Welty FK. Complete resolution of a mitral valve vegetation with anticoagulation in seronegative antiphospholipid syndrome. *Clin Rheumatol.* 2008;27:1577-9.
9. Akilesh S, Jendrisak M, Zhang L, Lewis JS Jr, Liapis H. Acute renal allograft thrombosis in 'seronegative' antiphospholipid syndrome. *NDT Plus.* 2009;2:181-2.
10. Sopeña B, Pérez-Rodríguez MT, Rivera A, Ortiz-Rey JA, Lamas J, Freire-Dapena MC. Livedoid vasculopathy and recurrent thrombosis in a patient with lupus: seronegative antiphospholipid syndrome? *Lupus.* 2010;19:1340-3.
11. Asano T, Narazaki H, Kaizu K, Kuwabara K, Fujino O, Itoh Y. Seronegative Antiphospholipid Syndrome with Anti-phosphatidylethanolamine Antibody in a Boy. *J Nippon Med Sch.* 2015;82:117-20.
12. Asherson RA. The catastrophic antiphospholipid syndrome. *J Rheumatol.* 1992;19:508-12. Review.
13. Costedoat-Chalumeau N, Arnaud L, Saadoun D, Chastre J, Leroux G, Cacoub P et al. Le syndrome catastrophique des antiphospholipides. *Rev Med Interne.* 2012;33:194-9.
14. Lazurova I, Macejova Z, Tomkova Z, Remenar F, Boor A, Lazur J et al. Severe limb necrosis: primary thrombotic microangiopathy or "seronegative" catastrophic antiphospholipid syndrome? A diagnostic dilemma. *Clin Rheumatol.* 2007;26:1737-40.
15. Shreders A, Bar M. A case of seronegative catastrophic antiphospholipid antibody syndrome. *Conn Med.* 2013;77:81-3.

16. Losonczy LI, Johnson B, Sidhu J, Li J, Feeney CM. Seronegative catastrophic antiphospholipid syndrome in a young female presenting with a headache. *J Emerg Med.* 2015;48:294-7.
17. Rodriguez-Garcia JL, Bertolaccini ML, Cuadrado MJ, Sanna G, Ateka-Barrutia O, Khamashta MA. Clinical manifestations of antiphospholipid syndrome (APS) with and without antiphospholipid antibodies (the so-called 'seronegative APS'). *Ann Rheum Dis.* 2012;71:242-4.
18. Cervera R, Conti F, Doria A, Iaccarino L, Valesini G. Does seronegative antiphospholipid syndrome really exist? *Autoimmun Rev.* 2012;11:581-4.
19. El Benaye J, Hsaini Y, Zoobo T, Ghfir M, Bourazza A, Sedrati O. [Sneddon's syndrome]. *Presse Med.* 2013;42:138-44.
20. Francès C, Papo T, Wechsler B, Laporte JL, Biousse V, Piette JC. Sneddon syndrome with or without antiphospholipid antibodies. A comparative study in 46 patients. *Medicine (Baltimore).* 1999;78:209-19.
21. Duval A, Darnige L, Glowacki F, Copin MC, Martin De Lassalle E, Delaporte E et al. Livedo, dementia, thrombocytopenia, and endotheliitis without antiphospholipid antibodies: seronegative antiphospholipid-like syndrome. *J Am Acad Dermatol.* 2009;61:1076-8.
22. Pérez-Vázquez ME, Cabiedes J, Cabral AR, Alarcón-Segovia D. Decrease in serum antiphospholipid antibody levels upon development of nephrotic syndrome in patients with systemic lupus erythematosus: relationship to urinary loss of IgG and other factors. *Am J Med.* 1992;92:357-62.
23. Silveira LH, Jara LJ, Espinoza LR. Transient disappearance of serum antiphospholipid antibodies can also be due to prednisone therapy. *Clin Exp Rheumatol.* 1996;14:217-9.
24. Drenkard C, Sánchez-Guerrero J, Alarcón-Segovia D. Fall in antiphospholipid antibody at time of thromboocclusive episodes in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol.* 1989;16:614-7.
25. Miret C, Cervera R, Reverter JC, García-Carrasco M, Ramos M, Mollà M et al. Antiphospholipid syndrome without antiphospholipid antibodies at the time of the thrombotic event: transient 'seronegative' antiphospholipid syndrome? *Clin Exp Rheumatol.* 1997;15:541-4.
26. Pengo V, Tripodi A, Reber G, Rand JH, Ortel TL, Galli M et al; Subcommittee on Lupus Anticoagulant/Antiphospholipid Antibody of the Scientific and Standardisation Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. Update of the guidelines for lupus anticoagulant detection. Subcommittee on Lupus Anticoagulant/Antiphospholipid Antibody of the Scientific and Standardisation Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. *J Thromb Haemost.* 2009;7:1737-40.

27. Keeling D, Mackie I, Moore GW, Greer IA, Greaves M; British Committee for Standards in Haematology. Guidelines on the investigation and management of antiphospholipid syndrome. *Br J Haematol*. 2012;157:47-58.
28. CSLI, Laboratory Testing for the Lupus Anticoagulant ; Approved Guideline. CLSI document H60-A. Wayne, PA : Clinical and Laboratory Standards Institute ; 2014.
29. Joste V, Dragon-Durey MA, Darnige L. Diagnostic biologique du syndrome des antiphospholipides : des critères à la pratique. *Rev Med Interne*. 2018;39:34-41.
30. Rand JH, Wu XX, Quinn AS, Chen PP, Hathcock JJ, Taatjes DJ. Hydroxychloroquine directly reduces the binding of antiphospholipid antibody-beta2-glycoprotein I complexes to phospholipid bilayers. *Blood*. 2008;112:1687-95.
31. Lakos G. Interference in antiphospholipid antibody assays. *Semin Thromb Hemost*. 2012;38:353-9.
32. Lambert M, Fauchais AL, Dubucquoi S, Launay D, Caron C, Prin L et al. Etude de l'influence d'une hypergammaglobulinémie sur le titre des anticorps antiphospholipides. *Rev Med Interne*. 2004;25:111-4.
33. Devreese KM, Pierangeli SS, de Laat B, Tripodi A, Atsumi T, Ortel TL; Subcommittee on Lupus Anticoagulant/Phospholipid/Dependent Antibodies. Testing for antiphospholipid antibodies with solid phase assays: guidance from the SSC of the ISTH. *J Thromb Haemost*. 2014;12:792-5.
34. Sciascia S, Amigo MC, Roccatello D, Khamashta M. Diagnosing antiphospholipid syndrome: 'extra-criteria' manifestations and technical advances. *Nat Rev Rheumatol*. 2017;13:548-560.
35. Misasi R, Capozzi A, Longo A, Recalchi S, Lococo E, Alessandri C et al. "New" antigenic targets and methodological approaches for refining laboratory diagnosis of antiphospholipid syndrome. *J Immunol Res*. 2015;2015:858542.
36. Devreese KM, Poncet A, Lindhoff-Last E, Musial J, de Moerloose P, Fontana P. A multicenter study to assess the reproducibility of antiphospholipid antibody results produced by an automated system. *J Thromb Haemost*. 2017;15:91-95.
37. Van Hoecke F, Persijn L, Decavele AS, Devreese K. Performance of two new, automated chemiluminescence assay panels for anticardiolipin and anti-beta2-glycoprotein I antibodies in the laboratory diagnosis of the antiphospholipid syndrome. *Int J Lab Hematol*. 2012;34:630-40.
38. DE Moerloose P, Reber G, Musial J, Arnout J. Analytical and clinical performance of a new, automated assay panel for the diagnosis of antiphospholipid syndrome. *J Thromb Haemost*. 2010;8:1540-6.
39. Meneghel L, Ruffatti A, Gavasso S, Tonello M, Mattia E, Spiezia L et al. The clinical performance of a chemiluminescent immunoassay in detecting anti-cardiolipin and anti-β2

glycoprotein I antibodies. A comparison with a homemade ELISA method. *Clin Chem Lab Med.* 2015;53:1083-9.

40. Persijn L, Decavele AS, Schouwers S, Devreese K. Evaluation of a new set of automated chemiluminescence assays for anticardiolipin and anti-beta2-glycoprotein I antibodies in the laboratory diagnosis of the antiphospholipid syndrome. *Thromb Res.* 2011;128:565-9.

41. Salma N, Julie L, Boutahar B, Sylvie LN, Eleonore B, Fabien LN et al. Thrombotic risk assessment and analytical performance of the chemiluminescent analyzer IDS-iSYS for the detection of anti-cardiolipin and anti-beta 2 glycoprotein I autoantibodies. *Clin Immunol.* 2018;194:92-99.

42. Zhang S, Wu Z, Li P, Bai Y, Zhang F, Li Y. Evaluation of the Clinical Performance of a Novel Chemiluminescent Immunoassay for Detection of Anticardiolipin and Anti-Beta2-Glycoprotein 1 Antibodies in the Diagnosis of Antiphospholipid Syndrome. *Medicine (Baltimore).* 2015;94:e2059.

43. Janek D, Slavik L, Ulehlova J, Krcova V, Hlusi A, Prochazkova J. Validation of a New Panel of Automated Chemiluminescence Assays for Anticardiolipin Antibodies in the Screening for Antiphospholipid Syndrome. *Clin Lab.* 2016;62:1309-1315.

44. Noubouossie D, Valsamis J, Corazza F, Rozen L, Debaugnies F, Demulder A. An automated chemiluminescence immunoassay may detect mostly relevant IgG anticardiolipin antibodies according to revised Sydney criteria. *Acta Clin Belg.* 2012;67:184-9.

45. Egerer K, Roggenbuck D, Büttner T, Lehmann B, Kohn A, von Landenberg P et al. Single-step autoantibody profiling in antiphospholipid syndrome using a multi-line dot assay. *Arthritis Res Ther.* 2011;13:R118.

46. Sorice M, Griggi T, Circella A, Garofalo T, d'Agostino F, Pittoni V et al. Detection of antiphospholipid antibodies by immunostaining on thin layer chromatography plates. *J Immunol Methods.* 1994;173:49-54.

47. Conti F, Alessandri C, Sorice M, Capozzi A, Longo A, Garofalo T et al. Thin-layer chromatography immunostaining in detecting anti-phospholipid antibodies in seronegative anti-phospholipid syndrome. *Clin Exp Immunol.* 2012;167:429-37.

48. Conti F, Alessandri C, Spinelli FR, Capozzi A, Martinelli F, Recalchi S et al. TLC immunostaining for detection of "antiphospholipid" antibodies. *Methods Mol Biol.* 2014;1134:95-101.

49. Conti F, Capozzi A, Truglia S, Lococo E, Longo A, Misasi R et al. The mosaic of "seronegative" antiphospholipid syndrome. *J Immunol Res.* 2014;2014:389601.

50. de Laat B, van Berkel M, Urbanus RT, Siregar B, de Groot PG, Gebbink MF et al. Immune responses against domain I of $\beta(2)$ -glycoprotein I are driven by conformational changes: domain I of $\beta(2)$ -glycoprotein I harbors a cryptic immunogenic epitope. *Arthritis Rheum.* 2011;63:3960-8.

51. de Laat B, Derksen RH, Urbanus RT, de Groot PG. IgG antibodies that recognize epitope Gly40-Arg43 in domain I of beta 2-glycoprotein I cause LAC, and their presence correlates strongly with thrombosis. *Blood*. 2005;105:1540-5.
52. Andreoli L, Chighizola CB, Nalli C, Gerosa M, Borghi MO, Pregnolato F et al. Clinical characterization of antiphospholipid syndrome by detection of IgG antibodies against β 2 - glycoprotein I domain 1 and domain 4/5: ratio of anti-domain 1 to anti-domain 4/5 as a useful new biomarker for antiphospholipid syndrome. *Arthritis Rheumatol*. 2015;67:2196-204.
53. Ioannou Y, Pericleous C, Giles I, Latchman DS, Isenberg DA, Rahman A. Binding of antiphospholipid antibodies to discontinuous epitopes on domain I of human beta(2)-glycoprotein I: mutation studies including residues R39 to R43. *Arthritis Rheum*. 2007;56:280-90.
54. de Laat B, Pengo V, Pabinger I, Musial J, Voskuyl AE, Bultink IE et al. The association between circulating antibodies against domain I of beta2-glycoprotein I and thrombosis: an international multicenter study. *J Thromb Haemost*. 2009;7:1767-73.
55. Chighizola CB, Pregnolato F, Andreoli L, Bodio C, Cesana L, Comerio C et al. Beyond thrombosis: Anti- β 2GPI domain 1 antibodies identify late pregnancy morbidity in antiphospholipid syndrome. *J Autoimmun*. 2018;90:76-83.
56. Agostinis C, Durigutto P, Sblattero D, Borghi MO, Grossi C, Guida F et al. A non-complement-fixing antibody to β 2 glycoprotein I as a novel therapy for antiphospholipid syndrome. *Blood*. 2014;123:3478-87.
57. Ioannou Y, Romay-Penabad Z, Pericleous C, Giles I, Papalardo E, Vargas G et al. In vivo inhibition of antiphospholipid antibody-induced pathogenicity utilizing the antigenic target peptide domain I of beta2-glycoprotein I: proof of concept. *J Thromb Haemost*. 2009;7:833-42.
58. Iwaniec T, Kaczor MP, Celińska-Löwenhoff M, Polański S, Musiał J. Clinical significance of anti-domain 1 β 2-glycoprotein I antibodies in antiphospholipid syndrome. *Thromb Res*. 2017;153:90-94.
59. De Craemer AS, Musial J, Devreese KM. Role of anti-domain 1- β 2 glycoprotein I antibodies in the diagnosis and risk stratification of antiphospholipid syndrome. *J Thromb Haemost*. 2016;14:1779-87.
60. Meneghel L, Ruffatti A, Gavasso S, Tonello M, Mattia E, Spiezia L et al. Detection of IgG anti-Domain I beta2 Glycoprotein I antibodies by chemiluminescence immunoassay in primary antiphospholipid syndrome. *Clin Chim Acta*. 2015;446:201-5.
61. Cousins L, Pericleous C, Khamashta M, Bertolaccini ML, Ioannou Y, Giles I et al. Antibodies to domain I of β -2-glycoprotein I and IgA antiphospholipid antibodies in patients with 'seronegative' antiphospholipid syndrome. *Ann Rheum Dis*. 2015;74:317-9.

62. Nayfe R, Uthman I, Aoun J, Saad Aldin E, Merashli M, Khamashta MA. Seronegative antiphospholipid syndrome. *Rheumatology (Oxford)*. 2013;52:1358-67.
63. Sanmarco M, Bardin N. The contribution of antiphosphatidylethanolamine antibodies in the diagnosis of the antiphospholipid syndrome. *Lupus*. 2012;21:727-8.
64. McIntyre JA, Wagenknecht DR. Anti-phosphatidylethanolamine (aPE) antibodies: a survey. *J Autoimmun*. 2000;15:185-93. Review.
65. Boffa MC, Berard M, Sugi T, McIntyre JA. Antiphosphatidylethanolamine antibodies as the only antiphospholipid antibodies detected by ELISA. II. Kininogen reactivity. *J Rheumatol*. 1996;23:1375-9.
66. Sugi T, McIntyre JA. Phosphatidylethanolamine induces specific conformational changes in the kininogens recognizable by antiphosphatidylethanolamine antibodies. *Thromb Haemost*. 1996;76:354-60.
67. Sugi T, McIntyre JA. Certain autoantibodies to phosphatidylethanolamine (aPE) recognize factor XI and prekallikrein independently or in addition to the kininogens. *J Autoimmun*. 2001;17:207-14.
68. Sugi T, Katsunuma J, Izumi S, McIntyre JA, Makino T. Prevalence and heterogeneity of antiphosphatidylethanolamine antibodies in patients with recurrent early pregnancy losses. *Fertil Steril*. 1999;71:1060-5.
69. Sugi T, McIntyre JA. Autoantibodies to kininogen-phosphatidylethanolamine complexes augment thrombin-induced platelet aggregation. *Thromb Res*. 1996;84:97-109.
70. Sugi T, Matsubayashi H, Inomo A, Dan L, Makino T. Antiphosphatidylethanolamine antibodies in recurrent early pregnancy loss and mid-to-late pregnancy loss. *J Obstet Gynaecol Res*. 2004;30:326-32.
71. Gris JC, Quéré I, Sanmarco M, Boutiere B, Mercier E, Amiral J et al. Antiphospholipid and antiprotein syndromes in non-thrombotic, non-autoimmune women with unexplained recurrent primary early foetal loss. The Nîmes Obstetricians and Haematologists Study--NOHA. *Thromb Haemost*. 2000;84:228-36.
72. Velayuthaprabhu S, Matsubayashi H, Sugi T, Nakamura M, Ohnishi Y, Ogura T et al. A unique preliminary study on placental apoptosis in mice with passive immunization of antiphosphatidylethanolamine antibodies and anti-factor XII antibodies. *Am J Reprod Immunol*. 2011;66:373-84.
73. Sanmarco M, Alessi MC, Harle JR, Sapin C, Aillaud MF, Gentile S et al. Antibodies to phosphatidylethanolamine as the only antiphospholipid antibodies found in patients with unexplained thromboses. *Thromb Haemost*. 2001;85:800-5.
74. Sanmarco M, Gayet S, Alessi MC, Audrain M, de Maistre E, Gris JC et al. Antiphosphatidylethanolamine antibodies are associated with an increased odds ratio for thrombosis. A multicenter study with the participation of the European Forum on antiphospholipid antibodies. *Thromb Haemost*. 2007;97:949-54.

75. Korematsu S, Yamada H, Miyahara H, Ihara K. Increased levels of anti-phosphatidylcholine and anti-phosphatidylethanolamine antibodies in pediatric patients with cerebral infarction. *Brain Dev.* 2017;39:542-546.
76. Billoir P, Miranda S, Abboud J, Armengol G, Levesque H, Benhamou Y et al. Quelle place pour la recherche des anticorps antiphosphatidyléthanolamine dans la suspicion du syndrome des antiphospholipides séronégatif?. *Rev Med Interne.* 2019;40:351-354.
77. Gharavi AE, Harris EN, Asherson RA, Hughes GR. Anticardiolipin antibodies: isotype distribution and phospholipid specificity. *Ann Rheum Dis.* 1987;46:1-6.
78. Bertolaccini ML, Roch B, Amengual O, Atsumi T, Khamashta MA, Hughes GR. Multiple antiphospholipid tests do not increase the diagnostic yield in antiphospholipid syndrome. *Br J Rheumatol.* 1998;37:1229-32.
79. Franklin RD, Kutteh WH. Antiphospholipid antibodies (APA) and recurrent pregnancy loss: treating a unique APA positive population. *Hum Reprod.* 2002;17:2981-5.
80. Yetman DL, Kutteh WH. Antiphospholipid antibody panels and recurrent pregnancy loss: prevalence of anticardiolipin antibodies compared with other antiphospholipid antibodies. *Fertil Steril.* 1996;66:540-6.
81. Katsuragawa H, Kanzaki H, Inoue T, Hirano T, Mori T, Rote NS. Monoclonal antibody against phosphatidylserine inhibits in vitro human trophoblastic hormone production and invasion. *Biol Reprod.* 1997;56:50-8.
82. Branch DW, Silver R, Pierangeli S, van Leeuwen I, Harris EN. Antiphospholipid antibodies other than lupus anticoagulant and anticardiolipin antibodies in women with recurrent pregnancy loss, fertile controls, and antiphospholipid syndrome. *Obstet Gynecol.* 1997;89:549-55.
83. Tebo AE, Jaskowski TD, Hill HR, Branch DW. Clinical relevance of multiple antibody specificity testing in anti-phospholipid syndrome and recurrent pregnancy loss. *Clin Exp Immunol.* 2008;154:332-8.
84. Alessandri C, Conti F, Pendolino M, Mancini R, Valesini G. New autoantigens in the antiphospholipid syndrome. *Autoimmun Rev.* 2011;10:609-16.
85. Loeliger A. Prothrombin as co-factor of the circulating anticoagulant in systemic lupus erythematosus ? *Thromb Diath Haemorrh.* 1959;3:237-56.
86. Fleck RA, Rapaport SI, Rao LV. Anti-prothrombin antibodies and the lupus anticoagulant. *Blood.* 1988;72:512-9.
87. RAPAPORT SI, AMES SB, DUVALL BJ. A plasma coagulation defect in systemic lupus erythematosus arising from hypoprothrombinemia combined with antiprothrombinase activity. *Blood.* 1960;15:212-27.
88. Pilia RK, Suri D, Jindal AK, Kumar N, Sharma A, Sharma P et al. Lupus anticoagulant hypoprothrombinemia syndrome associated with systemic lupus erythematosus in children:

report of two cases and systematic review of the literature. *Rheumatol Int.* 2018;38:1933-1940.

89. Pengo V, Denas G, Bison E, Banzato A, Jose SP, Gresele P et al; Italian Federation of Thrombosis Centers (FCSA). Prevalence and significance of anti-prothrombin (aPT) antibodies in patients with Lupus Anticoagulant (LA). *Thromb Res.* 2010;126:150-3.

90. Bardin N, Alessi MC, Dignat-George F, Vague IJ, Sampol J, Harlé JR et al. Does the anti-prothrombin antibodies measurement provide additional information in patients with thrombosis? *Immunobiology.* 2007;212:557-65.

91. Wu JR, Lentz BR. Phospholipid-specific conformational changes in human prothrombin upon binding to procoagulant acidic lipid membranes. *Thromb Haemost.* 1994;71:596-604.

92. Sciascia S, Sanna G, Murru V, Roccatello D, Khamashta MA, Bertolaccini ML. Anti-prothrombin (aPT) and anti-phosphatidylserine/prothrombin (aPS/PT) antibodies and the risk of thrombosis in the antiphospholipid syndrome. A systematic review. *Thromb Haemost.* 2014;111:354-64.

93. Galli M, Barbui T. Antiprothrombin antibodies: detection and clinical significance in the antiphospholipid syndrome. *Blood.* 1999;93:2149-57.

94. Palosuo T, Virtamo J, Haukka J, Taylor PR, Aho K, Puurunen M et al. High antibody levels to prothrombin imply a risk of deep venous thrombosis and pulmonary embolism in middle-aged men--a nested case-control study. *Thromb Haemost.* 1997;78:1178-82.

95. Pasquier E, Amiral J, de Saint Martin L, Mottier D. A cross sectional study of antiphospholipid-protein antibodies in patients with venous thromboembolism. *Thromb Haemost.* 2001;86:538-42.

96. Ishikura K, Wada H, Kamikura Y, Hattori K, Fukuzawa T, Yamada N et al. High prevalence of anti-prothrombin antibody in patients with deep vein thrombosis. *Am J Hematol.* 2004;76:338-42.

97. Zanon E, Saggiorato G, Ramon R, Girolami A, Pagnan A, Prandoni P. Anti-prothrombin antibodies as a potential risk factor of recurrent venous thromboembolism. *Thromb Haemost.* 2004;91:255-8.

98. Previtali S, Barbui T, Galli M. Anti-beta2-glycoprotein I and anti-prothrombin antibodies in antiphospholipid-negative patients with thrombosis: a case control study. *Thromb Haemost.* 2002;88:729-32.

99. Vaarala O, Puurunen M, Mänttari M, Manninen V, Aho K, Palosuo T. Antibodies to prothrombin imply a risk of myocardial infarction in middle-aged men. *Thromb Haemost.* 1996;75:456-9.

100. Okuma H, Kitagawa Y, Ishikawa T, Takagi S. Study of phosphatidylserine-dependent anti prothrombin antibody in cerebral infarction. *Intern Med.* 2009;48:1351-5.

101. Cojocaru IM, Cojocaru M, Tănăsescu R, Burcin C, Mitu AC, Iliescu I et al. Detecting anti-prothrombin antibodies in young women with acute ischemic stroke. *Rom J Intern Med.* 2008;46:337-41.
102. Sabatini L, Torricelli M, Scaccia V, Fineschi D, Pescagli M, Gasparri L et al. Increased plasma concentrations of antiprothrombin antibodies in women with recurrent spontaneous abortions. *Clin Chem.* 2007;53:228-32.
103. Marozio L, Curti A, Botta G, Canuto EM, Salton L, Tavella AM et al. Anti-prothrombin antibodies are associated with adverse pregnancy outcome. *Am J Reprod Immunol.* 2011;66:404-9.
104. Litvinova E, Darnige L, Kirilovsky A, Burnel Y, de Luna G, Dragon-Durey MA. Prevalence and Significance of Non-conventional Antiphospholipid Antibodies in Patients With Clinical APS Criteria. *Front Immunol.* 2018;9:2971.
105. Amengual O, Forastiero R, Sugiura-Ogasawara M, Otomo K, Oku K, Favas C et al. Evaluation of phosphatidylserine-dependent antiprothrombin antibody testing for the diagnosis of antiphospholipid syndrome: results of an international multicentre study. *Lupus.* 2017;26:266-276.
106. Schreiber K, Sciascia S, de Groot PG, Devreese K, Jacobsen S, Ruiz-Irastorza G et al. Antiphospholipid syndrome. *Nat Rev Dis Primers.* 2018 J25;4:18005.
107. Sciascia S, Sanna G, Murru V, Roccatello D, Khamashta MA, Bertolaccini ML. GAPSS: the Global Anti-Phospholipid Syndrome Score. *Rheumatology.* 2013;52:1397-403.
108. Sciascia S, Sanna G, Murru V, Roccatello D, Khamashta MA, Bertolaccini ML. The global anti-phospholipid syndrome score in primary APS. *Rheumatology.* 2015;54:134-8.
109. Sciascia S, Cuadrado MJ, Sanna G, Murru V, Roccatello D, Khamashta MA et al. Thrombotic risk assessment in systemic lupus erythematosus: validation of the global antiphospholipid syndrome score in a prospective cohort. *Arthritis Care Res.* 2014;66:1915-20.
110. Zuily S, de Laat B, Mohamed S, Kelchtermans H, Shums Z, Albesa R et al; TAC(I)T investigators. Validity of the global anti-phospholipid syndrome score to predict thrombosis: a prospective multicentre cohort study. *Rheumatology* 2015;54:2071-5.
111. Rand JH, Wu XX, Andree HA, Lockwood CJ, Guller S, Scher J et al. Pregnancy loss in the antiphospholipid-antibody syndrome--a possible thrombogenic mechanism. *N Engl J Med.* 1997;337:154-60.
112. Nakamura N, Kuragaki C, Shidara Y, Yamaji K, Wada Y. Antibody to annexin V has anti-phospholipid and lupus anticoagulant properties. *Am J Hematol.* 1995;49:347-8.
113. Iaccarino L, Ghirardello A, Canova M, Zen M, Bettio S, Nalotto L et al. Anti-annexins autoantibodies: their role as biomarkers of autoimmune diseases. *Autoimmun Rev.* 2011;10:553-8.

114. Rand JH, Wu XX, Lapinski R, van Heerde WL, Reutelingsperger CP, Chen PP et al. Detection of antibody-mediated reduction of annexin A5 anticoagulant activity in plasmas of patients with the antiphospholipid syndrome. *Blood*. 2004;104:2783-90.
115. Rodríguez-García V, Ioannou Y, Fernández-Nebro A, Isenberg DA, Giles IP. Examining the prevalence of non-criteria anti-phospholipid antibodies in patients with anti-phospholipid syndrome: a systematic review. *Rheumatology (Oxford)*. 2015;54:2042-50.
116. Rand JH, Wu XX, Quinn AS, Ashton AW, Chen PP, Hathcock JJ et al. Hydroxychloroquine protects the annexin A5 anticoagulant shield from disruption by antiphospholipid antibodies: evidence for a novel effect for an old antimalarial drug. *Blood*. 2010;115:2292-9.
117. de Laat B, Derksen RH, Mackie IJ, Roest M, Schoormans S, Woodhams BJ et al. Annexin A5 polymorphism (-1C-->T) and the presence of anti-annexin A5 antibodies in the antiphospholipid syndrome. *Ann Rheum Dis*. 2006;65:1468-72.
118. Bizzaro N, Antico A, Musso M, Platzgummer S, Camogliano L, Tozzoli R et al. A prospective study of 1038 pregnancies on the predictive value of anti-annexin V antibodies for fetal loss. *Ann N Y Acad Sci*. 2005;1050:348-56.
119. Gaspersic N, Rot U, Cucnik S, Kveder T, Bozic B, Rozman B. Anti-annexin V antibodies in patients with cerebrovascular disease. *Ann Rheum Dis*. 2003;62:188-9.
120. Lee KO, Kim WJ, Na SJ, Heo JH, Lee KY. Clinical significance of anti-annexin V antibody in acute cerebral ischemia. *J Neurol Sci*. 2011;305:53-6.
121. Flood EC, Hajjar KA. The annexin A2 system and vascular homeostasis. *Vascul Pharmacol*. 2011;54:59-67.
122. Bećarević M. TNF-alpha and annexin A2: inflammation in thrombotic primary antiphospholipid syndrome. *Rheumatol Int*. 2016;36:1649-1656.
123. Romay-Penabad Z, Montiel-Manzano MG, Shilagard T, Papalardo E, Vargas G, Deora AB et al. Annexin A2 is involved in antiphospholipid antibody-mediated pathogenic effects in vitro and in vivo. *Blood*. 2009;114:3074-83.
124. Cesarman-Maus G, Ríos-Luna NP, Deora AB, Huang B, Villa R, Cravioto Mdel C et al. Autoantibodies against the fibrinolytic receptor, annexin 2, in antiphospholipid syndrome. *Blood*. 2006;107:4375-82.
125. Salle V, Mazière JC, Smail A, Cévallos R, Mazière C, Fuentes V et al. Anti-annexin II antibodies in systemic autoimmune diseases and antiphospholipid syndrome. *J Clin Immunol*. 2008;28:291-7.
126. Ao W, Zheng H, Chen XW, Shen Y, Yang CD. Anti-annexin II antibody is associated with thrombosis and/or pregnancy morbidity in antiphospholipid syndrome and systemic lupus erythematosus with thrombosis. *Rheumatol Int*. 2011;31:865-9.

127. Salle V, Mazière JC, Brulé A, Schmidt J, Smail A, Duhaut P et al. Antibodies against the N-terminal domain of annexin A2 in antiphospholipid syndrome. *Eur J Intern Med.* 2012;23:665-8.
128. Salle V, Schmidt J, Smail A, Mazière C, Conte MA, Brulé A et al. Antibodies directed against annexin A2 and obstetric morbidity. *J Reprod Immunol.* 2016;118:50-53.
129. Madureira PA, O'Connell PA, Surette AP, Miller VA, Waisman DM. The biochemistry and regulation of S100A10: a multifunctional plasminogen receptor involved in oncogenesis. *J Biomed Biotechnol.* 2012;2012:353687.
130. Salle V, Sagnier A, Diouf M, Schmidt J, Smail A, Galmiche A et al. Prevalence of anti-S100A10 antibodies in antiphospholipid syndrome patients. *Thromb Res.* 2019;179:15-19.
131. Musaelyan A, Lapin S, Nazarov V, Tkachenko O, Gilburd B, Mazing A et al. Vimentin as antigenic target in autoimmunity: A comprehensive review. *Autoimmun Rev.* 2018;17:926-934.
132. Ortona E, Capozzi A, Colasanti T, Conti F, Alessandri C, Longo A et al. Vimentin/cardioliipin complex as a new antigenic target of the antiphospholipid syndrome. *Blood.* 2010;116:2960-7.
133. Thébault S, Gilbert D, Hubert M, Drouot L, Machour N, Lange C et al. Orderly pattern of development of the autoantibody response in (New Zealand White x BXSB)F1 lupus mice: characterization of target antigens and antigen spreading by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *J Immunol.* 2002;169:4046-53.
134. Alessandri C, Agmon-Levin N, Conti F, Perricone C, Ortona E, Pendolino M et al. Anti-mutated citrullinated vimentin antibodies in antiphospholipid syndrome: diagnostic value and relationship with clinical features. *Immunol Res.* 2017;65:524-531.
135. Meijide H, Sciascia S, Sanna G, Khamashta MA, Bertolaccini ML. The clinical relevance of IgA anticardioliipin and IgA anti- β 2 glycoprotein I antiphospholipid antibodies: a systematic review. *Autoimmun Rev.* 2013;12:421-5.
136. Andreoli L, Fredi M, Nalli C, Piantoni S, Reggia R, Dall'Ara F et al. Clinical significance of IgA anti-cardioliipin and IgA anti- β 2glycoprotein I antibodies. *Curr Rheumatol Rep.* 2013;15:343.
137. Murthy V, Willis R, Romay-Penabad Z, Ruiz-Limón P, Martínez-Martínez LA, Jatwani S et al. Value of isolated IgA anti- β 2 -glycoprotein I positivity in the diagnosis of the antiphospholipid syndrome. *Arthritis Rheum.* 2013;65:3186-93.
138. Oku K, Amengual O, Kato M, Bohgaki T, Horita T, Yasuda S et al. Significance of fully automated tests for the diagnosis of antiphospholipid syndrome. *Thromb Res.* 2016;146:1-6.
139. Lee RM, Branch DW, Silver RM. Immunoglobulin A anti-beta2-glycoprotein antibodies in women who experience unexplained recurrent spontaneous abortion and unexplained fetal death. *Am J Obstet Gynecol.* 2001;185:748-53.

140. Yamada H, Tsutsumi A, Ichikawa K, Kato EH, Koike T, Fujimoto S. IgA-class anti-beta2-glycoprotein I in women with unexplained recurrent spontaneous abortion. *Arthritis Rheum.* 1999;42:2727-8.
141. Ruiz-García R, Serrano M, Martínez-Flores JÁ, Mora S, Morillas L, Martín-Mola MÁ et al. Isolated IgA anti- β 2 glycoprotein I antibodies in patients with clinical criteria for antiphospholipid syndrome. *J Immunol Res.* 2014;2014:704395.
142. Tortosa C, Cabrera-Marante O, Serrano M, Martínez-Flores JA, Pérez D, Lora D et al. Incidence of thromboembolic events in asymptomatic carriers of IgA anti β 2 glycoprotein-I antibodies. *PLoS One.* 2017 Jul 20;12:e0178889.
143. Bertolaccini ML, Amengual O, Atsumi T, Binder WL, de Laat B, Forastiero R et al. 'Non-criteria' aPL tests: report of a task force and preconference workshop at the 13th International Congress on Antiphospholipid Antibodies, Galveston, TX, USA, April 2010. *Lupus.* 2011;20:191-205.
144. Zohoury N, Bertolaccini ML, Rodriguez-Garcia JL, Shums Z, Ateka-Barrutia O, Sorice M et al. Closing the Serological Gap in the Antiphospholipid Syndrome: The Value of "Non-criteria" Antiphospholipid Antibodies. *J Rheumatol.* 2017;44:1597-1602.
145. Favaloro EJ, Gilmore G, Arunachalam S, Mohammed S, Baker R. Neutralising rivaroxaban induced interference in laboratory testing for lupus anticoagulant (LA): A comparative study using DOAC Stop and andexanet alfa. *Thromb Res.* 2019;180:10-19.
146. Exner T, Michalopoulos N, Pearce J, Xavier R, Ahuja M. Simple method for removing DOACs from plasma samples. *Thromb Res.* 2018;163:117-122.
147. Cox-Morton S, MacDonald S, Thomas W. A diagnostic solution for haemostasis laboratories for patients taking direct oral anticoagulants using DOAC-Remove. *Br J Haematol.* 2019;187:377-385.
148. Mekinian A, Bourrienne MC, Carbillon L, Benbara A, Noémie A, Chollet-Martin S et al. Non-conventional antiphospholipid antibodies in patients with clinical obstetrical APS: Prevalence and treatment efficacy in pregnancies. *Semin Arthritis Rheum.* 2016;46:232-237.
149. Truglia S, Capozzi A, Mancuso S, Recalchi S, Spinelli FR, Perricone C et al. A Monocentric Cohort of Obstetric Seronegative Anti-Phospholipid Syndrome. *Front Immunol.* 2018;9:1678.
150. Hughes GRV, Khamashta MA. 'Seronegative antiphospholipid syndrome': an update. *Lupus.* 2019;28:273-274.