

ACADÉMIE D'ORLÉANS-TOURS

UNIVERSITÉ DE TOURS

FACULTE DE PHARMACIE « Philippe MAUPAS »

Année 2021

N° 84

THÈSE D'EXERCICE

pour le

DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Par

Wayne-Corentin LAMBERT, né le 22 Juillet 1993 à Angers (49)

PRÉSENTÉE ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT LE 07 OCTOBRE 2021

Intérêt du FP4 exogène au cours du test de libération de sérotonine radiomarquée (SRA) pour la détection des anticorps de thrombopénie induite par l'héparine (TIH) : évaluation après 3 années d'utilisation au CHRU de Tours

JURY

<u>Président du Jury :</u>	Mme Claire Pouplard, PU-PH, UFR de Pharmacie et CHRU – TOURS
<u>Membres du Jury :</u>	Mme Caroline VAYNE, PHA, UFR de Médecine et CHRU - TOURS M. Yves GRUEL, PU-PH, UFR de Médecine et CHRU – TOURS Mme Anne BAUTERS, PH, CHU - LILLE

ANNEE : 2021 - 2022

Directrice : Pr Véronique MAUPOIL

Directeur Adjoint : M. Hervé MARCHAIS

Assesseurs : Pr Daniel ANTIER, M. Matthieu JUSTE, Pr Karine MAHEO, Mme Audrey OUDIN

ENSEIGNANTS

12 PROFESSEURS D'UNIVERSITÉ

ALLOUCHI	Hassan	CHIMIE PHYSIQUE
BOUDESOCQUE-DELAIE	Leslie	PHARMACOGNOSIE
BRAND	Denys	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE
CHEVALIER	Stéphane	BIOCHIMIE GENERALE & BIOTHERAPIE
CHOURPA	Igor	CHIMIE ANALYTIQUE & HYDROLOGIE
CLASTRE	Marc	BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
DIMIER-POISSON	Isabelle	IMMUNOLOGIE PARASITAIRE
ENGUEHARD-GUEIFFIER	Cécile	CHIMIE THERAPEUTIQUE
MAHEO	Karine	PHYSIOLOGIE
MAUPOIL-DAVID	Veronique	PHARMACOLOGIE
MUNNIER	Émilie	PHARMACIE GALENIQUE
VIAUD-MASSUARD	Marie-Claude	CHIMIE ORGANIQUE

7 PROFESSEURS D'UNIVERSITÉ ET PRATICIENS HOSPITALIERS

ANTIER	Daniel	PHARMACIE CLINIQUE
ARLICOT	Nicolas	BIOPHYSIQUE & BIOINFORMATIQUE
EMOND	Patrick	BIOPHYSIQUE & BIOINFORMATIQUE
GIRAUDAU	Bruno	SANTÉ PUBLIQUE, BIostatistiques & ÉPIDÉMIOLOGIE
LANOTTE	Philippe	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE
POUPLARD	Claire	HEMATOLOGIE
THIBAUT	Gilles	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE

2 PROFESSEURS ÉMERITES

GUILLOTEAU	Denis	BIOPHYSIQUE & MATHÉMATIQUES
BARIN	Francis	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE

37 MAÎTRES DE CONFÉRENCES

ALLARD-VANNIER	Emilie	PHARMACIE GALENIQUE
AUBREY	Nicolas	BIOCHIMIE GENERALE & BIOTHERAPIE
BAKRI	Françoise	HYGIENE SANTE PUBLIQUE & TOXICOLOGIE
BESSON	Pierre	PHYSIOLOGIE
BIRER-WILLIAMS	Caroline	BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
BONNIER	Franck	CHIMIE ANALYTIQUE & HYDROLOGIE
BORDY	Romain	PHARMACOLOGIE
BOUVIN-PLY	Mélanie	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE
BRAIBANT	Martine	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE
BREDELOUX	Pierre	PHARMACOLOGIE
DAVID	Stéphanie	PHARMACIE GALENIQUE
DEBIERRE-GROCKIEGO	Françoise	IMMUNOLOGIE PARASITAIRE
DELAIE	Pierre-Olivier	CHIMIE THERAPEUTIQUE
DENEVAULT	Caroline	CHIMIE THERAPEUTIQUE
DOUZIECH-EYROLLES	Laurence	AFFAIRE REGLEMENTAIRE ET MANAGEMENT DE LA QUALITE
DUMAS	Jean-François	BIOCHIMIE GENERALE ET BIOTHERAPIE
GERMON	Stéphanie	IMMUNOLOGIE PARASITAIRE
GLEVAREC	Gaëlle	BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
HERVE-AUBERT	Katel	CHIMIE ANALYTIQUE & HYDROLOGIE

JUSTE	Matthieu	IMMUNOLOGIE PARASITAIRE
LAJOIE	Laurie	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE
LANOUE	Arnaud	BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
MARC	Jillian	BIOMOLECULES ET BIOTECHNOLOGIES VEGETALES
MARCHAIS	Hervé	PHARMACIE GALENIQUE
MAVEL	Sylvie	CHIMIE THERAPEUTIQUE
OMBETTA-GOKA	Jean-Edouard	CHIMIE ORGANIQUE
LOUDIN	Audrey	BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
POUPET	Cyril	BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
PASQUALIN	Côme	PHARMACOLOGIE
PRIE	Gildas	CHIMIE ORGANIQUE
SOUCE	Martin	CHIMIE ANALYTIQUE & HYDROLOGIE
TAUBER	Clovis	BIOPHYSIQUE & BIOINFORMATIQUE
VELGE-ROUSSEL	Florence	IMMUNOLOGIE PARASITAIRE
VERCOUILLIE	Johnny	BIOPHYSIQUE & BIOINFORMATIQUE
VERGOTE	Jackie	AFFAIRE REGLEMENTAIRE ET MANAGEMENT DE LA QUALITE
VIERRON	Emilie	SANTÉ PUBLIQUE, BIOSTATISTIQUES & ÉPIDÉMIOLOGIE
ZHANG	Bei-Li	PHARMACOLOGIE

2 MAITRES DE CONFÉRENCES ET PRATICIENS HOSPITALIERS

FOUCAULT-FRUCHARD	Laura	PHARMACIE CLINIQUE
RESPAUD	Renaud	CHIMIE ANALYTIQUE & HYDROLOGIE

2 AHU (Assistant Hospitalier Universitaire)

FOUCAULT	Amélie	HEMATOLOGIE
MARLET	Julien	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE

1 ATER (Attaché Temporaire d'Enseignement et de Recherche)

HILALI	Soukaïna	PHARMACOGNOSIE
--------	----------	----------------

1 PRAG

WALTERS-GALOPIN	Susan	ANGLAIS
-----------------	-------	---------

3 CHARGÉS DE RECHERCHE

EPARDAUD	Mathieu	INRAE
MEVELEC	Marie-Noëlle	INRAE
MOIRE	Nathalie	INRAE



SERMENT DE GALIEN

En présence des Maitres de la Faculté, je fais le serment :

D'honorer ceux qui m'ont instruit(e) dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle aux principes qui m'ont été enseignés et d'actualiser mes connaissances ;

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

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers la personne humaine et sa dignité ;

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

De ne dévoiler à personne les secrets qui m'auraient été confiés ou dont j'aurais eu connaissance dans l'exercice de ma profession ;

De faire preuve de loyauté et de solidarité envers mes collègues pharmaciens ;

De coopérer avec les autres professionnels de santé ;

Que les Hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert(e) d'opprobre et méprisé(e) de mes confrères si j'y manque.

Date : 07/10/21

L'étudiant

M Lambert Wayne-Corentin

Le Doyen de la Faculté

Professeur Véronique Maupoil

Remerciement :

En premier lieu, je tiens à exprimer ma reconnaissance à l'ensemble des membres de mon jury, les Pr Claire Pouplard et Yves Gruel ainsi que les Dr Caroline Vayne et Anne Bauters d'être venus évaluer ce travail.

Je tiens à remercier tout particulièrement le Dr Caroline Vayne pour avoir accepté de m'encadrer pour ce travail. Je te remercie pour ta pédagogie et toute la bienveillance dont tu as fait preuve non seulement durant la réalisation de ce travail, mais également durant l'ensemble de mes stages au sein du laboratoire.

Je tiens également à remercier le Pr Claire Pouplard de m'avoir fait l'honneur de présider ce jury de thèse.

Je tiens à remercier le Dr Eve-Anne Guery, pour ta bonne humeur et tous les bons souvenirs laissés depuis le début de mon internat.

Je tiens à remercier Noémie, Nico, Séverine, Sandra et Merveille. A petit bureau grande compagnie, merci pour tous les bons moments et les fous rires partagés.

Je tiens également à remercier l'ensemble des techniciens avec qui j'ai partagé mon quotidien depuis le début de mon internant.

Je te remercie Sophie, pour être toujours présente à mes côtés et m'épauler au quotidien. Aucun mot ne saurait exprimer l'amour que j'ai pour toi.

Je remercie ma famille, pour m'avoir toujours inconditionnellement soutenu et sans qui rien n'aurait été possible.

A tous les Angevins, Pierre, Alexandre, Audrey, Sophie, Olivier, Morgane, Florian, Laure, Timothé, Lucie, Maxime, Clémence, Julien, Loic et Edouard pour tous les moments inoubliables passés avec vous durant les années sur les bancs de faculté et pour tous les moments qu'il reste à venir.

Je vous remercie Coralie, Hugo et Gauvin. Vous avez été mes premières et plus belles rencontre tourangelles.

Je te remercie Joévin et Camille pour toutes ces bonnes soirées passées ensemble.

Je remercie mes co-internes, Nicolas, José, Lisa, Victoria, Emeline, Natacha et Anne-Laurine, pour toutes ces belles rencontres et pour tous les bons moments passés en stage.

Je remercie également tous les autres internes que j'ai eu l'occasion de rencontrer durant mon internat.

A mon Père et à ma Grand-mère

Résumé :

Introduction :

La confirmation du diagnostic de thrombopénie induite par l'héparine (TIH) repose sur la réalisation d'un test fonctionnel pour démontrer la capacité des anticorps anti-facteur plaquettaire 4 (anti-FP4) à activer les plaquettes. Bien que le test de libération de sérotonine radiomarquée (SRA) soit considéré comme le test fonctionnel de référence à l'heure actuelle, notre équipe a récemment suggéré que sa sensibilité pouvait être améliorée par l'ajout de FP4 à 10 µg/mL (SRA-FP4) (Vayne et al. Br J Haematol 2017). Dans cette nouvelle étude, nous avons évalué les performances du SRA-FP4 après 4 années d'utilisation au CHRU de Tours, et nous nous sommes questionnés sur sa place dans la stratégie diagnostique des TIH.

Patients et méthode :

D'avril 2016 à Juin 2020, un SRA classique et un SRA-FP4 ont été réalisés pour tous les échantillons reçus dans le Service d'Hématologie-Hémostase du CHRU de Tours dans le cadre de suspicions de TIH. Au total, les données clinico-biologiques de 248 patients provenant de 20 centres hospitaliers français ont été analysées de façon rétrospective. Le diagnostic de TIH a été posé en fonction des résultats des deux SRA, et grâce à l'avis d'un panel de deux experts en cas de discordance entre les deux tests. Les performances du SRA et du SRA-FP4 en termes de sensibilité et spécificité ont ensuite été comparées.

Résultats :

Pour les 117 patients présentant un SRA classique positif, l'ajout de FP4 a permis de potentialiser l'activation plaquettaire au cours du SRA-FP4 (activation maximale moyenne : 58,4% vs. 77,3%, $P < 0,0001$). Parmi les 130 patients avec un SRA classique négatif, 23 présentaient un SRA-FP4 positif (18%). Selon les experts, le diagnostic de TIH était possible ou probable pour 20 de ces patients, et semblait exclu pour les 3 autres. Ces 3 patients présentaient une probabilité clinique de TIH faible, et deux d'entre eux bénéficiaient d'une assistance circulatoire de type ECMO (extracorporeal membrane oxygenation). Un SRA négatif en absence et en présence de FP4 a été retrouvé chez 106 patients. La sensibilité et la spécificité du SRA-FP4 pour le diagnostic de TIH étaient de 98,56% (IC 95% 97,81-99,32) et 97,27% (IC 95% 96,24-98,30%), respectivement, tandis que celles du SRA classique étaient de 85,61% (IC 95% 83,39-87,84) et 100% (IC 95% 100-100). Les taux d'IgG anti-FP4/H étaient comparables chez les patients avec un SRA classique positif et ceux ayant uniquement un SRA-FP4 positif (DO médiane = 2,45 vs. 2,13, $P = 0,0597$).

Conclusion :

Cette étude confirme l'intérêt pratique du SRA-FP4 pour confirmer le diagnostic des TIH en raison d'une sensibilité nettement supérieure à celle du SRA classique. Bien que son coût plus élevé et sa spécificité légèrement moins bonne questionnent sa place en tant que test fonctionnel de première intention, le SRA-FP4 apparaît extrêmement utile en cas de suspicion de TIH modérée ou forte, associée à un test fonctionnel négatif ou difficile à conclure.

Mots-clés : Héparine, thrombopénie, thrombopénie induite par l'héparine, thrombose, test de libération à la sérotonine radiomarquée, facteur plaquettaire 4.

Abstract :

Introduction:

Confirmation of the diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia (HIT) relies on the performance of a functional assay to demonstrate the ability of anti-platelet factor 4 antibodies (anti-FP4) to activate platelets. Although the serotonin release assay (SRA) is considered the gold standard functional assay at present, our team recently suggested that its sensitivity could be improved by the addition of PF4 at 10 g/mL (SRA-PF4) (Vayne et al. Br J Haematol 2017). In this new study, we evaluated the performance of SRA-PF4 after 4 years of use at the CHRU de Tours and questioned its place in the diagnostic strategy of HIT.

Patients and method:

From April 2016 to June 2020, a classical SRA and an SRA-PF4 were performed for all samples received in the Hematology-Hemostasis Department of the CHRU of Tours in the context of suspected HIT. In total, the clinico-biological data of 248 patients from 20 French hospitals were retrospectively analyzed. The diagnosis of HIT was made on the basis of the results of the two SRA, and with the help of a panel of two experts in case of discrepancy between the two tests. The performance of the SRA and the SRA-PF4 in terms of sensitivity and specificity were then compared.

Results :

For the 117 patients with positive classical SRA, the addition of PF4 potentiated platelet activation during SRA-PF4 (mean maximal activation: 58.4% vs. 77.3%, $P < 0.0001$). Among the 130 patients with negative classical SRA, 23 had positive SRA-PF4 (18%). According to the experts, the diagnosis of HIT was possible or probable for 20 of these patients and appeared to be excluded for the remaining 3. These 3 patients had a low clinical probability of HIT, and two of them were receiving ECMO (extracorporeal membrane oxygenation). A negative SRA in the absence and presence of PF4 was found in 106 patients. The sensitivity and specificity of SRA-PF4 for the diagnosis of HIT were 98.56% (95% CI 97.81-99.32) and 97.27% (95% CI 96.24-98.30%), respectively, while those of conventional RAS were 85.61% (95% CI 83.39-87.84) and 100% (95% CI 100-100). Anti-FP4/H IgG levels were comparable in patients with classical SRA positive and those with only SRA-PF4 positive (median OD = 2.45 vs. 2.13, $P = 0.0597$).

Conclusion:

This study confirms the practical value of the SRA-PF4 for confirming the diagnosis of HIT due to its significantly higher sensitivity than the conventional RAS. Although its higher cost and slightly lower specificity question its place as a first-line functional test, SRA-PF4 appears extremely useful in cases of suspected moderate or severe HIT associated with a negative or inconclusive functional test.

Key words: Heparin, thrombocytopenia, heparin-induced thrombocytopenia, thrombosis, serotonin release assay, platelet factor 4.

Table des matières

Remerciement :	4
Résumé :	6
Abstract :	7
Table des matières.....	8
Liste des Figures.....	9
Listes des Tableaux	10
Liste des Annexes.....	11
Abréviations	12
Première partie : Synthèse sur les thrombopénies induites par l'héparine.....	13
Introduction	14
Physiopathologie	14
Facteurs de risque.....	18
Manifestations cliniques.....	19
Probabilité clinique :	21
Diagnostic biologique	24
Prise en charge thérapeutique.....	30
Seconde partie : Travaux de recherche.....	32
Matériel et méthode :.....	36
Recueil des données et patients étudiés :	36
Diagnostic de TIH :	36
Calcul des performances diagnostiques du SRA et du SRA-FP4 :	37
Résultats	39
Population étudiée :	39
Effets du FP4 à 10 µg/mL sur l'activation plaquettaire au cours du SRA :.....	41
Classification des cas présentant un SRA classique et un SRA-FP4 discordants :	45
Comparaison des titres d'IgG anti-FP4/H selon le profil de positivité des SRA :	48
Calcul des performances du SRA classique et du SRA-FP4 :	49
Discussion	51
Références	56
Annexes	65

Liste des Figures

Figure 1. Représentation du facteur plaquettaire 4 (FP4) et des sites antigéniques impliqués dans la physiopathologie des TIH (11)	15
Figure 2. Physiopathologie des TIH (19)	16
Figure 3. Modèle de l’iceberg d’après Warkentin et al. (34)	18
Figure 4. Profils d’évolution de la numération plaquettaire en post-CEC et conséquences sur le risque de TIH (72)	23
Figure 5. Principe du test de libération de sérotonine radiomarquée (SRA).....	27
Figure 6. Principe des tests fonctionnels disponibles pour le diagnostic des TIH, adapté d’après Tardy et al JCM 2020 (88)	28
Figure 7. L’ajout de FP4 potentialise la libération de sérotonine induite par de faibles concentrations de 5B9 (103)	34
Figure 8. L’ajout de FP4 potentialise la détection d’anticorps activateurs des plaquettes de façon héparine-dépendante chez certains patients avec une suspicion de TIH (103)	35
Figure 9. Diagramme d’inclusion des patients	39
Figure 10. Comparaison de l’activation plaquettaire au cours du SRA classique et du SRA-FP4 chez les patients avec un SRA classique positif	42
Figure 11. Comparaison de l’activation plaquettaire au cours du SRA classique et du SRA-FP4 chez les patients avec un SRA classique négatif mais un SRA-FP4 positif	43
Figure 12. Comparaison de l’activation plaquettaire au cours du SRA classique et du SRA-FP4 chez les patients du groupe SRA classique négatif/SRA-FP4 négatif.....	44
Figure 13 Exemple d’évolution de la numération plaquettaire d’un patient conclu TIH probable (A) et peu probable (B)	46
Figure 14. Comparaison de taux d’IgG dirigés contre le FP4 en fonction des différents groupes	49

Listes des Tableaux

Tableau I. Risque de TIH selon le contexte clinique et le type d'héparine administrée, et impact sur la surveillance de la numération plaquettaire sous héparine et dérivés (64)	20
Tableau II. Score des 4Ts utilisé pour l'évaluation de la probabilité clinique de TIH (adapté d'après Lo et al., Am J Hematol 2007) (71).....	22
Tableau III. Algorithme diagnostique des TIH (77).....	25
Tableau IV. Données démographiques, cliniques et biologiques des 248 patients inclus.....	40
Tableau V. Principales caractéristiques cliniques et biologiques des patients présentant une discordance de résultats entre le SRA et le SRA FP4	48
Tableau VI. Tableau de contingence des résultats obtenus en SRA-FP4 (A) et en SRA classique (B) selon le diagnostic retenu	50

Liste des Annexes

Annexe 1. Vayne C, Guery E-A, Kizlik-Masson C, Rollin J, Bauters A, Gruel Y, et al. Beneficial effect of exogenous platelet factor 4 for detecting pathogenic heparin-induced thrombocytopenia antibodies. Br J Haematol. déc 2017;179(5):811-9.

Annexe 2. Liste des centres inclus après exclusion des patients

Annexe 3. Fiche de renseignements patient n°1

Annexe 4. Fiche de renseignements patient n°2

Annexe 5. Fiche de renseignements patient n°3

Annexe 6. Fiche de renseignements patient n°4

Annexe 7. Fiche de renseignements patient n°5

Annexe 8. Fiche de renseignements patient n°6

Annexe 9. Fiche de renseignements patient n°7

Annexe 10. Fiche de renseignements patient n°8

Annexe 11. Fiche de renseignements patient n°9

Annexe 12. Fiche de renseignements patient n°10

Annexe 13. Fiche de renseignements patient n°11

Annexe 14. Fiche de renseignements patient n°12

Annexe 15. Fiche de renseignements patient n°13

Annexe 16. Fiche de renseignements patient n°14

Annexe 17. Fiche de renseignements patient n°15

Annexe 18. Fiche de renseignements patient n°16

Annexe 19. Fiche de renseignements patient n°17

Annexe 20. Fiche de renseignements patient n°18

Annexe 21. Fiche de renseignements patient n°19

Annexe 22. Fiche de renseignements patient n°20

Annexe 23. Fiche de renseignements patient n°21

Annexe 24. Fiche de renseignements patient n°22

Annexe 25. Fiche de renseignements patient n°23

Abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique

AMM : Autorisation de mise sur le marché

AOD : Anticoagulant oral direct

CEC : Circulation extra-corporelle

CIVD : Coagulation intravasculaire disséminée

ECMO : Extra-Corporeal membrane oxygenation

ELISA : Enzyme-linked immunosorbent assay

FP4 : Facteur plaquettaire 4

FT : Facteur tissulaire

GAGs : Glycosaminoglycanes

H : Héparine

HBPM : Héparine de bas poids moléculaire

HNF : Héparine non fractionnée

Ig : Immunoglobuline

NETs : Neutrophil extracellular traps

NP : Numération plaquettaire

PRP : Plasma riche en plaquettes

PS : Phosphatidylsérine

SRA : Serotonin release assay

TCA : Temps de céphaline avec activateur

TIH : Thrombopénie induite par l'héparine

VPN : Valeur prédictive négative

VPP : Valeur prédictive positive

vWF : Facteur von Willebrand

Première partie : Synthèse sur les thrombopénies induites par l'héparine

Introduction

Les thrombopénies induites par l'héparine (TIH) sont de rares mais graves complications des traitements hépariniques. Elles sont secondaires à une réponse immunitaire atypique à l'origine du développement, chez les patients, d'anticorps d'isotype IgG dirigés contre le facteur plaquettaire 4 (FP4) modifié par l'héparine (H).

D'un point de vue clinique, les TIH se distinguent par la survenue d'une thrombopénie le plus souvent dans les 5 à 10 jours suivant l'instauration de l'héparinothérapie, associée dans près de 50% des cas à des complications thrombotiques dues à un état d'hypercoagulabilité en lien avec une activation multicellulaire.

De par leur hétérogénéité clinique, mais également biologique, les TIH sont difficiles à diagnostiquer. Cette revue de la littérature a pour objectif de faire un état des lieux de la physiopathologie des TIH et des outils actuellement disponibles pour leur diagnostic.

Physiopathologie

Les TIH sont des complications rares mais sévères des traitement hépariniques. Elles résultent du développement d'anticorps d'isotypes IgG spécifiquement dirigés contre des complexes macromoléculaires constitués de FP4 et d'héparine (1).

Le FP4 est une chimiokine de la sous-famille CXC contenue majoritairement dans les granules α des plaquettes et libérée au cours de leur activation. (2, 3). Il est constitué de quatre chaînes polypeptidiques s'associant spontanément en tétramères (Figure n°1), et possédant à leur surface un anneau de charge positive à l'origine de leur affinité pour les molécules chargées négativement tel que les glycosaminoglycanes (GAGs), et notamment les héparines (4). Cette affinité du FP4 pour les GAGs explique également sa présence à la surface de différentes cellules, où il forme des complexes antigéniques avec les GAGs endogènes, notamment les chondroïtines sulfates des plaquettes, mais aussi les GAGs des cellules endothéliales, monocytes et polynucléaires neutrophiles (5).

La liaison du FP4 à des structures anioniques comme les GAGs induit un changement de sa conformation, et l'apparition de néo-épitopes à l'origine d'une réponse immunitaire aboutissant à la synthèse d'anticorps anti-FP4/H (6, 7).

La taille des polyanions et leur degré de sulfatation influencent fortement la formation des complexes antigéniques (8, 9). Ainsi, les polysaccharides dont les chaînes comportent plus de 12 sucres et ayant un degré de sulfatation proche de 1, comme l'héparine non-fractionnée, sont particulièrement à même d'induire ces modifications (10).

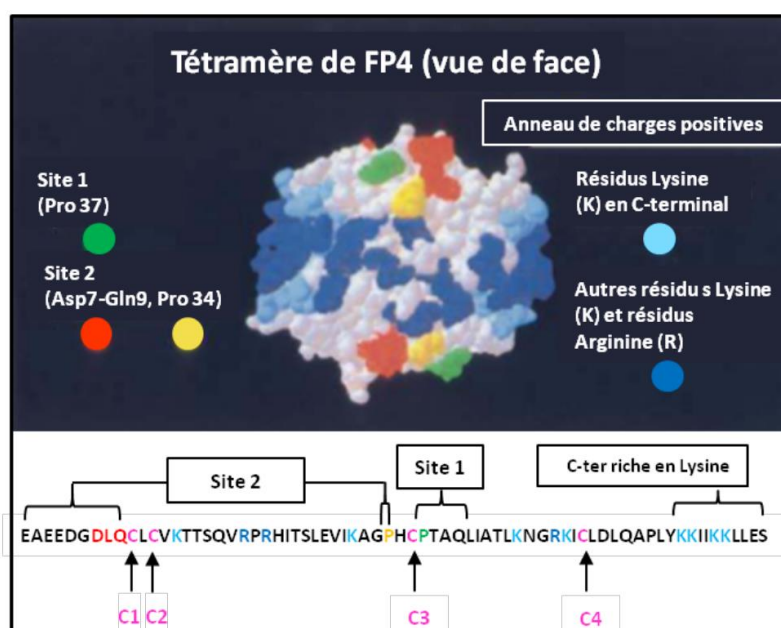


Figure 1. Représentation du facteur plaquettaire 4 (FP4) et des sites antigéniques impliqués dans la physiopathologie des TIH (11)

Partie supérieure : Structure tridimensionnelle du tétramère de FP4 entouré par un anneau de charges positives (résidus Lysine et Arginine, en bleu) à l'origine de son interaction avec les structures polyanioniques. Les deux sites antigéniques apparaissent respectivement en vert et rouge/jaune. Partie inférieure : séquence linéaire des 70 acides aminés d'un monomère de FP4.

Lorsque les héparines sont présentes à un rapport stœchiométrique proche de 1 :1 avec le FP4, elles stabilisent les tétramères, et favorisent la formation de complexes macromoléculaires d'un poids supérieur à 670 kDa et composés d'au moins 16 tétramères de FP4 disposés linéairement le long d'une molécule d'héparine (8). Ces complexes participent, dans un premier temps, à l'immunogénicité du FP4, puis deviennent la cible antigénique des anticorps anti-FP4/H (1).

Cette réponse immunitaire est atypique car des immunoglobulines d'isotype G, A, M anti-FP4/H sont détectées de façon concomitante (12) et transitoire, puisqu'une disparition rapide des immunoglobulines est classiquement observée dans les 3 à 6 mois suivant l'arrêt de l'héparinothérapie (12).

Contrairement aux autres thrombopénies médicamenteuses, se manifestant typiquement par des complications hémorragiques (13), les TIH sont associées à un risque élevé de thromboses en lien avec une hypercoagulabilité majeure consécutive à une activation des cellules sanguines par les anticorps pathogènes (14, 15).

L'interaction entre le Fc des IgG anti-FP4/H et les récepteurs FcγRIIA joue un rôle central dans l'activation cellulaire induite par les anticorps de TIH (Figure n°2). La thrombopénie observée résulte d'une consommation des plaquettes liée à leur activation puissante par les IgG anti-FP4/H, qui entraînent la libération du contenu de leurs granules, notamment du FP4, et leur agrégation (16).

De plus, l'activation plaquettaire est également associée à une génération de microparticules riche en phosphatidylsérine, un phospholipide anionique possédant une action procoagulante en favorisant les interactions entre les différents facteurs de la coagulation, un phénomène qui contribuerait à la survenue d'évènements thrombotiques au cours des TIH (17, 18).

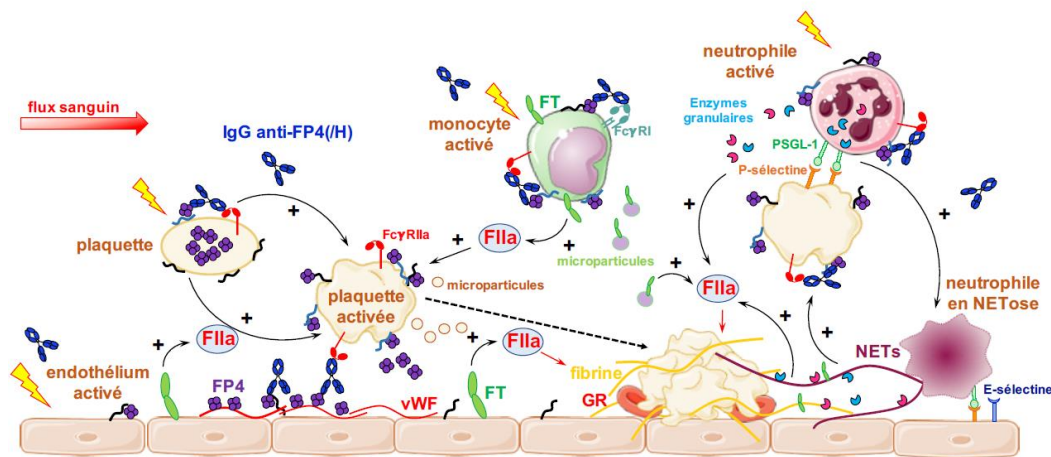


Figure 2. Physiopathologie des TIH (19)

Activation multicellulaire par les anticorps de TIH à l'origine d'un état d'hypercoagulabilité et de thromboses. FIIa: facteur II activé (thrombine), FP4: facteur plaquettaire 4, FT: facteur tissulaire, GR: globule rouge, NETs: neutrophil extracellular traps, PSGL-1: P-selectin ligand 1, vWF: facteur Von Willebrand.

Une participation des leucocytes dans l'état d'hypercoagulabilité observé au cours des TIH a également été démontrée. Ainsi, par l'intermédiaire des récepteurs FcγRIIa et FcγRI (20, 21), les IgG anti-FP4/H activent les monocytes, qui synthétisent de grandes quantités de facteur tissulaire (FT), le principal initiateur de la coagulation (22, 23, 24) (Figure n°2). Leur activation permet également la libération de microparticules procoagulantes exprimant du facteur tissulaire, qui contribuent ainsi à une génération explosive de thrombine. Les monocytes activés participeraient également, par des phénomènes de coopération cellulaire, à l'activation plaquettaire (25).

Les anticorps de TIH activent également les polynucléaires neutrophiles, ce qui se traduit par leur dégranulation (26) et la formation de *Neutrophil Extracellular Traps* (NETs) (27) (Figure n°2), de longs filaments d'ADN recouverts de protéines, qui activent les plaquettes (28), régulent négativement les inhibiteurs de la coagulation (29, 30) et favorisent la consolidation du caillot de fibrine. Ce phénomène semble jouer un rôle central dans la physiopathologie des TIH puisqu'une étude a récemment montré que la NETose induite par les anticorps de TIH était suffisante et nécessaire pour l'apparition de thromboses (29). Il a également été démontré, *in vitro*, que le FP4 stabilise les NETs en se fixant à leur surface, augmentant leur résistance à l'action des DNAses (31).

L'endothélium activé est aussi un acteur clé dans la physiopathologie des TIH. En effet, il fixe le FP4 libéré des plaquettes par l'intermédiaire des GAGs exprimés à sa surface, mais également par le biais du facteur Willebrand (vWF), qui forme des complexes FP4/vWF/anticorps. Ces complexes permettraient le recrutement des plaquettes à la surface de l'endothélium par l'intermédiaire du fragment Fc des immunoglobulines et favoriseraient également la formation de thrombi (32). L'endothélium activé surexprime par ailleurs des protéines d'adhésion, telles que la E-sélectine et la P-sélectine, qui facilitent la margination des leucocytes (33). A ce titre, dans un modèle murin de TIH, il a été montré que l'endothélium était un site de fixation privilégié des polynucléaires neutrophiles, qui contribuaient à la formation de thrombi à sa surface, notamment par NETose (31).

Facteurs de risque

Seule une fraction des patients traités par l'héparine développe des anticorps dirigés contre le FP4 et, parmi ces derniers, une majorité ne présenteront pas de TIH sur le plan clinique. Cette notion, représentée par le modèle de l'iceberg, illustre toute la complexité de la physiopathologie des TIH (34) (Figure n°3)

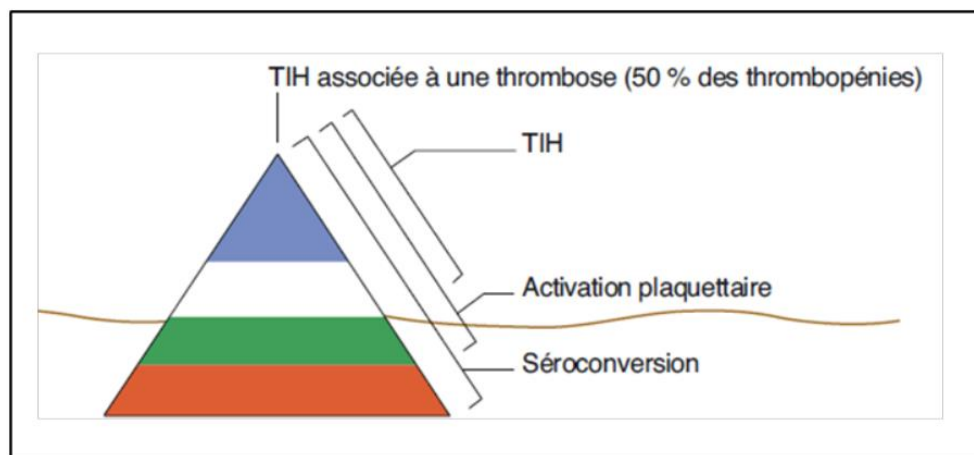


Figure 3. Modèle de l'iceberg d'après Warkentin et al. (34)

Le modèle de l'iceberg représente l'ensemble des patients sous héparinothérapie ayant développé des anticorps dirigés contre les complexes FP4/H. Seule une fraction de ces patients développera des anticorps activateurs des plaquettes et potentiellement pathogènes, représentée par les bandes bleues, blanche et verte. Parmi eux, certains ne développeront pas de TIH clinique (bande verte). La bande blanche représente les patients développant une thrombopénie isolée, tandis que seuls 50% présenteront des événements thrombotiques (bande bleu).

Plusieurs facteurs modulent le risque de TIH, comme le type d'héparine administrée, la durée d'anticoagulation, ou bien encore le contexte clinique. Les HNF sont associées à un risque plus élevé de TIH en comparaison aux héparines de bas poids moléculaire (HBPM) (35), tandis que ce risque est considéré comme minime sous fondaparinux, bien que plusieurs cas de TIH aient déjà été rapportés (36). Par ailleurs, les situations associées à une forte libération plaquettaire de FP4, telles que les chirurgies cardiaque et orthopédique, les assistances circulatoires ou encore les traumatismes étendus exposent à un risque élevé de TIH (37, 38, 39). Le sexe féminin, un terrain auto-immun, la présence de pathologies vasculaires semblent également favoriser la survenue d'une TIH (40).

Certains polymorphismes génétiques pourraient aussi jouer un rôle dans la survenue des TIH. Ceux associés à une faible expression d'interleukine 10 semblent associés à une plus grande production d'anticorps anti-FP4/H (41).

Un polymorphisme du gène ACP1, codant une protéine régulatrice de l'activation lymphocytaire, semblerait également moduler le risque de développer des anticorps anti-FP4/H (42).

Les caractéristiques des anticorps anti-FP4/H influencent également la survenue d'une TIH, aussi bien au regard de leur titre (43, 44), que de leur spécificité (45), ou leur affinité pour les complexes FP4/H (46). A ce titre, certains cas de TIH dites « auto-immunes » sont associés à la présence d'anticorps atypiques, capables de reconnaître avec une grande affinité le FP4 seul et d'activer les plaquettes en l'absence d'héparine (47). Ces anticorps ont été décrits au cours de TIH « spontanées », sous fondaparinux, mais aussi « retardées » (49), survenant après arrêt de l'héparine, ou encore lors de TIH « réfractaires » (50), associées à un état d'hypercoagulabilité persistant malgré l'arrêt de l'héparine (51).

Manifestations cliniques

La TIH est une situation à haut risque thrombotique puisque 30 à 50% des patients développent des thromboses, et ce de façon précoce car elles précèdent ou sont contemporaines de la thrombopénie chez près de la moitié des patients (52). Ces dernières sont majoritairement de localisation veineuse, avec une incidence notable de thromboses veineuses des membres inférieurs et d'embolies pulmonaires (53). Elles peuvent également être artérielles (à type d'ischémie des membres inférieurs, accident vasculaire cérébral, infarctus du myocarde), notamment après chirurgie cardiaque. Plus rarement, les TIH peuvent se manifester de façon « atypiques » puisque des hémorragies surrenaliennes (54), des gangrènes veineuses des membres inférieurs, des lésions cutanées nécrotiques aux sites d'injection de l'héparine (54, 55, 56) ou encore des réactions systémiques de type choc anaphylactoïdes ont déjà été rapportées (57, 58).

Dans de rare cas, une chute du fibrinogène, une thrombopénie sévère ($< 50\text{G/L}$), et des hémorragies sont également observées, souvent en association avec une coagulation

intravasculaire disséminée (CIVD) (34, 59). Bien que des saignements soient rarement décrits au cours des TIH, une étude récente suggère qu'ils surviendraient en réalité chez plus de 35% des patients (60). A ce titre, environ 10% des patients atteints de TIH développeraient une CIVD (61). Cependant, grâce à une meilleure connaissance de cette pathologie et à une prise en charge plus rapide des patients, cette fréquence semble avoir diminué récemment (62).

La TIH est un syndrome clinico-biologique qui se manifeste classiquement par une chute de la numération plaquettaire (NP) $\geq 50\%$ entre le 5ème et 10ème jour d'un traitement par l'héparine (53, 63), ce qui explique qu'elle soit le principal paramètre à surveiller lors de l'exposition d'un patient à l'héparine. Compte tenu du risque variable de développer une TIH selon le type d'héparine administrée, le terrain sous-jacent, le contexte clinique et la durée du traitement, le rythme de surveillance de la NP est actuellement adapté selon trois niveaux : risque faible ($< 0,1\%$), risque intermédiaire (compris entre 0,1 et 1 %) et risque élevé ($> 1\%$) de TIH (Tableau I).

	Patients	Schéma	Faible	Intermédiaire	Elevé	Surveillance numération plaquettaire
HNF	Chirurgicaux y compris césarienne	Prophylactique			+	2 à 3 fois par semaine entre le 4 ^e et 14 ^e jour puis 1 fois par semaine si le traitement est poursuivi
		Curatif			+	
	Médicaux/Obstétrique	Curatif			+	
	CEC, EER, Assistances				+	
	Médicaux/Obstétrique	Prophylactique		+		1 à 2 fois par semaine entre le 4 ^e et 14 ^e jour puis 1 fois par semaine si le traitement est poursuivi
HBPM	Chirurgicaux y compris césarienne	prophylactique		+		
		Curatif		+		
	Cancéreux			+		
	Médicaux/Obstétrique	Prophylactique	+			
		Curatif	+			Aucune
Fondaparinux	Toutes indications		+			

CEC : circulation extracorporelle, EER : épuration extrarénale.

Tableau I. Risque de TIH selon le contexte clinique et le type d'héparine administrée, et impact sur la surveillance de la numération plaquettaire sous héparine et dérivés (64)

De façon moins fréquente, une TIH peut survenir de façon précoce (moins de 24h après le début de l'héparinothérapie) chez des patients ayant préalablement développé des anticorps lors d'une exposition à l'héparine dans les 100 derniers jours (63). Elle peut également survenir tardivement sous HBPM (59, 65), ou même, de façon exceptionnelle, jusqu'à 3 semaines après arrêt de l'héparinothérapie (66).

Probabilité clinique :

En cas de chute de la numération plaquettaire sous héparine, de thrombose ou de manifestation clinique atypique, la probabilité clinique de TIH peut être évaluée grâce à des scores, utilisables chez tous les patients à l'exclusion de ceux ayant subi une chirurgie cardiaque avec circulation extra-corporelle (CEC), ceux bénéficiant d'une ECMO (extracorporeal membrane oxygenation) ou encore ceux hospitalisés en unités de soins intensifs, en raison de performances incertaines (64). Ces scores permettent de guider la réalisation des examens biologiques utiles au diagnostic de TIH. Parmi eux, le score des 4Ts modifié (Tableau II) est le plus utilisé (67). Basé sur 4 critères : profondeur de la thrombopénie, délai de chute de la numération plaquettaire, apparition de thromboses, exclusion d'autres causes de thrombopénie (68), il permet de définir 3 niveaux de risque : faible ($4Ts < 3$), intermédiaire ($4Ts = 4$ ou 5) ou élevé ($4Ts > 6$). Un score des 4Ts faible permet d'exclure la TIH avec une excellente valeur prédictive négative (99,8 %) (69), tandis que des scores intermédiaire ou élevé ont une faible valeur prédictive positive (respectivement de 9 à 22 % et de 40 à 83 %), ce qui justifie la réalisation d'examens biologiques pour confirmer le diagnostic.

	2	1	0
Thrombopénie	Diminution de plus de 50% de la numération plaquettaire <u>et</u> plaquettes nadir ≥ 20 G/L Sans chirurgie dans les 3 jours précédents	Diminution de 30 à 50% <u>ou</u> Plaquettes entre 10 et 19 G/L <u>ou</u> diminution de plus de 50% de la numération plaquettaire avec chirurgie récente (3 derniers jours)	Diminution de moins de 30% de la numération plaquettaire <u>ou</u> plaquettes nadir < 10 G/L
Délai de survenue de la thrombopénie (Timing)	Chute de la numération plaquettaire (ou thrombose) 5 à 10 jours après le début de l'héparine <u>ou</u> dans un délai de 24 heures si héparinothérapie récente (de 5 à 30 jours)	Chute de la numération plaquettaire (après plus de 10 jours d'héparine <u>ou</u> dans un délai de 24 heures si héparinothérapie semi récente (de 31 à 100 jours)	Thrombopénie survenant avant 4 jours de traitement sans héparinothérapie dans les 100 derniers jours
Thromboses et autres complications	Nouvelle thrombose veineuse ou artérielle (confirmée) <u>ou</u> nécrose cutanée <u>ou</u> réaction systémique après injection d'HNF <u>ou</u> hémorragie des surrénales	Extension ou récurrence d'une thrombose préexistante <u>ou</u> suspicion d'une nouvelle thrombose en attente de confirmation <u>ou</u> érythème cutané après injection d'héparine.	Aucun événement
Autres causes de thrombopénies	Aucune autre	Autre cause possible : - Sepsis sans confirmation microbiologique - Thrombopénie associée à une ventilation mécanique - Autres	Autre cause probable : - Chirurgie dans les 72 heures - Infection confirmée - Chimio ou radiothérapie dans les 20 derniers jours - CIVD due à autre cause - Purpura post-transfusionnel - Plaquettes < 20 G/L et médicament thrombopéniant

Score : 6 - 8 = **Elevé**; 4 - 5 = **Intermédiaire**; 0 - 3 = **Faible**

Tableau II. Score des 4Ts utilisé pour l'évaluation de la probabilité clinique de TIH (adapté d'après Lo et al., Am J Hematol 2007) (71)

Etablissement du score après addition des points obtenus dans chacune des 4 catégories. Le total des points permet de stratifier la probabilité clinique en 3 catégories : faible, intermédiaire ou élevée. En cas de score faible, la TIH peut être écartée. En cas de score intermédiaire ou élevé, l'héparinothérapie doit être suspendue, et des examens biologiques effectués afin de confirmer le diagnostic de TIH.

Il est également à noter une situation particulière : la chirurgie cardiaque avec CEC, associée à une immunisation très fréquente contre le FP4 puisque 30 à 50% des patients développent des anticorps anti-FP4/H en post-CEC. Cependant, seuls 1 à 2% de ces patients vont réellement développer une TIH clinique (70). Dans ce contexte, le diagnostic est par ailleurs complexifié par la présence quasi-systématique d'une thrombopénie.

Chez ces patients, la probabilité clinique de TIH peut être évaluée en suivant l'évolution de la numération plaquettaire dans les jours qui suivent la CEC. Celle-ci doit revenir à sa valeur de base (NP avant CEC) aux alentours du 5^{ème} jour post-CEC. Dans le cas contraire, une TIH doit être suspectée, et deux niveaux de risque peuvent être définis selon le profil d'évolution

de la NP : un risque intermédiaire en cas de profil monophasique, et un risque élevé en cas de profil biphasique (68) (Figure n°4).

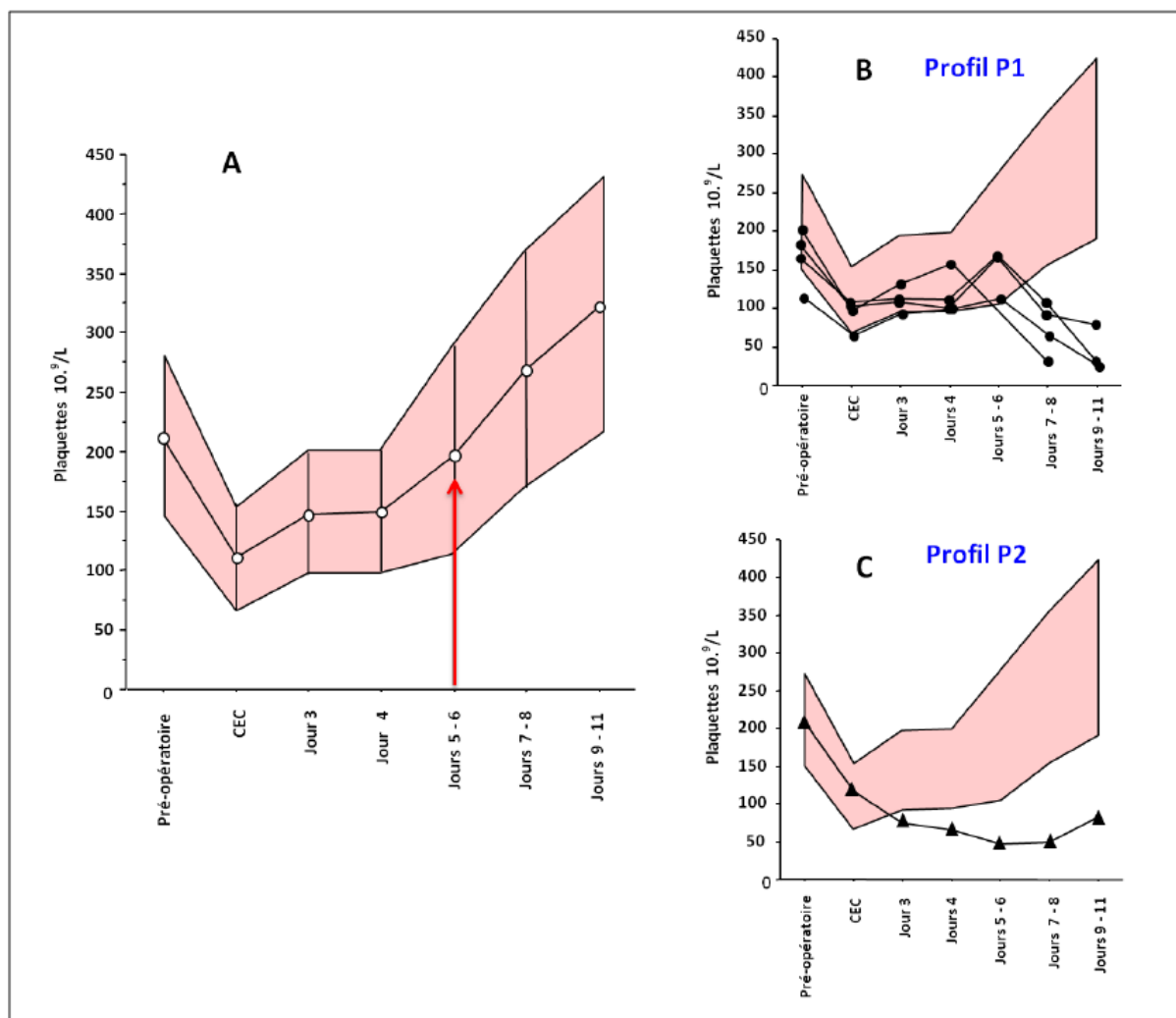


Figure 4. Profils d'évolution de la numération plaquettaire en post-CEC et conséquences sur le risque de TIH (72)

(A) Évolution normale de la numération plaquettaire (NP) chez un patient en post-CEC avec normalisation de la NP aux alentours de J5. (B) Évolution biphasique de la NP chez un patient en post-CEC, associée à une probabilité élevée de TIH. (C) Évolution monophasique de la NP chez un patient en post-CEC, associée à une probabilité intermédiaire de TIH.

Une surveillance de la NP a également été proposée pour dépister les TIH chez les patients sous assistance circulatoire de type ECMO (73). En effet, une chute brutale de la NP cinq jours après l'initiation de l'ECMO, surtout si elle est associée à des caillotages du circuit ou à des signes de coagulopathie de consommation (notamment baisse du fibrinogène plasmatique) pourrait être en faveur d'une TIH, et doit motiver la réalisation d'examen biologiques à la recherche d'anticorps anti-FP4/H pathogènes.

Diagnostic biologique

Le diagnostic biologique des TIH repose sur deux types de tests : des tests immunologiques, et des tests fonctionnels.

Les tests immunologiques, réalisés en première ligne, permettent de détecter les anticorps anti-FP4/H quelle que soit leur capacité à activer les cellules. Ces tests possèdent une très bonne sensibilité, et une excellente valeur prédictive négative (VPN), expliquant qu'un résultat négatif permette le plus souvent d'exclure une TIH. Les premiers tests immunologiques développés, et les mieux évalués, sont les tests semi-quantitatifs basés sur une méthode de type *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay* (ELISA). Plusieurs kits commerciaux sont disponibles, reposant sur différentes techniques de modification du FP4 (FP4/polyvinylsulfonate, FP4/H, lysat plaquettaire/H). Considérant le rôle central des IgG dans la physiopathologie des TIH, les kits détectant spécifiquement les IgG anti FP4/H doivent aujourd'hui être préférentiellement utilisés (74).

Le score des 4Ts et le résultat du test immunologique permettent, le plus souvent, d'orienter le diagnostic de TIH et la prise en charge des patients. En effet, ce diagnostic semble être exclu chez les patients avec un score faible, avec une VPN proche de 100%, mais aussi chez ceux ayant un score intermédiaire et un test immunologique négatif (69, 75, 76). En revanche, en cas de score intermédiaire ou élevé associé à un test immunologique positif, le diagnostic doit être évoqué, et la réalisation d'un test fonctionnel envisagée pour confirmer le diagnostic de TIH (Tableau III).

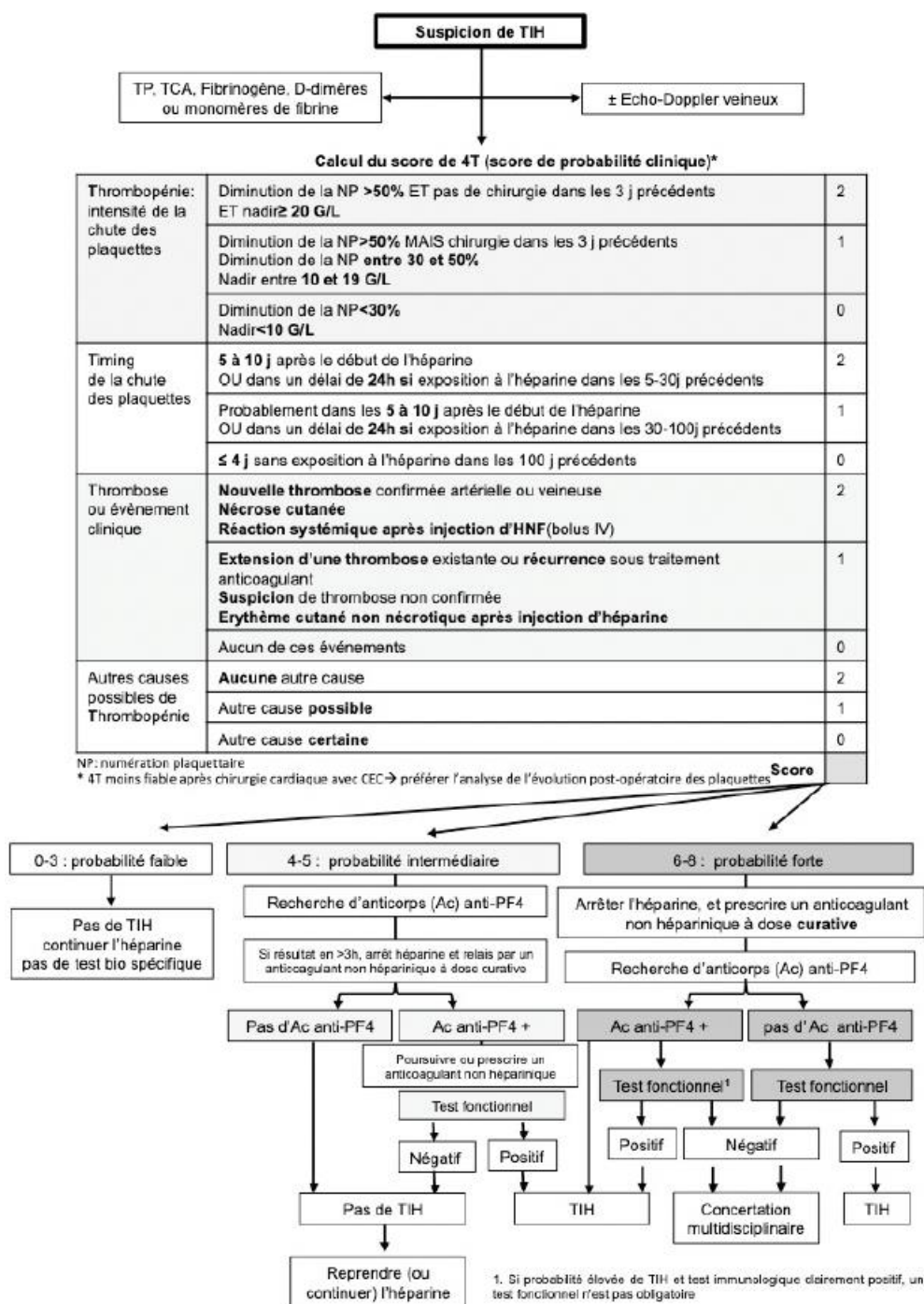


Tableau III. Algorithme diagnostique des TIH (77)

Des tests immunologiques dits « rapides » ont également été développés, et sont maintenant très largement utilisés. Basés sur des techniques d'immunofiltration sur gel (PaGIA®), d'immunochromatographie sur membrane (lateral flow immunoassay, LFIA®), d'immunoturbidimétrie (HemosIL HIT-Ab®) ou encore d'immunochimiluminescence (HemosIL AcuStarHIT-IgG®), ces tests permettent de rendre un résultat en une trentaine de

minutes maximum (75, 76, 78, 79, 80). Bien qu'ils aient globalement une bonne sensibilité (> 95%), et permettent d'écarter une TIH en cas de négativité chez les patients à risque intermédiaire, plusieurs de ces tests ont récemment été mis en défaut en raison d'une VPN insuffisante chez les patients avec une probabilité élevée de TIH, et doivent donc être utilisés avec précaution (76, 81). Il est aussi important de noter que les tests rapides automatisés, basés sur une méthode d'immunoturbidimétrie pour l'un (79) et de chimiluminescence pour le second (80), nécessitent des automates dédiés.

La spécificité des tests immunologiques est globalement insuffisante pour confirmer avec certitude un diagnostic de TIH, et un résultat positif doit, dans la mesure du possible, être complété par un test fonctionnel, qui permet de ne détecter que les anticorps réellement activateurs des plaquettes en présence d'héparine.

Tous les tests fonctionnels actuellement disponibles nécessitent l'utilisation de plaquettes fraîches de donneurs sains, que ce soit en environnement plasmatique (plasma riche en plaquettes, PRP), après lavages, ou sans préparation, à savoir en sang total.

La source de plaquettes ainsi que leur préparation ont une grande influence sur les résultats des tests fonctionnels utilisés pour le diagnostic des TIH (20, 82). Le sang doit notamment être prélevé après un court repos, chez un donneur non-fumeur et ne prenant pas de médicament pouvant altérer les fonctions plaquettaires (83). Le polymorphisme H131R du récepteur FcγRIIa a par ailleurs un impact majeur sur la réactivité des plaquettes aux anticorps de TIH en environnement plasmatique. En effet, les plaquettes des sujets présentant le polymorphisme 131RR sont plus réactives aux anticorps de TIH en raison d'une moindre compétition entre les IgG endogènes et les anticorps anti-FP4/H pour la fixation aux récepteurs FcγRIIa (20).

A l'heure actuelle, le test de libération à la sérotonine radiomarquée (SRA) (Figure n°5) est l'un des tests disponibles les plus performants (84). Ce test, basé sur l'utilisation de plaquettes lavées, consiste à mesurer la libération de sérotonine radiomarquée, préalablement incorporée dans les granules denses, comme reflet de l'activation plaquettaire (84, 85).

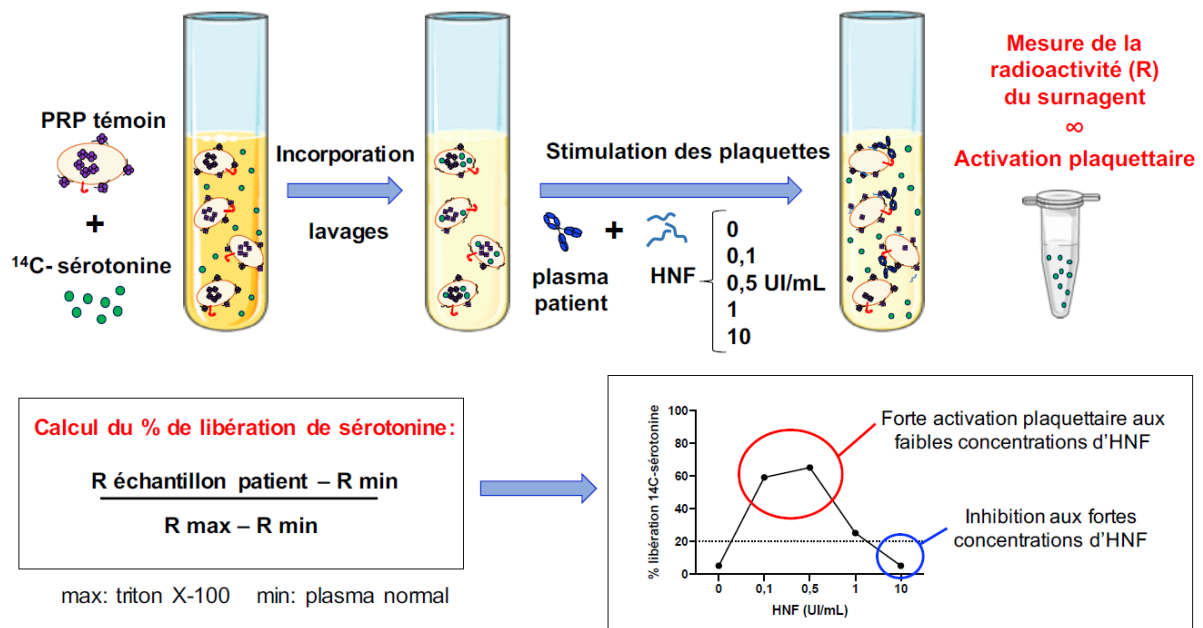


Figure 5. Principe du test de libération de sérotonine radiomarquée (SRA)

PRP : plasma riche en plaquettes, ^{14}C : carbone 14, HNF : héparine non fractionnée

Bien que développé dans les années 80, le SRA est encore aujourd'hui considéré comme le "gold standard" pour le diagnostic des TIH en raison de son excellente spécificité (>99%) et de sa très bonne sensibilité (88-95%) (84, 85, 86, 87).

Un autre test de référence est le test d'activation plaquettaire induite par l'héparine (HIPA, pour Heparin-Induced Platelet Activation assay), également réalisé sur plaquettes lavées, qui évalue non pas la libération des granules denses mais l'agrégation plaquettaire induite par les anticorps de TIH (Figure 6).

Ces deux tests partagent néanmoins certaines limites : ils nécessitent des lavages plaquettaires, avec des méthodologies relativement longues, sont réalisables uniquement au sein de laboratoires spécialisés, et nécessitent une certaine expertise. Par ailleurs, le SRA est basé sur l'utilisation de radio-isotopes, ce qui implique un agrément spécifique, des locaux sécurisés, une élimination coûteuse des déchets et un impact environnemental non-négligeable.

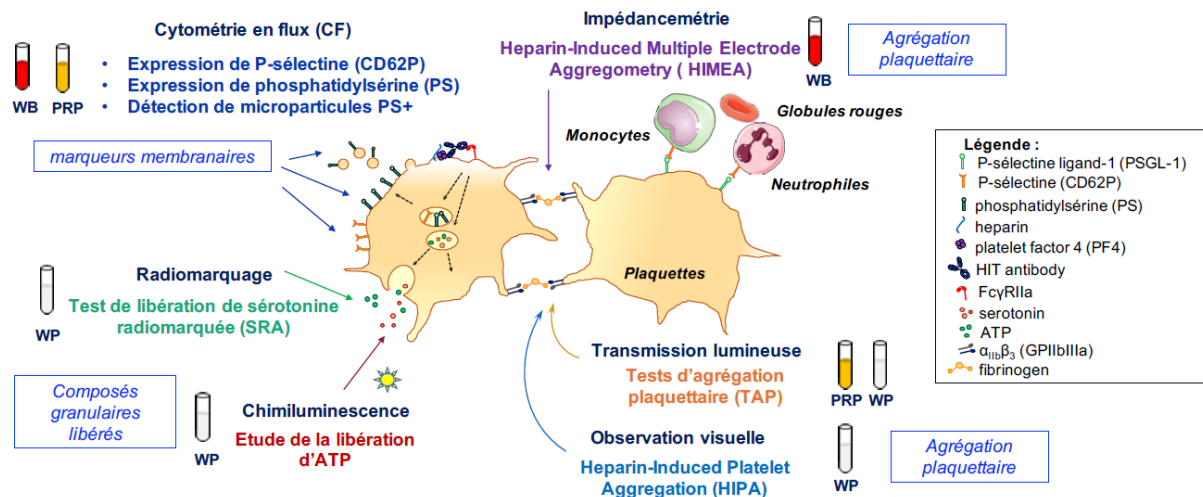


Figure 6. Principe des tests fonctionnels disponibles pour le diagnostic des TIH, adapté d'après Tardy et al JCM 2020 (88)

D'autres tests fonctionnels (Figure n°6) sont également disponibles pour le diagnostic des TIH. Le plus ancien, mais toujours très utilisé, est l'agrégométrie plaquettaire par transmission lumineuse en PRP (89), qui a l'avantage d'être très accessible car couramment intégré à la démarche diagnostique des thrombopathies constitutionnelles au sein des laboratoires d'hémostase spécialisés. Les tests d'agrégation plaquettaires (TAP) présentent une sensibilité variable (de 31 à 100% selon les études) pour le diagnostic des TIH, vraisemblablement très dépendante du donneur de plaquettes choisi, avec un rôle de l'environnement plasmatique (89, 86, 90). A ce titre, il a été proposé d'utiliser les plaquettes d'au moins deux donneurs différents au cours des TAP avant de considérer un résultat comme négatif (91).

De façon alternative, l'agrégation plaquettaire peut être mesurée en sang total au cours du test HIMEA (*heparin-induced multiple electrode aggregometry*) réalisé sur le Multiplate Analyzer (Roche) (92). Ce test a le gros avantage de s'affranchir des difficultés liées aux nombreuses variables pré-analytiques et analytiques à prendre en compte lors de l'utilisation de PRP ou de plaquettes lavées. Deux autres avantages sont sa simplicité et sa rapidité de réalisation. Par ailleurs, l'HIMEA semble être plus sensible que les TAP (93), avec des performances qui se rapprochent de celles du SRA (sensibilité de 85 % et spécificité de 98 %) selon une étude récente (94).

D'autres méthodologies permettent quant à elle d'évaluer l'activation plaquettaire induite par les anticorps de TIH. La mesure de la libération d'ATP par chimiluminescence a été suggérée, mais cette stratégie reste peu validée (95). En revanche, une approche maintenant très

largement utilisée est la cytométrie en flux, qui a l'avantage d'être accessible dans la majorité des laboratoires d'Hématologie, et permet d'évaluer l'activation plaquettaire par mesure de l'expression de P-sélectine (CD62P) ou de phosphatidylsérine (PS) à la surface des plaquettes (96, 97, 98, 99), ou bien encore de quantifier l'émission de microparticules procoagulantes (17, 87, 100). Aujourd'hui, deux tests fonctionnels sont commercialisés : l'Emo-test HIT confirm®(Emosis, Illkirch-Graenstaden, France) et le HIT Alert® (IQ products, Groningen, Pays-Bas), basés respectivement sur la mesure de l'expression de CD62P et de PS à la surface des plaquettes. Plusieurs études ont évalué les performances de la cytométrie en flux pour le diagnostic des TIH, avec une sensibilité rapportée variant de 70 à 95 %, et une spécificité de 75 à 100 % selon les études (88, 96, 101).

Quel que soit le type de méthodologie employée, différentes concentrations d'héparines doivent être systématiquement utilisées lors des tests fonctionnels, et permettront d'objectiver une activation/agrégation plaquettaire « héparine-dépendante », en faveur du diagnostic de TIH (84). En effet, les anticorps de TIH activent classiquement les plaquettes en présence de faibles concentrations d'héparine (0,1 à 1 UI/mL), tandis qu'ils perdent leur pathogénicité à fortes concentrations (10 à 100 UI/mL) (85). La capacité des anticorps de TIH à activer les plaquettes en l'absence d'héparine semble quant à elle plus variable, et influencée par différents paramètres, comme la nature des anticorps (spécificité/affinité), leur titre, mais aussi les concentrations de FP4 dans l'environnement plaquettaire (5, 47).

Les performances des différents tests fonctionnels restent à ce jour peu comparées entre elles, principalement en raison des faibles volumes d'échantillons de TIH disponibles. Cependant, en utilisant 5B9, une IgG1 monoclonale qui mime les anticorps retrouvés au cours des TIH (102), notre équipe a récemment montré que le SRA restait à l'heure actuelle le test le plus performant en comparaison aux TAP (PRP et plaquettes lavées), à la cytométrie en flux (kit Emosis®), à l'HIMEA ou encore à la mesure de la libération d'ATP en lumi-agrégométrie (103).

Prise en charge thérapeutique

A la phase aigüe d'une TIH, toute source d'héparine doit être proscrite, y compris celle provenant des circuits et voies d'abord. En raison d'une hypercoagulabilité majeure induite par les anticorps anti-FP4/H, cette stratégie doit être complétée par l'instauration d'une anticoagulation à dose curative à l'aide d'un antithrombotique non-héparinique (104, 105).

La durée de cette anticoagulation est au minimum de 4 semaines lorsque la thrombopénie est isolée, et de 3 à 6 mois en cas de thrombose, en fonction des caractéristiques du patient, mais aussi de la gravité et de la localisation des thromboses.

Plusieurs molécules sont actuellement disponibles pour le traitement des TIH. Bien que seuls le danaparoïde sodique et l'argatroban aient l'AMM dans cette indication, le fondaparinux et plus récemment les anticoagulants oraux directs (AOD) ont également été proposés (106). A ce titre, le rivaroxaban semble être une option efficace et sécurisée (106, 107).

Le choix de la molécule sera guidé par l'état clinique du patient, notamment sa stabilité, et le risque hémorragique auquel il est exposé, ainsi que l'état des organes principaux d'élimination, à savoir le rein (danaparoïde sodique, fondaparinux) et le foie (argatroban, AOD) (64).

Chez les patients instables, ou à risque hémorragique élevé (comorbidité ou geste invasif récent ou prévu à court terme), une anticoagulation injectable par argatroban (Arganova®) sera souvent privilégiée compte tenu de la très courte demi-vie de cet inhibiteur spécifique et direct de la thrombine. Sa surveillance biologique peut être réalisée en première intention grâce au temps de céphaline activé (TCA), avec un ratio cible attendu entre 1,5 et 3, sans dépasser 100 secondes. Elle peut également être réalisée à l'aide de tests plus spécifiques, tels qu'un test à l'écarine ou un temps de thrombine dilué, avec une valeur cible idéalement attendue entre 0,5 et 1,5 µg/mL (64).

Chez un patient stable et/ou en cas d'insuffisance hépatique sévère (Child-PughC), le danaparoïde sodique pourra être utilisé. Sa surveillance biologique repose sur la mesure de son activité anti-Xa avec une calibration spécifique, et des valeurs cibles attendues comprises entre 0,5 et 0,8 U anti-Xa/mL. Cependant, cet anticoagulant peut induire des réactions croisées

avec l'héparine *in vitro*, qui, rarement, peuvent avoir des conséquences cliniques, notamment suspectées en l'absence de correction de la NP ou si une thrombose apparaît ou s'étend (64).

Les TIH sont des complications rares des traitements hépariniques, mais la gravité de leurs manifestations, notamment thrombotiques, impose de bien connaître les situations à risque et les modalités de dépistage de cette complication, tout comme les stratégies diagnostiques et thérapeutiques proposées. Malgré l'évolution de nos connaissances sur cette pathologie, son diagnostic reste difficile, soulignant l'importance des efforts réalisés par la communauté médicale et scientifique pour améliorer constamment nos outils diagnostiques.

Seconde partie :
Travaux de recherche

Malgré l'évolution constante de nos connaissances sur la physiopathologie des TIH et l'amélioration de nos outils techniques, le diagnostic des TIH reste encore aujourd'hui complexe en raison de l'hétérogénéité clinique et biologique de ce syndrome.

Le test de libération de sérotonine radiomarquée (SRA), considéré à l'heure actuelle comme l'un des deux tests fonctionnels de référence pour confirmer le diagnostic des TIH, bénéficie d'une excellente spécificité (>99%) et d'une bonne sensibilité (88-95%) selon les données de la littérature (84, 85, 86, 87).

Cependant, des travaux publiés par notre équipe en 2017 dans le *British Journal of Medicine*, ont profondément remis en cause la sensibilité de ce test (103) (Annexe 1). Ces travaux, effectués en collaboration avec le Dr Anne Bauters du CHU de Lille, ont été motivés par l'observation d'un cas de TIH atypique, présentant un titre significatif d'anticorps anti-FP4/H, mais un SRA négatif à plusieurs reprises alors que les tests d'agrégation plaquettaires effectués à Lille étaient clairement positifs.

Au-delà d'un signal mesuré qui diffère, ces deux tests fonctionnels se distinguent par le fait que les TAP sont couramment réalisés en milieu plasmatique alors que le SRA est effectué sur plaquettes lavées. Le lavage des plaquettes contribue vraisemblablement aux bonnes performances du SRA, en limitant toute compétition entre les anticorps de TIH et les IgG du donneur pour la fixation aux récepteurs FcγRIIa plaquettaires (20). Néanmoins, l'impact de ces lavages sur la densité de FP4 et la formation de complexes antigéniques à la surface des plaquettes n'a jamais été étudié.

Lors de ces travaux, notre équipe a émis l'hypothèse que les concentrations de FP4 dans l'environnement plaquettaire pouvaient influencer la capacité des anticorps de TIH à activer ces cellules, et nous avons donc évalué l'intérêt d'ajouter du FP4 au cours du SRA.

En utilisant 5B9, notre anticorps modèle de TIH, notre équipe a ainsi montré que l'ajout de FP4 humain potentialisait l'activation plaquettaire induite par les anticorps anti-FP4/H de façon dose-dépendante au cours du SRA. En effet, si l'ajout de FP4 à 2,5 ou 5 µg/mL augmentait l'activation plaquettaire observée en présence de 5B9 à 20 µg/mL, seule la concentration de 10 µg/mL de FP4 permettait d'observer une activation plaquettaire significative en présence de concentrations de 5B9 habituellement non-activatrices (1 et 2,5 µg/mL) (Figure n°7).

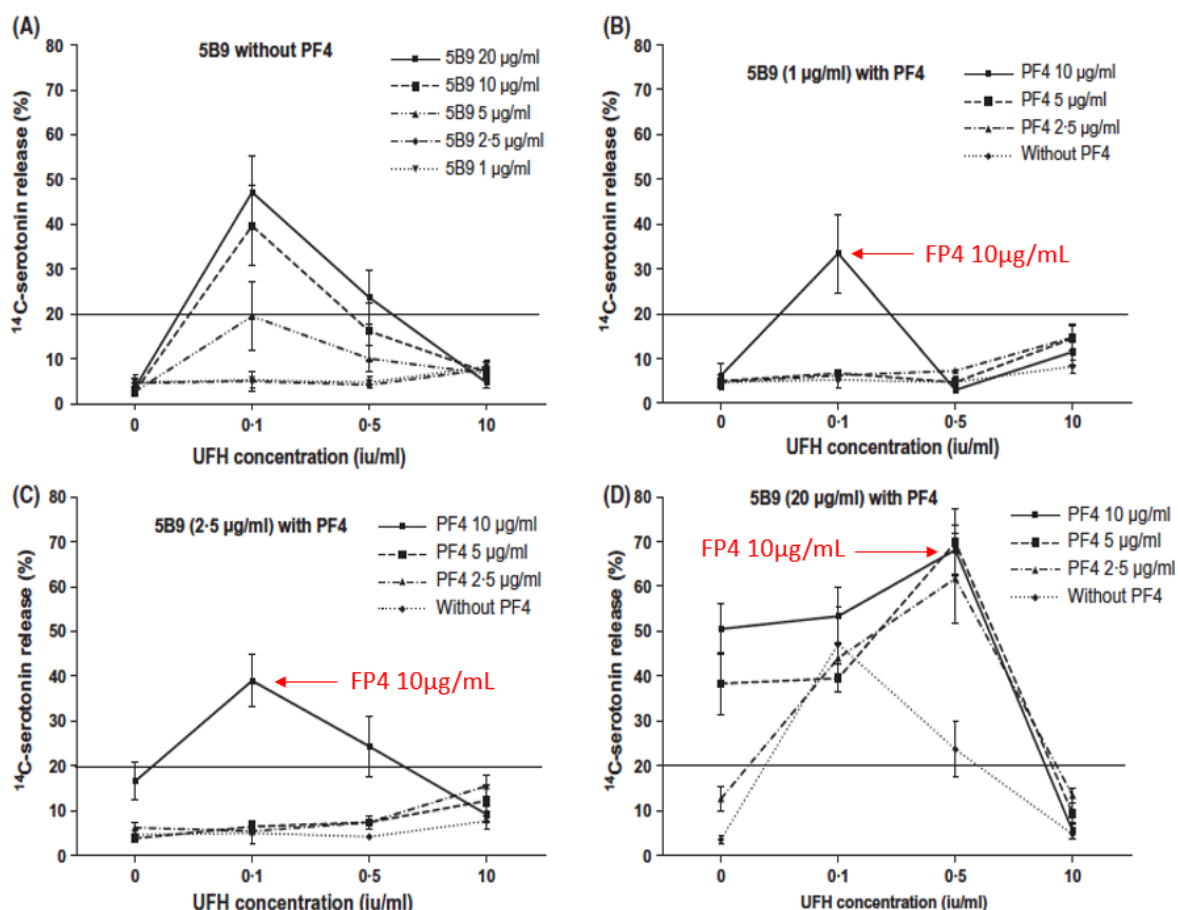


Figure 7. L'ajout de FP4 potentialise la libération de sérotonine induite par de faible concentrations de 5B9 (103)

(A) Test de libération de sérotonine (SRA) réalisé avec des concentrations croissantes de l'anticorps 5B9 (1-20 µg/mL). Les données représentent la moyenne du % de libération de sérotonine $\pm$ SEM (n = 6). SRA réalisé avec différentes concentrations de 5B9 (B, 1 µg/mL, n = 4), (C, 2,5 µg/mL, n = 6) (D, 20 µg/mL, n = 6) en l'absence ou en présence de concentrations croissantes de FP4 humain (0 ; 2,5 ; 5 ; 10 µg/mL). Les données représentent la moyenne du % de libération de sérotonine $\pm$ SEM (B, n=4, C-D, n=6). UFH : Héparine non fractionnée.

Au vu de ces résultats, les performances d'un SRA modifié par ajout de FP4 à 10 µg/mL (SRA-FP4) ont alors été comparées à celles du SRA standard sur un panel de 50 patients présentant une suspicion de TIH et des anticorps anti-FP4/H détectés en ELISA. Notre équipe a ainsi montré que le SRA standard était positif pour 17 patients, tout comme le SRA-FP4. En revanche, ce dernier l'était également pour 9 autres patients qui présentaient tous un SRA standard négatif mais pour qui le diagnostic de TIH avait été considéré comme plausible (Figure n°8).

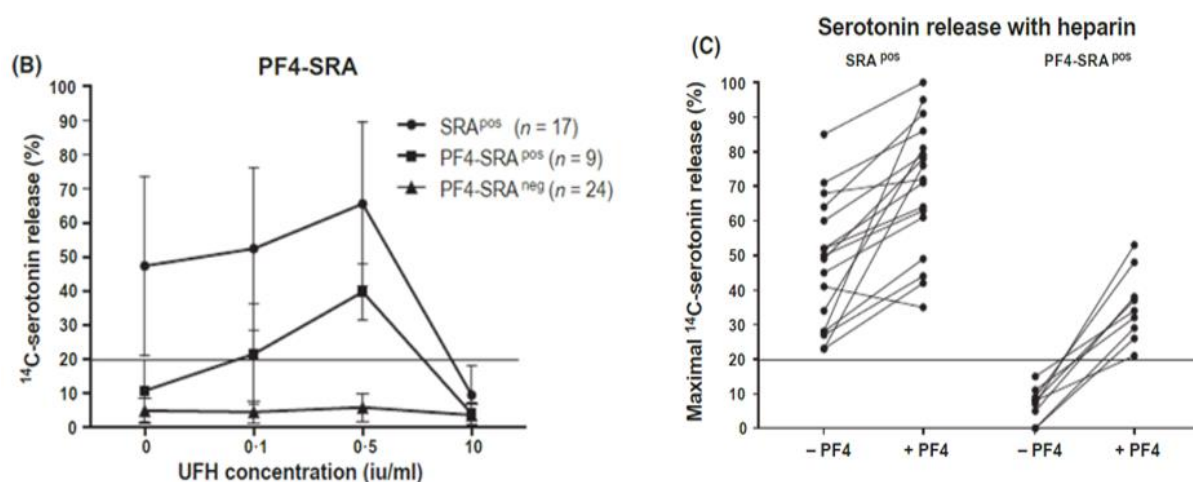


Figure 8. L'ajout de FP4 potentialise la détection d'anticorps activateurs des plaquettes de façon héparine-dépendante chez certains patients avec une suspicion de TIH (103)

Test de libération de sérotonine (SRA) réalisé sans (A) et avec FP4 10µg/mL (B) sur 50 échantillons plasmatiques de patients ayant fait l'objet d'une suspicion de TIH. Les données représentent la moyenne $\pm$ SD. (C) Libération maximale de sérotonine (%) mesurée en l'absence et en présence de FP4 à 10µg/mL pour les patients avec un SRA standard positif (groupe SRA^{pos} ; n=17) et ceux présentant uniquement un SRA-FP4 positif (groupe PF4-SRA^{pos} ; n=9).

Ces données préliminaires suggèrent donc que l'addition de FP4 au cours du SRA peut être utile pour confirmer le diagnostic des TIH.

Depuis 2016, le SRA-FP4 est réalisé en routine dans notre laboratoire hospitalier, conjointement avec le SRA standard, pour la confirmation du diagnostic de TIH. L'objectif du travail exposé ci-après était donc d'évaluer l'apport réel du SRA-FP4 pour la confirmation du diagnostic de TIH grâce à l'analyse des données recueillies d'Avril 2016 à Juin 2020.

Au cours de cette étude rétrospective multicentrique impliquant 20 centres en France, nous avons donc évalué les performances du SRA-FP4 en termes de sensibilité et de spécificité, et nous nous sommes questionnés sur la place de ce test dans la stratégie diagnostique des TIH au sein de notre laboratoire.

Matériel et méthode :

Recueil des données et patients étudiés :

Sur une période d’Avril 2016 à Juin 2020, le service d’Hématologie-Hémostase du CHRU de Tours a effectué un SRA standard et un SRA-FP4 pour 484 patients faisant l’objet d’une suspicion de TIH et pris en charge dans 37 centres hospitaliers français ayant sollicité notre expertise pour confirmer le diagnostic, dont 20 ont participé à cette étude (liste complète en Annexe 2). Les données clinico-biologiques relatives à ces patients ont été recueillies de façon prospective et systématique dans le cadre de notre activité diagnostique, mais aussi de façon rétrospective afin d’obtenir certaines informations complémentaires utiles aux besoins de l’étude. Les données analysées de façon rétrospective dans le cadre de ce projet comprennent le sexe et l’âge du patient, l’indication et le type d’héparine, l’évolution de la numération plaquettaire, la probabilité clinique de TIH, le résultat du test immunologique effectué pour rechercher la présence d’anticorps anti-FP4/H, la présence de thromboses et leur localisation, de manifestations atypiques (hémorragie surrénalienne, nécrose au point d’injection, réaction systémique post-injection), d’autres causes de thrombopénie (notamment sepsis et chirurgie dans les 3 jours précédant la suspicion), d’une CIVD, et l’attitude thérapeutique convenue (arrêt ou non de l’héparine et introduction éventuelle d’une anticoagulation alternative).

Les patients pour lesquels des informations étaient manquantes concernant les modalités du traitement héparinique, la probabilité clinique de TIH, la présence ou non d’une thrombose, ou bien encore l’évolution de la numération plaquettaire, ont été exclus de cette étude, tout comme ceux présentant un test immunologique négatif. La majorité de ces tests ont été réalisés dans les centres demandeurs à l’aide de méthodologie et de trousse diagnostiques variables (voir Annexe 2). En cas d’information manquante concernant le résultat du test immunologique, et si le volume restant d’échantillon le permettait, un test ELISA IgG spécifique (HAT45G GTI Immucor) a été réalisé dans notre centre (n = 25).

Diagnostic de TIH :

Pour chaque suspicion, les résultats des tests fonctionnels effectués à Tours ont été interprétés conjointement avec les autres données clinico-biologiques pour conclure sur le diagnostic de

TIH. Les patients inclus dans cette étude ont été répartis en différents groupes selon les résultats de ces tests fonctionnels :

- Un premier groupe présentant un SRA classique et un SRA-FP4 négatifs, pour lequel le diagnostic de TIH a été écarté,
- Un deuxième groupe présentant à la fois un SRA classique et un SRA-FP4 positifs, pour lequel le diagnostic de TIH a été retenu,
- Un troisième groupe présentant un SRA classique négatif mais un SRA-FP4 positif. Pour chaque patient, une fiche synthétique compilant l'ensemble des données clinico-biologiques (Annexe 3 – 26), à l'exception des résultats de SRA et de SRA-FP4, a été réalisée et le diagnostic de TIH a été classé en probable, possible ou peu probable par un panel de 2 experts impliqués en routine dans le diagnostic et la prise en charge des suspicions de TIH au CHRU de Tours (CP et EAG). En cas de désaccord, l'avis d'un troisième expert (YG) a été sollicité afin d'obtenir un consensus. Pour ces patient, le diagnostic de TIH a été retenu en cas de TIH « possible ou probable ».
- Un quatrième groupe présentant un SRA classique positif mais un SRA-FP4 avec un profil d'activation non-héparine dépendant, pour lequel le diagnostic de TIH a été retenu.

Calcul des performances diagnostiques du SRA et du SRA-FP4 :

Les performances intrinsèques et extrinsèques du SRA classique et du SRA-FP4 ont été évaluées en calculant la sensibilité, la spécificité, la valeur prédictive positive (VPP), et la valeur prédictive négative (VPN) de chacun de ces tests selon les formules suivantes :

$$\text{Sensibilité} = \frac{\text{Vrais positifs}}{\text{Vrais positifs} + \text{Faux négatifs}}$$

$$\text{Spécificité} = \frac{\text{Vrais négatifs}}{\text{Vrais négatifs} + \text{Faux positifs}}$$

$$\text{VPP} = \frac{\text{Vrais positifs}}{\text{Vrais positifs} + \text{Faux positifs}}$$

$$\text{VPN} = \frac{\text{Vrais négatifs}}{\text{Vrais négatifs} + \text{Faux négatifs}}$$

Test de libération de sérotonine radiomarquée :

Un SRA classique et un SRA modifié par ajout de FP4 exogène dans le tampon d'incubation des plaquettes ont été réalisés de façon systématique dans notre centre pour chaque patient inclu, le même jour et avec les plaquettes du même donneur.

Le SRA classique a été réalisé selon la procédure décrite par Sheridan et al. (85), avec des modifications mineures (103).

Le SRA-FP4 a été réalisé selon le protocole décrit dans notre étude préliminaire, en rajoutant une étape de pré-incubation des plaquettes avec du FP4 humain (Hyphen BioMed, Neuville-sur-Oise, France) à la concentration de 10 µg/mL pendant 10 minutes à température ambiante avant incubation avec le plasma des patients (103).

Les résultats du SRA classique et du SRA-FP4 ont été considérés positifs si l'activation plaquettaire maximale en présence d'héparine à la concentration de 0 - 0,1 et/ou 0,5 UI/mL était supérieure ou égale à 20%, associée à une inhibition complète en présence d'héparine à la concentration de 10 UI/mL (activation < 20% ou inhibition d'au moins 50% par rapport à l'activation plaquettaire maximale obtenue). A contrario, le résultat a été considéré négatif si l'activation plaquettaire maximale était inférieure à 20% ou en l'absence d'inhibition de l'activation plaquettaire à la concentration de 10 UI/mL (profil d'activation non-héparine dépendant).

Analyse statistique :

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel GraphPad Prism 8.0.1. Des tests de Wilcoxon-Mann-Whitney ont été réalisés pour l'analyse des données, à l'exception de l'analyse des données démographique réalisée à l'aide d'un test de Fisher. Une p-value < 0,05 a été considérée comme statistiquement significative.

Résultats

Population étudiée :

D'Avril 2016 à Juin 2020, 484 patients avec une suspicion de TIH ont bénéficié d'un SRA classique et d'un SRA-FP4 réalisés au sein du service d'Hématologie-Hémostase du CHRU de Tours. Parmi ces patients, 189 ont été exclus de l'étude en raison de données cliniques et/ou biologiques insuffisantes, et 47 autres en l'absence d'anticorps anti-FP4/H détectés (test immunologique négatif).

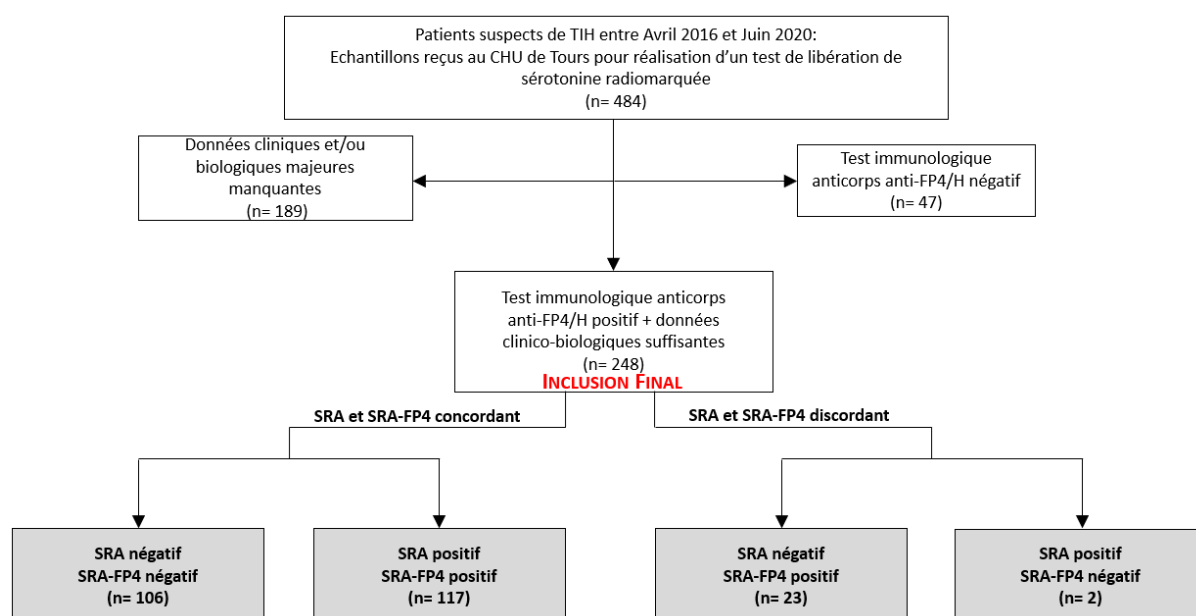


Figure 9. Diagramme d'inclusion des patients

Au final, un total de 248 patients avec un test immunologique positif, en faveur de la présence d'anticorps anti-FP4/H, (Figure n°9) et des données clinico-biologiques suffisantes ont été inclus dans l'étude.

Parmi ces patients, un premier groupe présentait à la fois un SRA classique et un SRA-FP4 négatifs (n = 106), avec un diagnostic de TIH considéré comme exclu, tandis qu'un deuxième groupe présentait un SRA classique et un SRA-FP4 conjointement positifs (n = 117), en faveur du diagnostic de TIH. Enfin, un troisième groupe, représentant un peu moins de 10% des suspicions, montrait des résultats discordants, à savoir un SRA classique négatif mais un SRA-FP4 positif (n = 23), avec un diagnostic de TIH considéré comme indéterminé selon ces

seuls critères. Les principales données démographiques, cliniques et biologiques de ces 3 catégories de patients sont détaillées dans le tableau IV.

		SRA neg SRA-FP4 neg n = 106	SRA pos SRA-FP4 pos n = 117	SRA neg SRA-FP4 pos n = 23
Sexe	Homme/Femme	69/37	75/42	14/9
Age (années)	Médiane [min-max]	64 [18-99]	64 [21-89]	66 [20-89]
Chirurgie < 3 jours	n (%) ND	18 (22%) 24	10 (13%) 39	2 (9.1%) 1
Sepsis	n (%) ND	36 (36.4%) 7	46 (43.4%) 11	10 (50%) 3
Indication de l'héparine	Médicale, n (%)	78 (73.6%)	81 (69.2%)	13 (56.5%)
	• Traitement TV	• 31 (22.2%)	• 37 (31.6%)	• 3 (13%)
	• Prophylaxie TV	• 31 (29.2%)	• 29 (24.8%)	• 3 (13%)
	• Dialyse	• 6 (5.7%)	• 4 (3.4%)	• 3 (13%)
	• ECMO	• 10 (9.4%)	• 11 (9.4%)	• 4 (17,4%)
	Chirurgicale, n (%)	28 (26.4%)	36 (30.8%)	10 (43.5%)
	• CEC	• 8 (7.5%)	• 18 (15.4%)	• 5 (21,7%)
	• Autre	• 20 (18.9%)	• 18 (15.4%)	• 5 (21,7%)
Type d'héparine	HNF, n (%)	56 (52.8%)	65 (55.6%)	16 (69.6%)
	HNF + HBPM, n (%)	20 (18.9%)	28 (23.9%)	3 (13%)
	HBPM, n (%)	30 (28.3%)	24 (20.5%)	4 (17.4%)
NP initiale (G/L)	Médiane [min-max]	205 [54-503] ¹	233.5 [152-447] ⁴	190 [83-1073] ⁷
Nadir NP (G/L)	Médiane [min-max]	72 [8-189] ¹	98.5 [17-134] ⁴	91 [6-404] ⁷
Délai avant nadir (jours)	Médiane [min-max]	8 [1-54] ¹	10.5 [5-28] ⁴	9 [2-26] ⁷
Patients avec remontée NP	Nombre (%)	66 (75.9%) ²	73 (76%) ⁵	18 (78.3%) ⁷
Délai remontée NP (jours)	Médiane [min-max]	5 [1-22] ³	4 [1-30] ⁶	6 [1-12] ⁸
Thrombose	Oui, n (%)	22 (20.8%)	49 (41.9%)	5 (21.7%)
	• Artérielle (A), n (%)	• 1 (0.9%)	• 6 (5.1%)	• 0 (0%)
	• Veineuse (V), n (%)	• 17 (16%)	• 33 (28.2%)	• 2 (8.7%)
	• A + V, n (%)	• 2 (1.9%)	• 1 (0.9%)	• 1 (4,3%)
	• Autres ¹⁰ , n (%)	• 2 (1.9%)	• 9 (7.7%)	• 2 (8.7%)
	Non, n (%)	84 (79.2%)	68 (58.1%)	18 (78.3%)
Autres manifestations	CIVD, n (%)	5 (4.7%)	1 (0.9%)	0 (0%)
	Atypique ¹² , n (%)	3 (2.8%)	3 (2.6%)	3 (13%)
Probabilité clinique de TIH évaluée (4Ts score)	Faible n (%)	19 (17.9%)	3 (2.6%)	7 (30.4%)
	Intermédiaire, n (%)	70 (66%)	58 (49.6%)	7 (30.4%)
	Élevée, n (%)	5 (4.7%)	38 (32.5%)	9 (39.2%)
	Non définie ¹¹ , n (%)	12 (11.2%)	18 (15.4%)	0 (0%)
¹ Calculé sur 30 patients, ² calculé sur 87 patients, ³ calculé sur 53 patients, ⁴ Calculé sur 32 patients, ⁵ calculé sur 97 patients, ⁶ calculé sur 66 patients, ⁷ Calculé sur 23 patients, ⁸ calculé sur 17 patients, ¹⁰ circuit (dialyse ou ECMO) et thrombose de cathéter, ¹¹ probabilité clinique de TIH non-évaluée après CEC ou ECMO, ¹² manifestation clinique atypique (saignement, nécrose ...) CEC : circulation extra-corporelle ; CIVD : coagulation intravasculaire disséminé ; ECMO : extracorporeal membrane oxygenation ; HBPM : héparine de bas poids moléculaire ; HNF : héparine non fractionnée ; n : nombre ; ND : non-déterminé ; NP : numération plaquettaire ; TIH : thrombopénie induite par l'héparine				

Tableau IV. Données démographiques, cliniques et biologiques des 248 patients inclus

Aucune différence statistiquement significative n'est retrouvée concernant la répartition homme/femme, l'âge médian, l'existence d'une chirurgie dans les 3 jours précédant la suspicion, la présence d'un sepsis, le type d'héparine administrée, la numération plaquettaire (NP) initiale, le nadir de la NP, le délai avant d'atteindre le nadir, la proportion de patients avec une remontée complète (150 G/L) de la NP et le délai avant remontée de la NP.

En revanche, dans le groupe de patients SRA classique négatif/SRA-FP4, la proportion de patients sous héparine pour ECMO, dialyse ou CEC semblait supérieure par rapport aux deux autres groupes bien que non statistiquement significative.

De façon intéressante, dans le groupe de patients SRA classique négatif/SRA-FP4 positif, bien que non statistiquement significatif, la probabilité clinique évaluée semblait plus équitablement répartie entre les risques faible, modéré et élevé, tandis qu'une majorité de patients présentaient un score modéré dans les deux autres groupes. Les patients de ce même groupe semblaient également moins sujets aux thromboses que ceux du groupe SRA classique positif/SRA-FP4 positif (40,7% vs 21,7%, $P = 0,1000$), avec une tendance à développer plus de manifestations atypiques (13% vs 2,6%, $P = 0,0559$), bien que ces différences n'étaient pas statistiquement significatives.

Effets du FP4 à 10 µg/mL sur l'activation plaquettaire au cours du SRA :

Au cours de cette étude, nous avons comparé l'activation plaquettaire obtenue au cours du SRA classique et du SRA-FP4 pour tous les patients inclus, répartis en différents groupes selon les résultats de ces tests.

Pour les patients présentant un SRA classique positif, l'addition de FP4 à 10 µg/mL au cours du SRA-FP4 a permis de potentialiser l'activation plaquettaire induite par les anticorps de TIH, avec, en moyenne, une activation maximale à 77,3% contre 58,4% en SRA classique ($P < 0,0001$) (Figure n°10 A et B). De façon intéressante, cette potentialisation de l'activation plaquettaire était accompagnée d'un décalage du maximum d'activation, observé le plus souvent en présence d'1 UI/mL d'HNF au cours du SRA-FP4 contre 0,1 UI/mL d'HNF au cours du SRA classique.

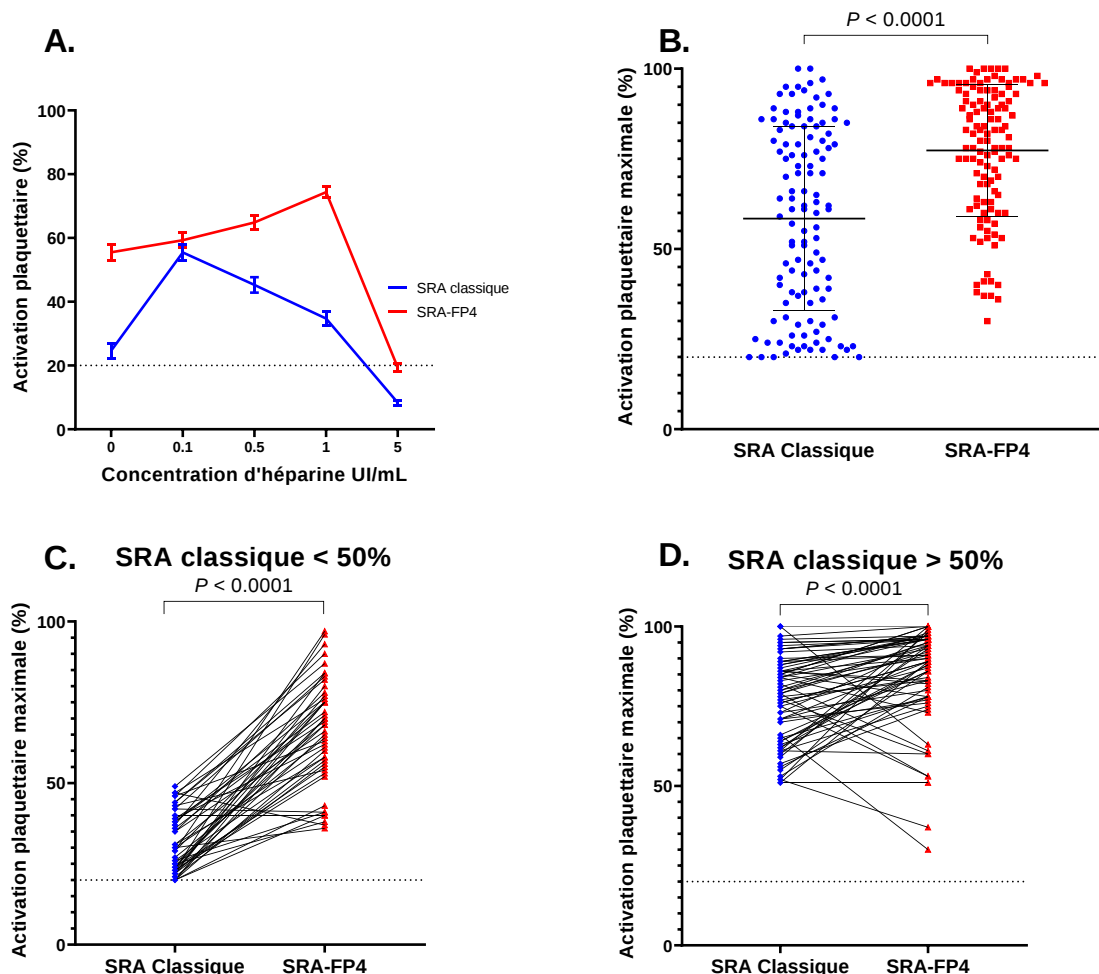


Figure 10. Comparaison de l'activation plaquettaire au cours du SRA classique et du SRA-FP4 chez les patients avec un SRA classique positif

Activation plaquettaire observée au cours du SRA et du SRA-FP4 pour les échantillons avec un SRA classique positif : (A) courbes d'activation plaquettaire en absence et en présence d'HNF à 0,1 – 0,5 – 1 et 10 UI/mL (moyenne $\pm$ SEM) ($n = 117$) ; (B) maximum d'activation plaquettaire (%), individualisé pour chaque patient et moyenne $\pm$ SD) ($n = 117$). Comparaison du maximum d'activation plaquettaire obtenue en absence et en présence de FP4 à 10 μ g/mL pour les échantillons ayant induit une activation maximale en SRA classique inférieure à 50% ($n = 47$) (C) et supérieure à 50% ($n = 70$) (D) (%), individualisé pour chaque patient). P value calculée avec un test de Mann-Whitney.

Dans un deuxième temps, nous avons comparé l'activation plaquettaire maximale obtenue en SRA classique et en SRA-FP4, pour ces mêmes échantillons, divisés en deux groupes selon le degré de positivité obtenu en SRA classique (maximum < 50% ou > 50%). Pour les 47 échantillons avec une activation maximale inférieure et 50% en SRA classique, celle obtenue au cours du SRA-FP4 était supérieure à celle obtenue au cours du SRA classique, à l'exception de deux patients avec une activation maximale stable et d'un patient avec un

maximum plus faible (Figure n°10C). L'activation maximale moyenne en SRA-FP4 était de 65,8% versus 31,2% au cours du SRA classique, soit deux fois plus élevée. En revanche, pour les 70 patients dont l'activation maximale était supérieure à 50% au cours du SRA classique, la potentialisation de l'activation plaquettaire à l'échelle individuelle au cours du SRA-FP4 était moins marquée (Figure n°10D), même si la moyenne observée en SRA-FP4 était de 85,1% versus 75,8% en SRA classique. De façon étonnante, l'activation plaquettaire était même inférieure en SRA-FP4 pour 11 patients, bien que toujours supérieure au seuil de positivité du test de 20%.

Pour 23 patients présentant un SRA classique négatif, l'ajout de FP4 a permis de positiver le SRA (Figure n°11A). Chez tous ces patients, une très nette augmentation du maximum d'activation plaquettaire était observable (Figure n°11B), avec une moyenne à 10,7% en SRA classique versus 50,4% en SRA-FP4 ($P < 0,0001$).

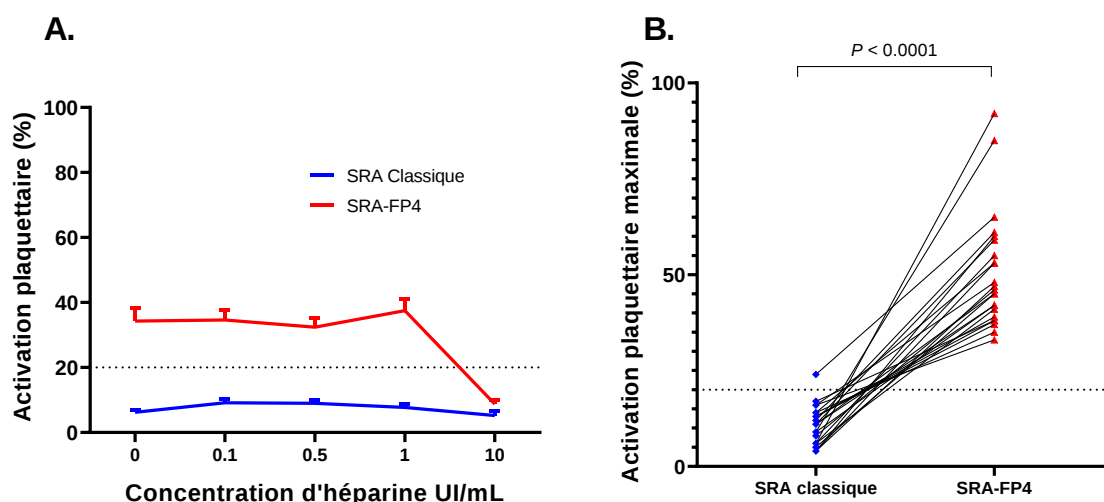


Figure 11. Comparaison de l'activation plaquettaire au cours du SRA classique et du SRA-FP4 chez les patients avec un SRA classique négatif mais un SRA-FP4 positif

Activation plaquettaire observée au cours du SRA et du SRA-FP4 pour les 23 échantillons avec un SRA classique positif : (A) courbe d'activation plaquettaire en absence et en présence d'HNF à 0,1, 0,5, 1 et 10 UI/mL (Moyenne $\pm$ SEM); (B) Maximum d'activation plaquettaire en absence et présence de FP4 10 μ g/mL (% individualisé pour chaque patient). P value calculé avec un test de Mann-Whitney.

Chez les 106 autres patients avec un SRA classique négatif, l'ajout de FP4 à 10 μ g/mL n'a pas permis de rendre un SRA positif. Parmi ces patients, deux sous-groupes se distinguent : un premier sous-groupe de 75 patients avec une activation plaquettaire inférieure au seuil de

20% en SRA classique, et un deuxième, avec une activation plaquettaire supérieure à 20% mais non-héparine dépendante, c'est-à-dire non-inhibée en excès d'héparine.

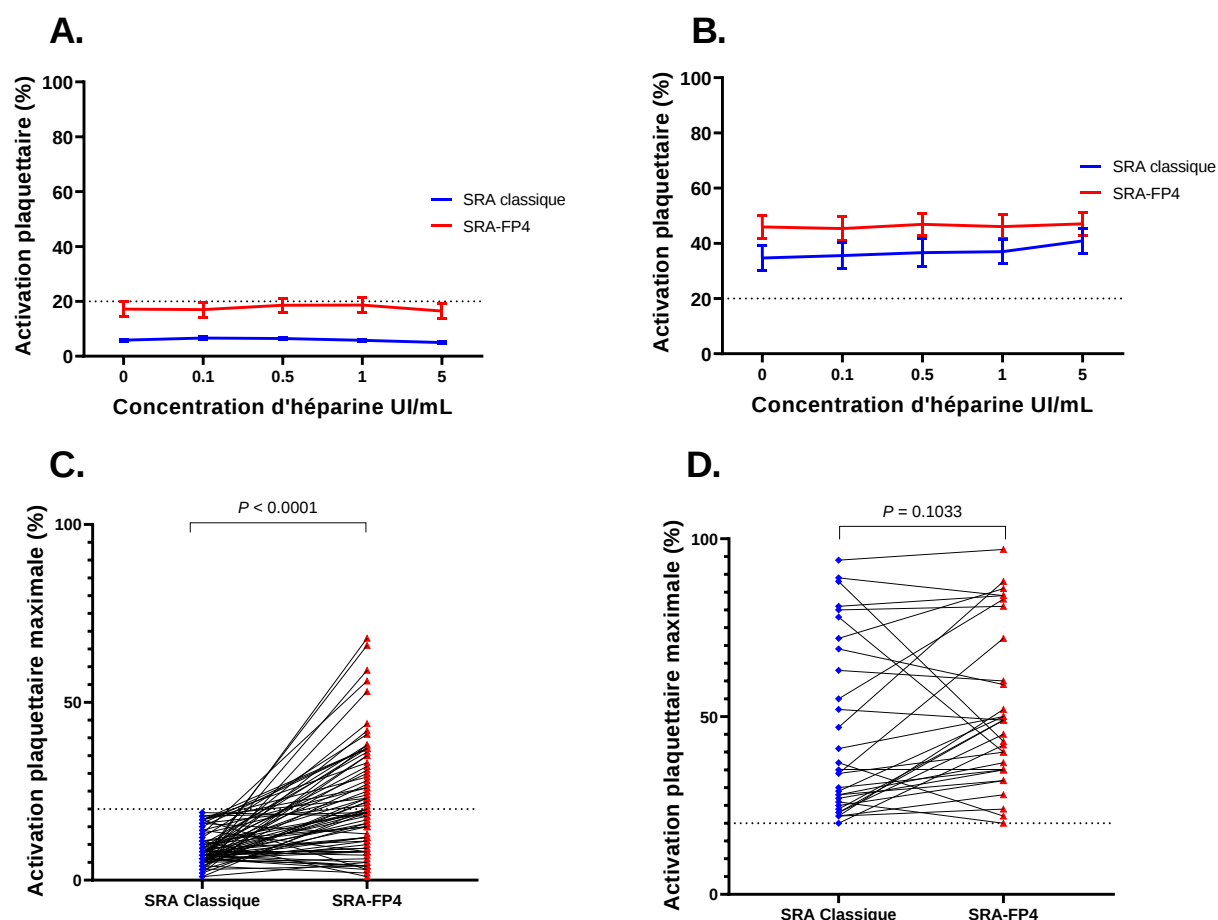


Figure 12. Comparaison de l'activation plaquettaire au cours du SRA classique et du SRA-FP4 chez les patients du groupe SRA classique négatif/SRA-FP4 négatif

Activation plaquettaire observée au cours du SRA et du SRA-FP4 pour les 106 échantillons avec un SRA classique négatif : (A) courbes d'activation plaquettaire en absence et en présence d'HNF à 0,1- 0,5, -1 et 10 UI/mL (moyenne $\pm$ SEM) en absence et en présence de FP4 10 μ g/mL dans le sous-groupe < 20% (A) (n = 75) et le sous-groupe avec activation non-héparine dépendante (B) (n = 31). Comparaison du maximum d'activation plaquettaire obtenu en absence et en présence de FP4 à 10 μ g/mL pour les échantillons du sous-groupe < 20% (C) (n = 75) et avec une activation non-héparine dépendante (n = 31) (D) (%), individualisé pour chaque patient). P value calculé avec un test de Mann-Whitney.

Dans ces deux sous-groupes, l'ajout de FP4 à 10 μ g/mL au cours du SRA a également entraîné une augmentation de l'activation plaquettaire mesurée (Figures n° 12A et 12B). D'un point de vue individuel, l'activation maximale mesurée chez les patients avec un SRA

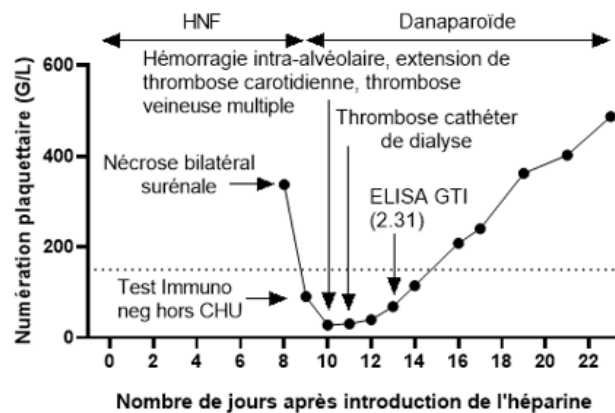
classique < 20% dépassait ce seuil après ajout de FP4 pour 31 patients (41,3%) (Figure n°12C). Cependant, cette activation plaquettaire était associée à des profils d'activation héparine-indépendante. Chez les 31 patients présentant un profil d'activation héparine-indépendante en SRA classique, l'activation plaquettaire maximale était très nettement potentialisée chez 4 patients (12,9%), et, de façon surprenante, fortement diminuée chez 4 autres patients (12,9%) (Figure n°12D). L'activation plaquettaire moyenne était de 46,26% versus 36,94%. Dans l'ensemble des cas, le profil d'activation plaquettaire est resté héparine-indépendant, donc non en faveur d'une TIH.

Classification des cas présentant un SRA classique et un SRA-FP4 discordants :

Dans la suite de ce travail, nous nous sommes particulièrement intéressés aux patients présentant une discordance entre le SRA classique et le SRA-FP4, à savoir les 23 patients avec un SRA négatif et un SRA-FP4 positif, ainsi que les 2 présentant un SRA classique positif mais un SRA-FP4 avec un profil d'activation héparine-indépendant (non-inhibée en excès d'héparine). Les 23 cas de patients avec un SRA négatif et un SRA-FP4 positif ont tous été réévalués indépendamment par 2 experts grâce à des fiches synthétiques rédigées pour chaque cas, et comprenant l'ensemble des données clinico-biologiques à l'exception des résultats du SRA et du SRA-FP4. Un troisième avis d'expert a été sollicité dans un des cas en raison d'une discordance en termes de classification. Selon ces experts, le diagnostic de TIH a été considéré comme probable pour 11 patients (47,8%), possible pour 9 autres patients (39,1%), et peu probable pour les 3 derniers (13,1%). Deux exemples de fiches ayant permis la classification de ces 23 patients sont donnés dans la figure 13 (A : TIH probable, B : TIH peu probable).

A.

Numéro du patient : 10
 Sexe : Femme Age : 60
 Etat infectieux : Non Chirurgie dans les 72h : Non
 Médicaments thrombopéniants reçus par le patient : Pravastatine
 Indication de l'héparinothérapie : Thrombose artérielle secondaire à une dissection de la carotide
 Type d'héparine reçu : HNF
 Probabilité clinique évaluée : Elevée (6)



Numération plaquettaire au début de l'héparinothérapie : 337 G/L
 Numération plaquettaire à la suspicion : 91 G/L Délai avant suspicion : 9 jours
 Nadir de la numération : 91 G/L Délai du nadir : 9 jours
 Pourcentage de chute de la NP au moment de la suspicion : 73%

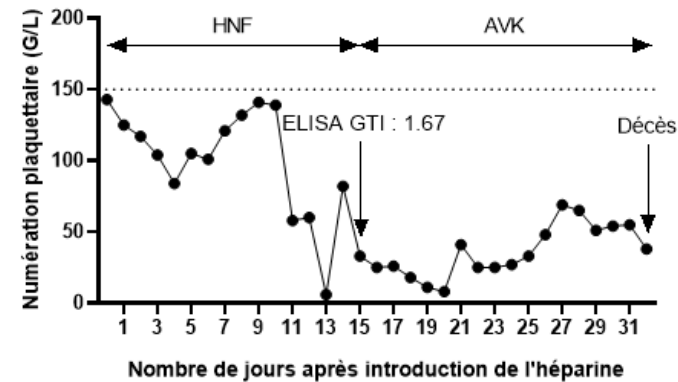
Complication(s) thrombotique(s) : Thrombose aorte abdominale, thrombose veineuse multiple, extension de thrombose carotidienne, thrombose de cathéter de dialyse
 Manifestation(s) atypique(s) : Nécrose bilatérale surrénale, hémorragie intra-alvéolaire
 Saignements : Non CIVD : Non

Test immunologique : ELISA (DO : 2.31)
 Anticoagulation alternative : Danaparoïde sodique
 Correction de la numération plaquettaire : 7 jours

Autre(s) renseignement(s) : SAPL

B.

Numéro du patient : 21
 Sexe : Homme Age : 72
 Etat infectieux : Choc septique sur pyélonéphrite Chirurgie dans les 72h : Non
 Médicaments thrombopéniants reçus par le patient : Tygécycline, Céfépime
 Indication de l'héparinothérapie : Dialyse
 Type d'héparine reçu : HNF
 Probabilité clinique évaluée : Faible (3)



Numération plaquettaire au début de l'héparinothérapie : 143 G/L
 Numération plaquettaire à la suspicion : 33 G/L Délai avant suspicion : 16 jours
 Nadir de la numération : 6 G/L Délai du nadir : 13 jours
 Pourcentage de chute de la NP au moment de la suspicion : 76.9%

Complication(s) thrombotique(s) : Non
 Manifestation(s) atypique(s) : Non
 Saignements : Non CIVD : Non

Test immunologique : ELISA GTI (1.67)
 Anticoagulation alternative : AVK (sans relai)
 Correction de la numération plaquettaire : Oui, 12 jours

Autre(s) renseignement(s) : Syndrome d'activation macrophagique, absence de notion d'exposition récente à l'héparine. Introduction de l'héparine suite à la pyélonéphrite nécessitant des dialyses.

Figure 13 Exemple d'évolution de la numération plaquettaire d'un patient conclu TIH probable (A) et peu probable (B)

Les principales données relatives aux 23 patients avec un SRA négatif et un SRA-FP4 positif, ainsi que des deux patients avec un SRA positif et un SRA-FP4 présentant un profil d'activation non-héparine dépendant ont été synthétisées dans le tableau V.

Parmi les 11 patients considérés comme TIH probable, 9 d'entre eux présentaient une probabilité clinique élevée (81,8%), et 2 une probabilité modérée (18,2%). Une chute de la numération plaquettaire supérieur à 50% au diagnostic était présente dans 8 cas (72,7%), et était proche de 50% dans les 3 autres (27,2%). Dans 4 cas (36,4%) la présence de thrombose a pu être observée et dans 2 cas (18,2%) la présence de manifestations cliniques atypiques. L'héparinothérapie a été remplacée dans la totalité des cas, majoritairement par du danaparoïde sodique, et une correction totale (NP > 150 G/L) de la numération plaquettaire est survenue chez les 11 patients, dans un délai médian de 3 jours. Dans 7 cas (63,6%), une autre cause possible de thrombopénie était présente, majoritairement d'origine infectieuse.

En revanche, parmi les 9 patients considérés comme TIH probable, 5 d'entre eux présentaient une probabilité clinique modérée (55,6%), et 4 une probabilité faible (44,4%). Une chute de la numération plaquettaire supérieur à 50% au diagnostic était présente dans 4 cas (44,4%). Dans un seul cas (11,1%) la présence de thrombose et la présence de manifestations cliniques atypiques ont pu être observées. L'héparinothérapie a été remplacé dans 8 des 9 cas (88,9%), majoritairement par du danaparoïde sodique, et une correction totale de la numération plaquettaire est survenue chez 5 patients (55,6%), dans un délai médian de 6,5 jours, dont le patient n'ayant pas reçu d'anticoagulation alternative. Dans 4 cas (44,4%), une autre cause possible de thrombopénie était présente, là aussi majoritairement d'origine infectieuse.

Parmi les 3 patients considérés comme TIH peu probable, la totalité présentaient une probabilité clinique faible. Une chute de la numération plaquettaire supérieur à 50% au diagnostic était présente dans la totalité des cas. Dans aucun cas la présence de thrombose et la présence de manifestation cliniques atypiques n'a été observée. L'héparinothérapie a été remplacée dans la totalité des cas, et une correction totale de la numération plaquettaire n'est survenue que chez un seul patient (33,3%), dans un délai de 12 jours. Dans les 3 cas, une autre cause possible de thrombopénie était présente.

Enfin, Parmi les 2 patients considérés comme TIH avec un profil d'activation non-héparine dépendant, l'un présentait une probabilité clinique élevée, tandis que le second présentait une probabilité modérée. Une chute de la numération plaquettaire de 75,6% au diagnostic était présente pour l'un et non renseigné pour l'autre. Dans un des cas la présence de thrombose a

été observée. L'héparinothérapie a été remplacée dans les 2 des cas par l'aragtroban, et une correction totale de la numération plaquettaire est survenue que chez un patient, dans un délai de 5 jours. Dans un des cas, une autre cause possible de thrombopénie, de nature infectieuse était présente.

N°	Héparine	Indication	Probabilité clinique évaluée	Thrombose	Manifestation atypique	ELISA IgG Spécifique ² (DO)	Chute de la NP (%), délai (j)	Anticoagulation alternative	Correction de la NP ⁴ (O/N), délai (j)	Autre cause de thrombopénie
TIH Probable (n = 11)										
1	HNF	CEC	Elevée	N	N	3,03	46% ; 13	danaparoïde	O (1)	N
2	HBPM	Chirurgicale	Modérée (5)	N	Plaques Erythémateuse	1,66	47,3% ; 14	danaparoïde	O (3)	Cholécystite
3	HNF	CEC	Elevée	N	N	2,08	61,6% ; 14	danaparoïde	O (2)	Sepsis ¹
4	HNF/HBPM	CEC	Elevée	N	N	3,20	46,9% ; 8	danaparoïde	O (4)	Infection sur valve
5	HNF	CEC	Elevée	N	N	0,44	58% ; 11	danaparoïde	O (3)	Infection urinaire
6	HBPM	Préventif	Elevée (6)	EP	N	2,90	66,3% ; 12	danaparoïde	O (3)	Sepsis ¹
7	HBPM	Curatif	Elevée (7)	N	N	1,78	76,9% ; 13	danaparoïde	O (6)	N
8	HNF	Chirurgicale	Elevée (6)	Veine Cave	N	ND ³	78,2% ; 8	danaparoïde	O (3)	N
9	HNF	COVID et ECMO	Elevée	Filtre de l'ECMO	N	2,35	69,9% ; 10	argatroban	O (10)	COVID, ECMO
10	HNF	Curatif	Elevée (6)	Multiple	Nécrose surrénale, hémorragie alvéolaire	2,31	73% ; 9	danaparoïde	O (7)	SAPL
11	HNF	Chirurgicale	Modérée (4)	N	N	2,29	70,5% ; 2	argatroban	O (2)	NR
TIH Possible (n = 9)										
12	HNF	Dialyse	Modérée (4)	N	N	1,67	67,4% ; 14	danaparoïde	N	Sd hépatorénal
13	HNF	CEC	Modérée	N	N	2,66	35,2% ; 8	NR	O ¹	Sepsis ¹
14	HNF	Préventif	Modérée (4)	O ¹	N	1,73	36,7% ; 24	danaparoïde	O (6)	N
15	HNF	Chirurgicale	Modérée (4)	N	Hémarthrose sur PTG	2,19	28% ; 9	danaparoïde	O (6)	N
16	HNF	COVID et ECMO	Modérée	N	N	1,86	71,3% ; 9	argatroban	N	COVID, ECMO
17	HNF/HBPM	Chirurgicale	Faible (2)	N	N	3,05	36,2% ; 7	danaparoïde	N	N
18	HBPM	Curatif	Faible (3)	N	N	2,80	41,9% ; 26	apixaban	O (12)	NR
19	HNF	Préventif	Faible (3)	N	N	2,80	65,4% ; 16	argatroban	N	Sepsis ¹
20	HNF/HBPM	Chirurgicale	Faible (2)	N	N	1,99	73,4% ; 6	Non	O (7)	N
TIH Peu probable (n = 3)										
21	HNF	Dialyse	Faible (3)	N	N	1,67	76,9% ; 16	AVK	O (12)	Choc septique, SAM
22	HNF	ECMO	Faible	N	N	1,40	62,3% ; 6	argatroban	N	ECMO
23	HNF	ECMO	Faible	N	N	0,79	63,9% ; 9	danaparoïde	N	ECMO
Profil d'activation SRA-FP4 héparine indépendant (n = 2)										
24	HNF	Chirurgicale	Elevée (6)	Fémorale	N	2,12	75,6% ; (7)	argatroban	N	Sepsis
25	HNF	CEC	Modérée	N	N	1,28	NR	argatroban	O (5)	N

¹Absence de précision, ²ELISA HAT45G, Immucor GTI diagnostics, Waukesha USA, ³Acustar 1,80, ⁴Correction totale de la numération plaquettaire (>150G/L)
EP : embolie pulmonaire, N : non, ND : non déterminé, NR : non renseigné, O : oui, PTG : prothèse totale de genou, SAPL : syndrome des anti-phospholipides, SAM : Syndrome d'activation macrophagique, Sd : syndrome

Tableau V. Principales caractéristiques cliniques et biologiques des patients présentant une discordance de résultats entre le SRA et le SRA FP4

Comparaison des titres d'IgG anti-FP4/H selon le profil de positivité des SRA :

Lors de nos travaux préliminaires publiés en 2017 dans le British Journal of Haematology, nous avons observé un titre d'anticorps IgG anti-FP4/H en ELISA inférieur chez les patients présentant un SRA classique négatif et un SRA-FP4 positif en comparaison aux patients avec un SRA classique positif, et non-significativement différent de celui observé chez les patients avec un SRA classique et un SRA-FP4 tous deux négatifs (103). Au cours de cette étude, nous avons à nouveau effectué cette comparaison entre les trois groupes de patients afin d'évaluer la reproductibilité de ces résultats, initialement obtenus sur un très faible effectif de patients. (Figure n°14). Les 248 échantillons de l'étude n'ayant pas tous été testés avec le même test

immunologique, nous avons effectué cette comparaison sur le test le plus utilisé au cours de cette étude, à savoir le kit HAT45G (Immucor). La figure 14 montre que le titre d'anticorps anti-FP4/H mesuré pour le groupe SRA classique positif/SRA-FP4 positif (densité optique, DO médiane : 2,45 ; intervalle 0,75-3,70) et le groupe SRA classique négatif/SRA-FP4 positif (DO médiane : 2,13 ; intervalle 0,44-3,20) était significativement plus élevé que celui du groupe SRA classique négatif/SRA-FP4 négatif (DO médiane : 1,10 ; intervalle 0,42-2,90). En revanche, la différence de DO n'était pas significative ($p = 0,0597$) entre les deux premiers groupes. Nous ne retrouvons donc pas la tendance observée lors de l'étude préliminaire.

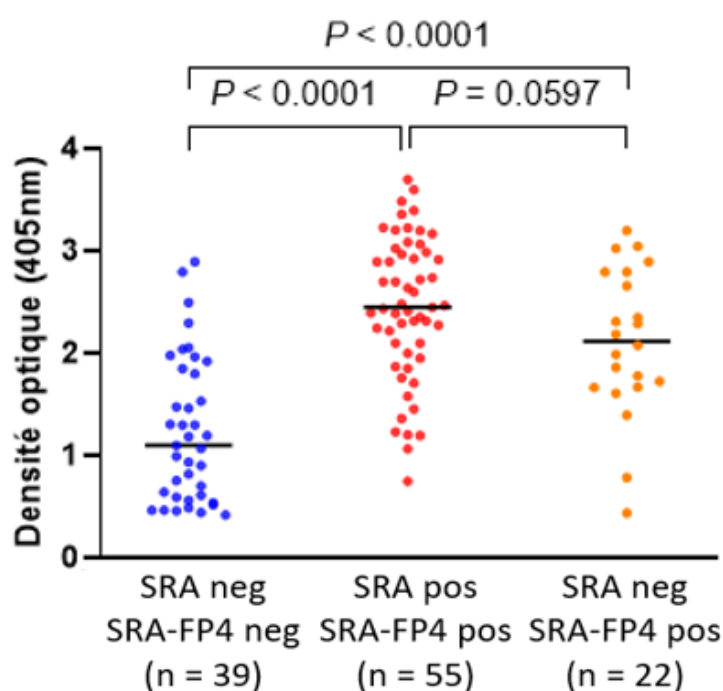


Figure 14. Comparaison de taux d'IgG dirigés contre le FP4 en fonction des différents groupes

Taux d'IgG spécifique anti-FP4 mesuré chez les patients suspects de TIH par méthode ELISA (HAT45G, Immucor). Les données sont exprimées en densité optique (individualisé pour chaque patient) avec la médiane, classées en trois groupes en fonction des résultats du SRA. Les P values ont été calculés par un test de Mann-Whitney.

Calcul des performances du SRA classique et du SRA-FP4 :

Il est important de rappeler ici que pour les patients présentant un SRA classique et un SRA-FP4 négatifs ($n = 106$), le diagnostic de TIH a été considéré comme exclu en raison de la concordance des résultats des deux tests fonctionnels. De la même façon, lorsque le SRA classique et le SRA-FP4 étaient tous deux positifs ($n = 117$), le diagnostic de TIH a été retenu.

Au total, dans notre cohorte de 248 patients, un diagnostic de TIH a donc été retenu pour 139 patients, et exclu pour 110 autres patients. Cette classification dichotomique nous a permis de calculer la sensibilité, la spécificité, les VPN et les VPP du SRA classique et du SRA-FP4, selon les données récapitulées dans le tableau VI. La sensibilité du SRA-FP4 était de 98,56% (IC 95% 97,81-99,32) et la spécificité de 97,27% (IC 95% 96,24-98,30). La VPP était de 97,86% (IC 95% 96,94-98,77) et la VPN de 98,17% (IC 95% 97,31-99,02). Concernant le SRA classique, la sensibilité était de 85,61% (IC 95% 83,39-87,84), sa spécificité de 100% (IC 95% 100-100), sa VPP de 100% (IC 95% 100-100) et sa VPN de 84,62% (IC 95% 82,33-86,90).

Le SRA-FP4 apparaît donc plus sensible que le SRA classique pour confirmer un diagnostic de TIH, au prix d'une légère baisse de spécificité. De même, sa VPP est légèrement plus faible, en faveur d'une meilleure VPN.

A.	Résultats SRA-FP4	
	Positif	Négatif
TIH	137	2
Non-TIH	3	106

B.	Résultats SRA classique	
	Positif	Négatif
TIH	119	20
Non-TIH	0	109

Tableau VI. Tableau de contingence des résultats obtenus en SRA-FP4 (A) et en SRA classique (B) selon le diagnostic retenu

Discussion

Au cours de cette étude, nous avons confirmé l'impact majeur des concentrations de FP4 sur la capacité des anticorps de TIH à activer les plaquettes. En effet, au cours du SRA-FP4, l'addition de FP4 à la concentration de 10µg/mL dans le tampon d'incubation des plaquettes a permis de potentialiser l'activation plaquettaire induite par les anticorps de TIH en comparaison au SRA classique. Ceci s'est observé de façon très nette chez les patients pour lesquels l'activation plaquettaire était modérée en SRA classique, comprise entre 20 et 50%, puisque celle-ci passait en moyenne de 58,4% à 77,3% en présence de FP4. De même, pour 23 patients, l'ajout de FP4 au cours du SRA a permis de détecter des anticorps anti-FP4/H activateurs des plaquettes non détectés au cours du SRA classique.

Cet effet potentialisateur du FP4 sur l'activation plaquettaire induite par les anticorps anti-FP4/H explique pourquoi les situations associées à une libération massive de FP4, telles que la chirurgie cardiaque avec CEC, les traumatismes sévères ou bien les assistances circulatoires, soient associées à un risque particulièrement élevé de développer une TIH (5). En effet, si un ratio FP4/H de 1 :1 ou 2 :1 est souvent décrit comme optimal pour former des complexes antigéniques en solution, une valeur beaucoup plus élevée a été rapportée chez la souris, de l'ordre de 20 :1 (108). Le même ratio a été proposé par Krauel et al., qui ont étudié *in vitro* la liaison du FP4 aux plaquettes humaines à différents rapports de concentrations en héparine et FP4 (109). Ce résultat est très en faveur d'une contribution des GAGs endogènes exprimés à la surface des cellules pour la formation des complexes antigéniques reconnus par les anticorps de TIH. En ce sens, Rauova et al. ont également démontré que la liaison des anticorps anti-FP4/H aux plaquettes ne nécessitait pas d'héparine à condition que la densité de FP4 à la surface des plaquettes soit suffisante et que les chondroïtines sulfates plaquettaires soient présents (5).

Lors de l'étude préliminaire de notre équipe, nous avons également suggéré que la potentialisation de l'activation plaquettaire observée en présence de FP4 à 10µg/mL pouvait améliorer les performances diagnostiques du SRA, puisque cette stratégie permettait de rendre un résultat positif chez environ 30% des patients avec un SRA classique négatif (103). Dans cette étude, nous confirmons la capacité du SRA-FP4 à détecter des anticorps anti-FP4/H activateurs non-détectés en l'absence de FP4 exogène puisque 18% des échantillons négatifs

en SRA standard étaient positifs en SRA-FP4, avec un diagnostic de TIH considéré comme plausible dans 20 des 23 cas (87%).

En ce sens, nous retrouvons une sensibilité du SRA-FP4 proche de 100% alors que celle du SRA classique était de 85,61% au cours de notre étude, une valeur proche de celle habituellement décrite dans la littérature (88-95%) (84, 85, 86, 87).

Depuis quelques années, d'autres équipes ont également mis en avant l'intérêt du FP4 exogène au cours des tests fonctionnels pour confirmer le diagnostic de TIH. En effet, Padmanabhan et ses collègues ont développé une méthode basée sur la détection de P-sélectine (CD62P) en cytométrie en flux (PEA, pour *P-selectin expression assay*), nécessitant l'addition de FP4 à la concentration de 37,5µg/mL (98). Ce test a fait l'objet de plusieurs publications visant à évaluer ses performances en pratique clinique, et la dernière en date fait état d'une sensibilité de 88%, donc très proche de celle du SRA classique, avec cependant une capacité du PEA à détecter les anticorps de TIH plus précocement que le SRA classique lors de l'étude de prélèvements itératifs chez des patients avec une suspicion de TIH (110, 111, 112, 113). Auparavant, l'équipe de l'Université de McMaster, au Canada, avait également montré que l'ajout de FP4 sensibilisait la détection de faibles titres d'anticorps anti-FP4/H au cours d'un SRA modifié, effectué en l'absence d'héparine mais en présence de concentrations très élevées de FP4 (50 à 100µg/mL) (114). Un travail récent de la même équipe s'est intéressé à l'apport réel de ce SRA-FP4 pour le diagnostic des TIH sur une cohorte de 430 suspicions, parmi lesquelles 35 cas de TIH avaient été confirmés grâce au SRA classique, et conclue qu'un seul cas supplémentaire de TIH a été confirmé grâce au SRA-FP4 (115). Ces résultats mettent potentiellement en avant des performances variables du SRA classique selon les laboratoires et la méthodologie employée, et par conséquent un intérêt variable du FP4 exogène pour sensibiliser ce SRA.

Très récemment, cette même équipe Canadienne a comparé les performances du PEA, du SRA-FP4 Canadien (réalisé sans héparine mais avec du FP4 à 50-100 µg/mL) et du SRA-FP4 basé sur notre méthodologie (en présence d'HNF, et de FP4 à 10 µg/mL), appelé SRA-FP4/héparine dans cette étude, sur deux cohortes, l'une comprenant 84 suspicions de TIH et l'autre 101 cas de TIH parfaitement caractérisés. Ces travaux ont conclu à une meilleure sensibilité des deux SRA-FP4 par rapport au PEA, estimée à 65,8% seulement pour ce test, tandis qu'elles variaient entre 94,7% et 100% pour le SRA-FP4/héparine et 92,1% et 100% pour le SRA-FP4 Canadien (116). Ces données, combinées avec celles de notre étude,

suggèrent donc que le SRA-FP4 tel que réalisé au CHRU de Tours (SRA-FP4/héparine) est actuellement le test fonctionnel le plus sensible pour détecter des anticorps-anti-FP4/H potentiellement pathogènes.

Néanmoins, au cours de notre étude, cette augmentation de sensibilité du SRA-FP4 en comparaison au SRA classique s'est faite au prix d'une légère baisse de spécificité, estimée à 97,27% contre 100% pour le SRA classique. Ces résultats traduisent le fait que, parmi les patients avec un SRA-FP4 positif et un SRA classique négatif, 3 cas (soit 13%) ne présentaient pas les critères d'une TIH selon l'avis de nos deux experts. Dans leur étude de 2021, les Canadiens rapportaient quant à eux une spécificité du SRA-FP4/héparine très proche de la nôtre, comprise entre 96,6 et 100% selon la cohorte étudiée, tandis qu'elle variait entre 84,7% et 98,4% pour le SRA-FP4 Canadien (116).

Un manque de spécificité de notre SRA-FP4 induit un risque de surdiagnostic de TIH, une situation problématique, car elle entraîne l'utilisation d'anticoagulants non-hépariniques, coûteux d'une part, et qui exposent à un risque de saignements non-négligeable d'autre part (117). Une évaluation minutieuse de la probabilité clinique de TIH, et la sollicitation d'un expert pour juger de la pertinence de réaliser un SRA-FP4, pourraient être utiles afin de limiter le risque de faux positif du SRA-FP4. En effet, les 3 cas observés au cours de notre étude présentaient un score faible, qui était cependant difficilement évaluable pour deux d'entre-eux en raison de la présence d'une ECMO. Une autre option séduisante pour limiter la perte de spécificité du SRA-FP4 serait d'augmenter la valeur seuil de positivité du test, actuellement définie à 20% par transposition du SRA classique. Si l'augmentation du seuil à 40% permettrait en effet d'écarter 2 des 3 faux positifs, celle-ci s'accompagnerait en revanche d'une baisse de la sensibilité du test à 93,53%, ce qui limite tout l'intérêt de cette démarche.

Notre étude présente plusieurs limites majeures, en premier lieu son caractère rétrospectif, qui a lourdement complexifié l'analyse des données collectées prospectivement, puisque certaines informations d'intérêt étaient manquantes, et n'ont pas pu être fournies à posteriori, ce qui explique pourquoi plus de la moitié des patients initialement éligibles à une inclusion ont été exclus de cette étude. Par ailleurs, le SRA étant considéré comme le gold standard pour la confirmation du diagnostic de TIH, la remise en cause de ses performances est extrêmement complexe, et a nécessité le recours à une stratégie de classification des suspicions sur la base de critères clinico-biologiques possiblement discutables. Dans notre étude, nous avons fait appel à deux experts ayant une grande expérience dans la gestion des suspicions de TIH afin de statuer sur la probabilité du diagnostic chez les patients présentant des résultats discordants

entre le SRA classique et le SRA-FP4. Cependant, en raison du nombre important de dossiers dans les deux autres groupes de patients, nous n'avons pas pu appliquer cette stratégie pour les cas avec un SRA classique et un SRA-FP4 conjointement positifs ou négatifs, considérés comme des TIH avérées ou exclues, devant la concordance des deux SRA. Ce manque d'homogénéité de traitement des dossiers constitue un biais pour le calcul des performances du SRA et du SRA-FP4, ajouté au fait que nous avons arbitrairement considéré comme des TIH les cas classés « probables ou possibles ». Une évaluation prospective des performances du SRA classique et du SRA-FP4, en définissant au préalable des critères permettant de conclure à une TIH indépendamment du résultat des tests fonctionnels, permettrait de se soustraire de ce biais, tout en s'affranchissant des problèmes de recueil des données. A ce titre, Warkentin et al. ont récemment proposé les 3 critères suivants pour conclure au diagnostic de TIH chez les patients avec un SRA classique négatif : tableau clinique compatible avec le diagnostic de TIH (score des 4Ts ≥ 4), ELISA positif (DO ≥ 1.00) et SRA-FP4 positif (115). Selon cette définition, seuls 13 des 23 patients de notre étude avec un SRA-FP4 isolément positif étaient des vraies TIH. Cependant, cette classification présente aussi des limites, car les kits ELISA commercialisés ont des seuils de positivité variables, parfois même selon le lot utilisé, et bien que moins fréquentes, de véritables TIH sont décrites chez des patients ayant un faible titre d'anticorps anti-FP4/H, ce qui explique d'ailleurs pourquoi l'augmentation du seuil de positivité des tests ELISA n'est pas recommandé en pratique clinique (118).

Nos travaux préliminaires suggéraient un impact du titre d'anticorps anti-FP4/H sur le profil d'activation plaquettaire observé en SRA puisque les patients avec un SRA-FP4 isolément positif présentaient une densité optique moyenne en ELISA plus faible que les patients avec un SRA classique positif. Ces données n'ont pas clairement été confirmées au cours de l'étude actuelle, et si cette hypothèse ne doit pas être formellement écartée, la grande diversité des anticorps de TIH, et notamment leur spécificité et affinité très variables, pourrait aussi expliquer que certains anticorps anti-FP4 nécessitent des concentrations plus élevées de FP4 pour induire une activation plaquettaire *in vitro*. A ce titre, le SRA-FP4 a récemment montré des performances supérieures au SRA classique pour le diagnostic des thrombopénies/thromboses induites par la vaccination contre la COVID-19 (VITT), une complication due au développement de titres élevés d'anticorps atypiques, capables de reconnaître le FP4 natif avec une très grande affinité, et d'induire une activation plaquettaire Fc γ RIIa-dépendante en l'absence d'héparine (119). Aussi, au cours des TIH, il n'est pas exclu

que les patients présentant un SRA classique négatif et un SRA-FP4 positif aient en circulation des anticorps anti-FP4 avec une spécificité et/ou une affinité particulière.

Au regard des résultats de cette étude, il est important de se questionner sur la place à donner au SRA-FP4 dans la stratégie diagnostique des TIH. Ce test semble présenter d'excellentes performances, avec une sensibilité nettement supérieure à celle du SRA classique, mais une spécificité légèrement plus faible, qui peut potentiellement être un frein à son utilisation en tant que test fonctionnel de première intention. Un autre argument en défaveur de ce positionnement du SRA-FP4 est le prix élevé du FP4 humain commercialisé, qui entraîne une augmentation de 10 à 20 % du coût du SRA, pourtant déjà onéreux dans sa version classique. Aussi, le SRA-FP4 pourrait trouver sa place en deuxième ligne, c'est-à-dire lorsque le SRA classique est négatif mais que la suspicion de TIH est suffisamment forte pour envisager une vérification des résultats du test fonctionnel. Dans cette optique, il paraît impératif que les résultats soient interprétés par des biologistes ayant une forte expertise dans le diagnostic des TIH, puisque sa positivité chez certains patients difficilement scorables, comme ceux sous ECMO, semble parfois non-associée à une TIH. Par ailleurs, si pour les besoins de l'étude, les résultats de SRA ont été classés en « positif » ou « négatif », en pratique clinique, certains profils d'activation plaquettaire sont parfois difficiles à conclure, notamment en cas de résultat faiblement positif (activation < 30%). Dans ces situations, le SRA-FP4 pourrait fournir des profils d'activation plaquettaire plus nets, comme nous l'avons montré au cours de cette étude pour les patients avec un SRA classique modérément positif.

En conclusion, cette étude confirme les résultats de notre étude préliminaire, à savoir un intérêt pratique à utiliser le SRA-FP4 pour le diagnostic des TIH en raison d'une augmentation très nette de la sensibilité de ce test en comparaison au SRA classique. Si sa légère baisse de spécificité et son coût questionnent sa place en tant que test fonctionnel de première intention, le SRA-FP4 apparaît extrêmement utile en cas de suspicion de TIH modérée ou forte, associée à un test fonctionnel négatif ou difficile à conclure. Une étude prospective avec un plus grand effectif de patients permettrait probablement de répondre plus précisément à cette question.

Références

1. Amiral J, Bridey F, Dreyfus M, Vissoc AM, Fressinaud E, Wolf M, et al. Platelet factor 4 complexed to heparin is the target for antibodies generated in heparin-induced thrombocytopenia. *Thromb Haemost.* 6 juill 1992;68(1):95-6.
2. Barber AJ, Käser-Glanzmann R, Jakábová M, Lüscher EF. Characterization of a chondroitin 4 -sulfate proteoglycan carrier for heparin neutralizing activity (platelet factor 4) released from human blood platelets. *Biochim Biophys Acta.* 29 déc 1972;286(2):312-29.
3. Files JC, Malpass TW, Yee EK, Ritchie JL, Harker LA. Studies of human plate alpha-granule release in vivo. *Blood.* sept 1981;58(3):607-18.
4. Zhang X, Chen L, Bancroft DP, Lai CK, Maione TE. Crystal structure of recombinant human platelet factor 4. *Biochemistry.* 12 juill 1994;33(27):8361-6.
5. Rauova L, Zhai L, Kowalska MA, Arepally GM, Cines DB, Poncz M. Role of platelet surface PF4 antigenic complexes in heparin-induced thrombocytopenia pathogenesis: diagnostic and therapeutic implications. *Blood.* 15 mars 2006;107(6):2346-53.
6. Ziporen L, Li ZQ, Park KS, Sabnekar P, Liu WY, Arepally G, et al. Defining an antigenic epitope on platelet factor 4 associated with heparin-induced thrombocytopenia. *Blood.* 1 nov 1998;92(9):3250-9.
7. Li ZQ, Liu W, Park KS, Sachais BS, Arepally GM, Cines DB, et al. Defining a second epitope for heparin-induced thrombocytopenia/thrombosis antibodies using KKO, a murine HIT-like monoclonal antibody. *Blood.* 15 févr 2002;99(4):1230-6.
8. Rauova L, Poncz M, McKenzie SE, Reilly MP, Arepally G, Weisel JW, et al. Ultralarge complexes of PF4 and heparin are central to the pathogenesis of heparin-induced thrombocytopenia. *Blood.* 1 janv 2005;105(1):131-8.
9. Brandt S, Krauel K, Gottschalk KE, Renné T, Helm CA, Greinacher A, et al. Characterisation of the conformational changes in platelet factor 4 induced by polyanions: towards in vitro prediction of antigenicity. *Thromb Haemost.* 3 juill 2014;112(1):53-64.
10. Greinacher A, Alban S, Omer-Adam MA, Weitschies W, Warkentin TE. Heparin-induced thrombocytopenia: a stoichiometry-based model to explain the differing immunogenicities of unfractionated heparin, low-molecular-weight heparin, and fondaparinux in different clinical settings. *Thromb Res.* 2008;122(2):211-20.
11. Vayne C, Guery E-A, Gruel Y, Pouplard C. Données actualisées sur les thrombopénies induites par l'héparine. *Revue Francophone des Laboratoires.* 1 juill 2017;2017(494):41-53.
12. Greinacher A, Kohlmann T, Strobel U, Sheppard J-AI, Warkentin TE. The temporal profile of the anti-PF4/heparin immune response. *Blood.* 14 mai 2009;113(20):4970-6.
13. Aster RH, Curtis BR, McFarland JG, Bougie DW. Drug-induced immune thrombocytopenia: pathogenesis, diagnosis, and management. *J Thromb Haemost.* Juin 2009;7(6):911-8.

14. Newman PM, Chong BH. Heparin-induced thrombocytopenia: new evidence for the dynamic binding of purified anti-PF4-heparin antibodies to platelets and the resultant platelet activation. *Blood*. 1 juill 2000;96(1):182-7.
15. Reilly MP, Taylor SM, Hartman NK, Arepally GM, Sachais BS, Cines DB, et al. Heparin-induced thrombocytopenia/thrombosis in a transgenic mouse model requires human platelet factor 4 and platelet activation through FcγRIIA. *Blood*. 15 oct 2001;98(8):2442-7.
16. Boylan B, Gao C, Rathore V, Gill JC, Newman DK, Newman PJ. Identification of FcγRIIa as the ITAM-bearing receptor mediating αIIbβ3 outside-in integrin signaling in human platelets. *Blood*. 1 oct 2008;112(7):2780-6.
17. Hughes M, Hayward CP, Warkentin TE, Horsewood P, Chorneyko KA, Kelton JG. Morphological analysis of microparticle generation in heparin-induced thrombocytopenia. *Blood*. 1 juill 2000;96(1):188-94.
18. Warkentin TE, Hayward CP, Boshkov LK, Santos AV, Sheppard JA, Bode AP, et al. 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*. 1 déc 1994;84(11):3691-9.
19. Caroline Vayne, Activation plaquettaire induite par les IgG anti-FP4: mécanismes et conséquences pour la physiopathologie et le diagnostic des thrombopénies induites par l'héparine, thèse de doctorat, université de Tours, 2020.
20. Rollin J, Pouplard C, Sung HC, Leroux D, Saada A, Gouilleux-Gruart V, et al. Increased risk of thrombosis in FcγRIIA 131RR patients with HIT due to defective control of platelet activation by plasma IgG2. *Blood*. 9 avr 2015;125(15):2397-404.
21. Kasthuri RS, Glover SL, Jonas W, McEachron T, Pawlinski R, Arepally GM, et al. PF4/heparin-antibody complex induces monocyte tissue factor expression and release of tissue factor positive microparticles by activation of FcγRI. *Blood*. 31 mai 2012;119(22):5285-93.
22. Pouplard C, Iochmann S, Renard B, Herault O, Colombat P, Amiral J, et al. Induction of monocyte tissue factor expression by antibodies to heparin-platelet factor 4 complexes developed in heparin-induced thrombocytopenia. *Blood*. 15 mai 2001;97(10):3300-2.
23. Arepally GM, Mayer IM. Antibodies from patients with heparin-induced thrombocytopenia stimulate monocytic cells to express tissue factor and secrete interleukin-8. *Blood*. 15 août 2001;98(4):1252-4.
24. Tutwiler V, Madeeva D, Ahn HS, Andrianova I, Hayes V, Zheng XL, et al. Platelet transactivation by monocytes promotes thrombosis in heparin-induced thrombocytopenia. *Blood*. 28 janv 2016;127(4):464-72.
25. Rauova L, Hirsch JD, Greene TK, Zhai L, Hayes VM, Kowalska MA, et al. Monocyte-bound PF4 in the pathogenesis of heparin-induced thrombocytopenia. *Blood*. 2 déc 2010;116(23):5021-31.
26. Xiao Z, Visentin GP, Dayananda KM, Neelamegham S. Immune complexes formed following the binding of anti-platelet factor 4 (CXCL4) antibodies to CXCL4 stimulate human neutrophil activation and cell adhesion. *Blood*. 15 août 2008;112(4):1091-100.

27. Perdomo J, Leung HHL, Ahmadi Z, Yan F, Chong JJH, Passam FH, et al. Neutrophil activation and NETosis are the major drivers of thrombosis in heparin-induced thrombocytopenia. *Nat Commun.* 21 mars 2019;10(1):1322.
28. Fuchs TA, Brill A, Duerschmied D, Schatzberg D, Monestier M, Myers DD, et al. Extracellular DNA traps promote thrombosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 7 sept 2010;107(36):15880-5.
29. Petersen LC, Bjørn SE, Nordfang O. Effect of leukocyte proteinases on tissue factor pathway inhibitor. *Thromb Haemost.* 4 mai 1992;67(5):537-41.
30. Ammollo CT, Semeraro F, Xu J, Esmon NL, Esmon CT. Extracellular histones increase plasma thrombin generation by impairing thrombomodulin-dependent protein C activation. *J Thromb Haemost.* sept 2011;9(9):1795-803.
31. Gollomp K, Kim M, Johnston I, Hayes V, Welsh J, Arepally GM, et al. Neutrophil accumulation and NET release contribute to thrombosis in HIT. *JCI Insight.* 20 sept 2018;3(18):99445.
32. Johnston I, Sarkar A, Hayes V, Koma GT, Arepally GM, Chen J, et al. Recognition of PF4-VWF complexes by heparin-induced thrombocytopenia antibodies contributes to thrombus propagation. *Blood.* 9 avr 2020;135(15):1270-80.
33. Blank M, Shoenfeld Y, Tavor S, Praprotnik S, Boffa MC, Weksler B, et al. Anti-platelet factor 4/heparin antibodies from patients with heparin-induced thrombocytopenia provoke direct activation of microvascular endothelial cells. *Int Immunol.* févr 2002;14(2):121-9.
34. Warkentin TE. Heparin-induced thrombocytopenia: pathogenesis and management. *Br J Haematol.* mai 2003;121(4):535-55.
35. Martel N, Lee J, Wells PS. Risk for heparin-induced thrombocytopenia with unfractionated and low-molecular-weight heparin thromboprophylaxis: a meta-analysis. *Blood.* 15 oct 2005;106(8):2710-5.
36. Sachais BS, Litvinov RI, Yarovoi SV, Rauova L, Hinds JL, Rux AH, et al. Dynamic antibody-binding properties in the pathogenesis of HIT. *Blood.* 2 août 2012;120(5):1137-42.
37. Pouplard C, May MA, Iochmann S, Amiral J, Vissac AM, Marchand M, et al. Antibodies to platelet factor 4-heparin after cardiopulmonary bypass in patients anticoagulated with unfractionated heparin or a low-molecular-weight heparin: clinical implications for heparin-induced thrombocytopenia. *Circulation.* 18 mai 1999;99(19):2530-6.
38. Warkentin TE, Greinacher A. Heparin-induced thrombocytopenia: recognition, treatment, and prevention: the Seventh ACCP Conference on Antithrombotic and Thrombolytic Therapy. *Chest.* sept 2004;126(3 Suppl):311S-337S.
39. Lubenow N, Hinz P, Thomaschewski S, Lietz T, Vogler M, Ladwig A, et al. The severity of trauma determines the immune response to PF4/heparin and the frequency of heparin-induced thrombocytopenia. *Blood.* 4 mars 2010;115(9):1797-803.
40. Warkentin TE, Sheppard J-AI, Sigouin CS, Kohlmann T, Eichler P, Greinacher A. Gender imbalance and risk factor interactions in heparin-induced thrombocytopenia. *Blood.* 1 nov 2006;108(9):2937-41.

41. Pouplard C, Cornillet-Lefebvre P, Attaoua R, Leroux D, Lecocq-Lafon C, Rollin J, et al. Interleukin-10 promoter microsatellite polymorphisms influence the immune response to heparin and the risk of heparin-induced thrombocytopenia. *Thromb Res.* avr 2012;129(4):465-9.
42. Rollin J, Pouplard C, Leroux D, May M-A, Gruel Y. Impact of polymorphisms affecting the ACP1 gene on levels of antibodies against platelet factor 4-heparin complexes. *J Thromb Haemost.* août 2013;11(8):1609-11.
43. Warkentin TE, Sheppard J-AI, Moore JC, Cook RJ, Kelton JG. Studies of the immune response in heparin-induced thrombocytopenia. *Blood.* 14 mai 2009;113(20):4963-9.
44. Baroletti S, Hurwitz S, Conti NAS, Fanikos J, Piazza G, Goldhaber SZ. Thrombosis in suspected heparin-induced thrombocytopenia occurs more often with high antibody levels. *Am J Med.* janv 2012;125(1):44-9.
45. Huynh A, Arnold DM, Kelton JG, Smith JW, Horsewood P, Clare R, et al. Characterization of platelet factor 4 amino acids that bind pathogenic antibodies in heparin-induced thrombocytopenia. *Journal of Thrombosis and Haemostasis.* 2019;17(2):389-99.
46. Nguyen T-H, Medvedev N, Delcea M, Greinacher A. Anti-platelet factor 4/polyanion antibodies mediate a new mechanism of autoimmunity. *Nat Commun.* 22 mai 2017;8:14945.
47. Greinacher A, Selleng K, Warkentin TE. Autoimmune heparin-induced thrombocytopenia. *J Thromb Haemost.* nov 2017;15(11):2099-114.
48. Jay RM, Warkentin TE. Fatal heparin-induced thrombocytopenia (HIT) during warfarin thromboprophylaxis following orthopedic surgery: another example of « spontaneous » HIT? *J Thromb Haemost.* sept 2008;6(9):1598-600.
49. Warkentin TE, Kelton JG. Delayed-onset heparin-induced thrombocytopenia and thrombosis. *Ann Intern Med.* 2 oct 2001;135(7):502-6.
50. Linkins L-A, Warkentin TE. Heparin-induced thrombocytopenia: real-world issues. *Semin Thromb Hemost.* sept 2011;37(6):653-63.
51. Warkentin TE, Maurer BT, Aster RH. Heparin-induced thrombocytopenia associated with fondaparinux. *N Engl J Med.* 21 juin 2007;356(25):2653-5; discussion 2653-2655.
52. Warkentin TE, Kelton JG. A 14-year study of heparin-induced thrombocytopenia. *Am J Med.* nov 1996;101(5):502-7.
53. Warkentin TE, Levine MN, Hirsh J, Horsewood P, Roberts RS, Gent M, et al. Heparin-induced thrombocytopenia in patients treated with low-molecular-weight heparin or unfractionated heparin. *N Engl J Med.* 18 mai 1995;332(20):1330-5.
54. Warkentin TE. Heparin-induced skin lesions. *Br J Haematol.* févr 1996;92(2):494-7.
55. Drew PJ, Smith MJ, Milling MA. Heparin-induced skin necrosis and low molecular weight heparins. *Ann R Coll Surg Engl.* juill 1999;81(4):266-9.
56. Warkentin TE, Linkins L-A. Non-necrotizing heparin-induced skin lesions and the 4T's score. *J Thromb Haemost.* juill 2010;8(7):1483-5.
57. Warkentin TE, Hirte HW, Anderson DR, Wilson WE, O'Connell GJ, Lo RC. Transient global amnesia associated with acute heparin-induced thrombocytopenia. *Am J Med.* nov 1994;97(5):489-91.

58. Popov D, Zarrabi MH, Foda H, Graber M. Pseudopulmonary embolism: acute respiratory distress in the syndrome of heparin-induced thrombocytopenia. *Am J Kidney Dis.* mars 1997;29(3):449-52.
59. Gruel Y, Pouplard C, Nguyen P, Borg J-Y, Derlon A, Juhan-Vague I, et al. Biological and clinical features of low-molecular-weight heparin-induced thrombocytopenia. *Br J Haematol.* juin 2003;121(5):786-92.
60. Pishko AM, Lefler DS, Gimotty P, Paydary K, Fardin S, Arepally GM, et al. The risk of major bleeding in patients with suspected heparin-induced thrombocytopenia. *J Thromb Haemost.* nov 2019;17(11):1956-65.
61. Warkentin TE. HIT paradigms and paradoxes. *J Thromb Haemost.* juill 2011;9 Suppl 1:105-17.
62. Gruel Y, Vayne C, Rollin J, Weber P, Faille D, Bauters A, et al. Comparative Analysis of a French Prospective Series of 144 Patients with Heparin-Induced Thrombocytopenia (FRIGTIH) and the Literature. *Thromb Haemost.* juill 2020;120(7):1096-107.
63. Warkentin TE, Kelton JG. Temporal aspects of heparin-induced thrombocytopenia. *N Engl J Med.* 26 avr 2001;344(17):1286-92.
64. Vayne C, Guery E-A, Gruel Y, Pouplard C. Actualités sur le diagnostic et la prise en charge des thrombopénies induites par l'héparine. *Revue Francophone des Laboratoires.* 1 mars 2020;2020(520):48-58.
65. Lindhoff-Last E, Nakov R, Misselwitz F, Breddin H-K, Bauersachs R. 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.* sept 2002;118(4):1137-42.
66. Warkentin TE, Bernstein RA. Delayed-onset heparin-induced thrombocytopenia and cerebral thrombosis after a single administration of unfractionated heparin. *N Engl J Med.* 13 mars 2003;348(11):1067-9.
67. Lo GK, Sigouin CS, Warkentin TE. What is the potential for overdiagnosis of heparin-induced thrombocytopenia? *Am J Hematol.* déc 2007;82(12):1037-43.
68. Gruel Y, Pouplard C. Post-operative platelet count profile: the most reliable tool for identifying patients with true heparin-induced thrombocytopenia after cardiac surgery. *J Thromb Haemost.* janv 2010;8(1):27-9.
69. Cuker A. Clinical and laboratory diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia: an integrated approach. *Semin Thromb Hemost.* févr 2014;40(1):106-14.
70. Pouplard C, Regina S, May M-A, Gruel Y. Heparin-induced thrombocytopenia: a frequent complication after cardiac surgery. *Arch Mal Coeur Vaiss.* juill 2007;100(6-7):563-8.
71. Lo GK, Juhl D, Warkentin TE, Sigouin CS, Eichler P, Greinacher A. Evaluation of pretest clinical score (4 T's) for the diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia in two clinical settings. *J Thromb Haemost.* avr 2006;4(4):759-65.
72. Pouplard C, May MA, Regina S, Marchand M, Fusciardi J, Gruel Y. Changes in platelet count after cardiac surgery can effectively predict the development of pathogenic heparin-dependent antibodies. *Br J Haematol.* mars 2005;128(6):837-41.

73. Vayne C, May M-A, Bourguignon T, Lemoine E, Guery E-A, Rollin J, et al. Frequency and Clinical Impact of Platelet Factor 4-Specific Antibodies in Patients Undergoing Extracorporeal Membrane Oxygenation. *Thromb Haemost.* juill 2019;119(7):1138-46.
74. Cuker A, Ortel TL. ASH evidence-based guidelines: is the IgG-specific anti-PF4/heparin ELISA superior to the polyspecific ELISA in the laboratory diagnosis of HIT? *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2009;250-2.
75. Pouplard C, Gueret P, Fouassier M, Ternisien C, Trossaert M, Régina S, et al. Prospective evaluation of the « 4Ts » score and particle gel immunoassay specific to heparin/PF4 for the diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia. *J Thromb Haemost.* juill 2007;5(7):1373-9.
76. Leroux D, Hezard N, Lebreton A, Bauters A, Suchon P, de Maistre E, et al. Prospective evaluation of a rapid nanoparticle-based lateral flow immunoassay (STic Expert(®) HIT) for the diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia. *Br J Haematol.* sept 2014;166(5):774-82.
77. Gruel Y, De Maistre E, Pouplard C, Mullier F, Susen S, Rouillet S, et al. Diagnosis and management of heparin-induced thrombocytopenia. *Anaesth Crit Care Pain Med.* avr 2020;39(2):291-310.
78. Sachs UJ, von Hesberg J, Santoso S, Bein G, Bakchoul T. Evaluation of a new nanoparticle-based lateral-flow immunoassay for the exclusion of heparin-induced thrombocytopenia (HIT). *Thromb Haemost.* déc 2011;106(6):1197-202.
79. Warkentin TE, Sheppard J-AI, Linkins L-A, Arnold DM, Nazy I. Performance characteristics of an automated latex immunoturbidimetric assay [HemosIL® HIT-Ab(PF4-H)] for the diagnosis of immune heparin-induced thrombocytopenia. *Thromb Res.* mai 2017;153:108-17.
80. Nagler M, Cuker A. Profile of Instrumentation Laboratory's HemosIL® AcuStar HIT-Ab(PF4-H) assay for diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia. *Expert Rev Mol Diagn.* mai 2017;17(5):419-26.
81. Jousset E, Guéry E-A, Nougier C, Sobas F, Rollin J, Gruel Y, et al. Prospective evaluation of two specific IgG immunoassays (HemosIL® AcuStar HIT-IgG and HAT45G®) for the diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia: A Bayesian approach. *Int J Lab Hematol.* juin 2021;43(3):468-76.
82. Warkentin TE, Hayward CP, Smith CA, Kelly PM, Kelton JG. Determinants of donor platelet variability when testing for heparin-induced thrombocytopenia. *J Lab Clin Med.* sept 1992;120(3):371-9.
83. Harrison P, Mackie I, Mumford A, Briggs C, Liesner R, Winter M, et al. Guidelines for the laboratory investigation of heritable disorders of platelet function. *Br J Haematol.* oct 2011;155(1):30-44.
84. Warkentin TE, Arnold DM, Nazi I, Kelton JG. The platelet serotonin-release assay. *Am J Hematol.* juin 2015;90(6):564-72.
85. Sheridan D, Carter C, Kelton JG. A diagnostic test for heparin-induced thrombocytopenia. *Blood.* janv 1986;67(1):27-30.

86. Pouplard C, Amiral J, Borg JY, Laporte-Simitsidis S, Delahousse B, Gruel Y. 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.* mai 1999;111(5):700-6.
87. Mullier F, Minet V, Bailly N, Devalet B, Douxfils J, Chatelain C, et al. Platelet microparticle generation assay: a valuable test for immune heparin-induced thrombocytopenia diagnosis. *Thromb Res.* juin 2014;133(6):1068-73.
88. Tardy B, Lecompte T, Mullier F, Vayne C, Pouplard C. Detection of Platelet-Activating Antibodies Associated with Heparin-Induced Thrombocytopenia. *J Clin Med.* 24 avr 2020;9(4):1226.
89. Chong BH, Burgess J, Ismail F. The clinical usefulness of the platelet aggregation test for the diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia. *Thromb Haemost.* 1 avr 1993;69(4):344-50.
90. Brodard J, Alberio L, Angelillo-Scherrer A, Nagler M. Accuracy of heparin-induced platelet aggregation test for the diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia. *Thromb Res.* janv 2020;185:27-30.
91. Regnault V, de Maistre E, Carteaux J-P, Gruel Y, Nguyen P, Tardy B, et al. Platelet activation induced by human antibodies to interleukin-8. *Blood.* 15 févr 2003;101(4):1419-21.
92. Morel-Kopp M-C, Mullier F, Gkalea V, Bakchoul T, Minet V, Elalamy I, et al. Heparin-induced multi-electrode aggregometry method for heparin-induced thrombocytopenia testing: communication from the SSC of the ISTH. *J Thromb Haemost.* déc 2016;14(12):2548-52.
93. Morel-Kopp M-C, Tan CW, Brighton TA, McRae S, Baker R, Tran H, et al. Validation of whole blood impedance aggregometry as a new diagnostic tool for HIT: results of a large Australian study. *Thromb Haemost.* mars 2012;107(3):575-83.
94. Jin J, Baker SA, Hall ET, Gombar S, Bao A, Zehnder JL. Implementation of Whole-Blood Impedance Aggregometry for Heparin-Induced Thrombocytopenia Functional Assay and Case Discussion. *Am J Clin Pathol.* 5 juin 2019;152(1):50-8.
95. Guarino ML, Massimi I, Mardente S, Lappa A, Donfrancesco S, Visentin GP, et al. New platelet functional method for identification of pathogenic antibodies in HIT patients. *Platelets.* nov 2017;28(7):728-30.
96. Tomer A. A sensitive and specific functional flow cytometric assay for the diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia. *Br J Haematol.* sept 1997;98(3):648-56.
97. Jy W, Mao WW, Horstman LL, Valant PA, Ahn YS. A flow cytometric assay of platelet activation marker P-selectin (CD62P) distinguishes heparin-induced thrombocytopenia (HIT) from HIT with thrombosis (HITT). *Thromb Haemost.* oct 1999;82(4):1255-9.
98. Padmanabhan A, Jones CG, Bougie DW, Curtis BR, McFarland JG, Wang D, et al. A modified PF4-dependent, CD62p expression assay selectively detects serotonin-releasing antibodies in patients suspected of HIT. *Thromb Haemost.* 25 nov 2015;114(6):1322-3.
99. Cipok M, Tomer A, Elalamy I, Kirgner I, Dror N, Kay S, et al. Pathogenic heparin-induced thrombocytopenia and thrombosis (HIT) antibodies determined by rapid functional flow cytometry. *Eur J Haematol.* sept 2019;103(3):225-33.

100. Warkentin TE. Platelet microparticle generation assay for detection of HIT antibodies: advance, retreat, or too soon to tell? *Thromb Res.* juin 2014;133(6):957-8.
101. Althaus K, Pelzl L, Hidiatov O, Amiral J, Marini I, Bakchoul T. Evaluation of a flow cytometer-based functional assay using platelet-rich plasma in the diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia. *Thromb Res.* août 2019;180:55-61.
102. Kizlik-Masson C, Vayne C, McKenzie SE, Poupon A, Zhou Y, Champier G, et al. 5B9, a monoclonal antiplatelet factor 4/heparin IgG with a human Fc fragment that mimics heparin-induced thrombocytopenia antibodies. *Journal of Thrombosis and Haemostasis.* 2017;15(10):2065-75.
103. Vayne C, Guery E-A, Kizlik-Masson C, Rollin J, Bauters A, Gruel Y, et al. Beneficial effect of exogenous platelet factor 4 for detecting pathogenic heparin-induced thrombocytopenia antibodies. *Br J Haematol.* déc 2017;179(5):811-9.
104. Linkins L-A, Dans AL, Moores LK, Bona R, Davidson BL, Schulman S, et al. Treatment and prevention of heparin-induced thrombocytopenia: Antithrombotic Therapy and Prevention of Thrombosis, 9th ed: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines. *Chest.* févr 2012;141(2 Suppl):e495S-e530S.
105. Watson H, Davidson S, Keeling D, Haemostasis and Thrombosis Task Force of the British Committee for Standards in Haematology. Guidelines on the diagnosis and management of heparin-induced thrombocytopenia: second edition. *Br J Haematol.* déc 2012;159(5):528-40.
106. Cuker A, Arepally GM, Chong BH, Cines DB, Greinacher A, Gruel Y, et al. American Society of Hematology 2018 guidelines for management of venous thromboembolism: heparin-induced thrombocytopenia. *Blood Adv.* 27 nov 2018;2(22):3360-92.
107. Warkentin TE, Pai M, Linkins L-A. Direct oral anticoagulants for treatment of HIT: update of Hamilton experience and literature review. *Blood.* 31 août 2017;130(9):1104-13.
108. Suvarna S, Espinasse B, Qi R, Lubica R, Poncz M, Cines DB, et al. Determinants of PF4/heparin immunogenicity. *Blood.* 15 déc 2007;110(13):4253-60.
109. Krauel K, Füll B, Warkentin TE, Weitschies W, Kohlmann T, Sheppard JI, et al. Heparin-induced thrombocytopenia--therapeutic concentrations of danaparoid, unlike fondaparinux and direct thrombin inhibitors, inhibit formation of platelet factor 4-heparin complexes. *J Thromb Haemost.* déc 2008;6(12):2160-7.
110. Jones CG, Pechauer SM, Curtis BR, Bougie DW, Irani MS, Dhakal B, et al. A Platelet Factor 4-Dependent Platelet Activation Assay Facilitates Early Detection of Pathogenic Heparin-Induced Thrombocytopenia Antibodies. *Chest.* oct 2017;152(4):e77-80.
111. Padmanabhan A, Jones CG, Curtis BR, Bougie DW, Sullivan MJ, Peswani N, et al. A Novel PF4-Dependent Platelet Activation Assay Identifies Patients Likely to Have Heparin-Induced Thrombocytopenia/Thrombosis. *Chest.* sept 2016;150(3):506-15.
112. Samuelson Bannow B, Warad DM, Jones CG, Pechauer SM, Curtis BR, Bougie DW, et al. A prospective, blinded study of a PF4-dependent assay for HIT diagnosis. *Blood.* 25 févr 2021;137(8):1082-9.
113. Arora K, Rodgers S, Alkhatib Y, Onwubiko IN, Padmanabhan A, Otrrock ZK. P-selectin expression assay in a repeatedly serotonin-release assay-negative patient with heparin-induced thrombocytopenia. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 12 juill 2021;

114. Nazi I, Arnold DM, Warkentin TE, Smith JW, Staibano P, Kelton JG. Distinguishing between anti-platelet factor 4/heparin antibodies that can and cannot cause heparin-induced thrombocytopenia. *J Thromb Haemost.* oct 2015;13(10):1900-7.
115. Warkentin TE, Nazy I, Sheppard J-AI, Smith JW, Kelton JG, Arnold DM. Serotonin-release assay-negative heparin-induced thrombocytopenia. *Am J Hematol.* janv 2020;95(1):38-47.
116. Rubino JG, Arnold DM, Warkentin TE, Smith JW, Kelton JG, Nazy I. A comparative study of platelet factor 4-enhanced platelet activation assays for the diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia. *J Thromb Haemost.* avr 2021;19(4):1096-102.
117. Magnani HN, Gallus A. Heparin-induced thrombocytopenia (HIT). A report of 1,478 clinical outcomes of patients treated with danaparoid (Orgaran) from 1982 to mid-2004. *Thromb Haemost.* juin 2006;95(6):967-81.
118. Nagler M, Bachmann LM, ten Cate H, ten Cate-Hoek A. Diagnostic value of immunoassays for heparin-induced thrombocytopenia: a systematic review and meta-analysis. *Blood.* 4 févr 2016;127(5):546-57.
119. Vayne C, Rollin J, Gruel Y, Pouplard C, Galinat H, Huet O, et al. PF4 Immunoassays in Vaccine-Induced Thrombotic Thrombocytopenia. *N Engl J Med.* 22 juill 2021;385(4):376-8.

Annexes

Beneficial effect of exogenous platelet factor 4 for detecting pathogenic heparin-induced thrombocytopenia antibodies

Caroline Vayne,^{1,2} Eve-Anne Guery,^{1,2}
 Claire Kizlik-Masson,² Jérôme Rollin,^{1,2}
 Anne Bauters,³ Yves Gruel^{1,2}
 and Claire Pouplard^{1,2} 

¹Department of Haematology-Haemostasis,
 University Hospital of Tours, ²University
 François Rabalais, UMR CNRS 7292, Tours,
 and ³Institute of Haematology-Transfusion,
 University Hospital of Lille, Lille, France

Received 4 May 2017; accepted for publication
 9 August 2017

Correspondence: Claire Pouplard, Department
 of Haematology-Haemostasis, CHU Tours,
 37044 Tours Cedex, France.

E-mail: pouplard@univ-tours.fr

Summary

The laboratory diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia (HIT) is based on an enzyme immunoassay combined with a functional test, and serotonin release assay (SRA) is the gold standard for detecting activating HIT antibodies. However, a recent atypical history of HIT prompted us to evaluate whether addition of platelet factor 4 (PF4) during SRA could improve its ability to detect pathogenic HIT antibodies. Using 5B9, a monoclonal antibody to PF4/H with a human Fc fragment, we first defined the optimal PF4 concentration for detecting low amounts of platelet-activating IgG with SRA. Plasma samples from 50 patients with suspected HIT were then studied, and SRA was positive in 17 cases (Group SRA^{pos}), with relatively high levels of PF4-specific IgG (median optical density = 2.66). SRA was also systematically performed after adding 10 µg/ml of PF4 in the reaction mixture, and significant serotonin release was measured with samples from 9 additional patients (Group PF4-SRA^{pos}). Importantly, levels of PF4-specific IgG were similar in these samples and those from the 24 persistently SRA negative patients. Moreover, the pre-test probability of HIT was intermediate/high in all 'SRA^{pos}' or 'SRA-PF4^{pos}' patients. In conclusion, addition of exogenous PF4 might improve the detection of pathogenic HIT antibodies by SRA.

Keywords: heparin, thrombocytopenia, thrombosis, serotonin release assay, platelet factor 4.

Heparin-induced thrombocytopenia (HIT) is a rare but life-threatening complication of heparin treatments, with venous or arterial thrombosis seen in almost 50% of patients (Warkentin & Kelton, 1996). HIT is due to the development of antibodies against platelet factor 4 (PF4) modified by heparin (Amiral *et al*, 1992), which bind Fcγ receptors (FcγR) on blood cells via their Fc fragment (Brandt *et al*, 1995) (Rollin *et al*, 2016), and induce multicellular activation with hypercoagulability and high risk of thrombotic complications.

With the multiplicity of HIT features and the fact that only a subset of anti-PF4/heparin antibodies is truly pathogenic (Warkentin *et al*, 2005), the diagnosis of HIT is often challenging. This diagnosis should be based on the occurrence of one or more HIT-associated clinical events and the demonstration in many patients that specific antibodies activating platelets are present in serum or plasma (Arepally & Ortel, 2010). Clinical probability scores, such as the 4Ts (thrombocytopenia, timing of platelet count fall, thrombosis

or other sequelae, other causes for thrombocytopenia) score, combined with rapid immunoassays are validated approaches to rapidly exclude HIT (Pouplard *et al*, 2007) (Leroux *et al*, 2014), but despite high clinical probability and/or positive rapid-immunoassay results, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) should always be performed to detect PF4-dependent antibodies (Lubenow *et al*, 2010) (Warkentin, 2011). Most pathogenic antibodies are of the IgG class, and immunoassays specific for IgG are highly recommended because of their good sensitivity and better specificity than polyspecific assays (Pouplard *et al*, 2010). However, the positive predictive value of ELISA remains weak (Lo *et al*, 2007; Husseinzadeh *et al*, 2017), although a correlation has been demonstrated between ELISA optical density (OD) and the probability of pathogenic antibodies (Warkentin *et al*, 2008). The diagnostic accuracy of HIT can be optimized by combining anti-PF4/heparin ELISA with a functional platelet activation assay identifying anti-PF4/heparin IgG antibodies

able to activate platelets from healthy donors in the presence of therapeutic heparin concentrations.

Platelet activation assays can be performed with platelet-rich plasma (PRP) or washed platelets (WP). However, a platelet aggregation test (PAT) performed with PRP may yield false negative results, with low sensitivity ranging from 39% to 81% (Chong *et al*, 1993). Platelet activation assays with WP i.e., serotonin release assay (SRA) and heparin-induced platelet activation [HIPA] are more sensitive and specific, and therefore preferable.

For many years, SRA has been considered the gold standard for the diagnosis of HIT because of its reported excellent specificity (> 99%) and good sensitivity (over than 95%) (Sheridan *et al*, 1986) (Warkentin *et al*, 2015). Nevertheless, this evaluation must be nuanced because reference standards against which to measure SRA performances do not exist (Cuker, 2014). In this way, we were recently confronted with a case of atypical history of clinical and biological HIT, which prompted us to evaluate whether the addition of exogenous PF4 in the reaction mixture might improve the assay's performance.

Patients and methods

Patients with suspected HIT

The first patient prompting this study was a 74-year-old man hospitalized in Lille (France) for myeloma and who received unfractionated heparin (UFH) for right atrium thrombosis (index case). Thrombocytopenia and pulmonary embolism occurred within the first day of heparin treatment, and early-onset HIT was suspected. Unfractionated heparin was replaced with danaparoid sodium, and platelet count was corrected within 3 days (Fig 1A). Laboratory tests revealed significant levels of IgG antibodies to PF4/heparin (OD 1.2) with a clearly positive PAT (Fig 1B). As the clinical history was atypical, a plasma sample was sent to our laboratory and SRA was performed to confirm the diagnosis of early-onset HIT, but results were surprisingly negative after testing platelets from two different donors (Fig 1C). Because PAT is performed with PRP and SRA with WP, we hypothesized that PF4 concentration on cell surfaces might be too low for heparin-dependent platelet activation when this patient's sample was tested by SRA. Therefore, we evaluated whether the addition of exogenous PF4 was beneficial for platelet activation induced by PF4/heparin antibodies when evaluated by SRA. Thus, plasma samples from 50 other patients with clinically suspected HIT were also studied. Clinical and laboratory information was obtained regarding thrombocytopenia, thrombosis, bleeding, other causes of thrombocytopenia, alternative anticoagulation and platelet count evolution before and after the discontinuation of heparin. The probability of HIT was assessed by the updated 4Ts pre-test score (Linkins *et al*, 2012), obtained by two independent evaluators and submitted to another expert in case of discrepancy.

According to the 4Ts score, patients were classified in three groups corresponding to low, moderate or high pre-test probability of HIT. When HIT was suspected after cardiac surgery with cardiopulmonary bypass, the 4Ts score was not obtained because the post-operative platelet count (PC) profile was more reliable for evaluating the likelihood of HIT in this clinical situation (Pouplard *et al*, 2005; Gruel & Pouplard, 2010).

Levels of PF4-specific IgG antibodies were detected in all cases by ELISA (HAT-45G® Life Code; Immucor, Paris, France) according to the manufacturer's instructions, and SRAs were performed without (SRA) and with PF4 (PF4-SRA).

Serotonin release assays

The measurement of the percentage release of serotonin, a normal component of platelet dense granules, has been used for many years to quantify the magnitude of platelet activation induced by HIT antibodies. In this study, all samples were evaluated by using the conventional SRA procedure and a modified assay based on the presence of additional PF4 in the platelet buffer.

Conventional SRA was performed as previously described (Sheridan *et al*, 1986) with minor modifications. Platelets from healthy donors were selected according to their good responsiveness to known HIT plasma samples, and labelled with ¹⁴C-serotonin (¹⁴C-5HT, Perkin Elmer, Villebon-sur-Yvette, France) for 45 min at 37°C (14.8 kBq/ml PRP). After washing, 75 µl of labelled platelets suspended at 300 × 10⁹/l in Tyrode buffer with calcium 3 mmol/l were incubated for 1 h at room temperature with 20 µl tested sample and 5 µl unfractionated heparin at 0, 0.1, 0.5 or 10 iu/ml (final concentrations). The release reaction was terminated with PBS-EDTA (0.1 mol/l) and platelets were then centrifuged. The radioactivity in the supernatants was then counted by Liquid Scintillation Counting (LSC; Perkin Elmer) and expressed as percentage release of serotonin (%) by comparison with the total radioactivity in the platelet preparation.

PF4-modified SRA (PF4-SRA) was then developed to assess the effect of exogenous human PF4 (Hyphen BioMed, Neuville-sur-Oise, France) on platelet activation induced by HIT antibodies. First, we evaluated the effect in SRA of increasing concentrations of a monoclonal HIT antibody (5B9; 1, 2.5, 5, 10 and 20 µg/ml) in the presence of various amounts of PF4 (2.5, 5 and 10 µg/ml). 5B9 is a monoclonal chimeric anti-PF4/heparin IgG1 antibody with a human constant fragment that perfectly mimics the effects of human pathogenic HIT antibodies (Rollin *et al*, 2015). PF4 was systematically pre-incubated for 10 min with platelets before testing, to allow interaction with the cell surface.

The PF4 concentration that enabled positive SRA results in the presence of the lowest 5B9 concentrations was then selected for further experiments with plasma samples from patients with suspected HIT. In addition, plasma samples

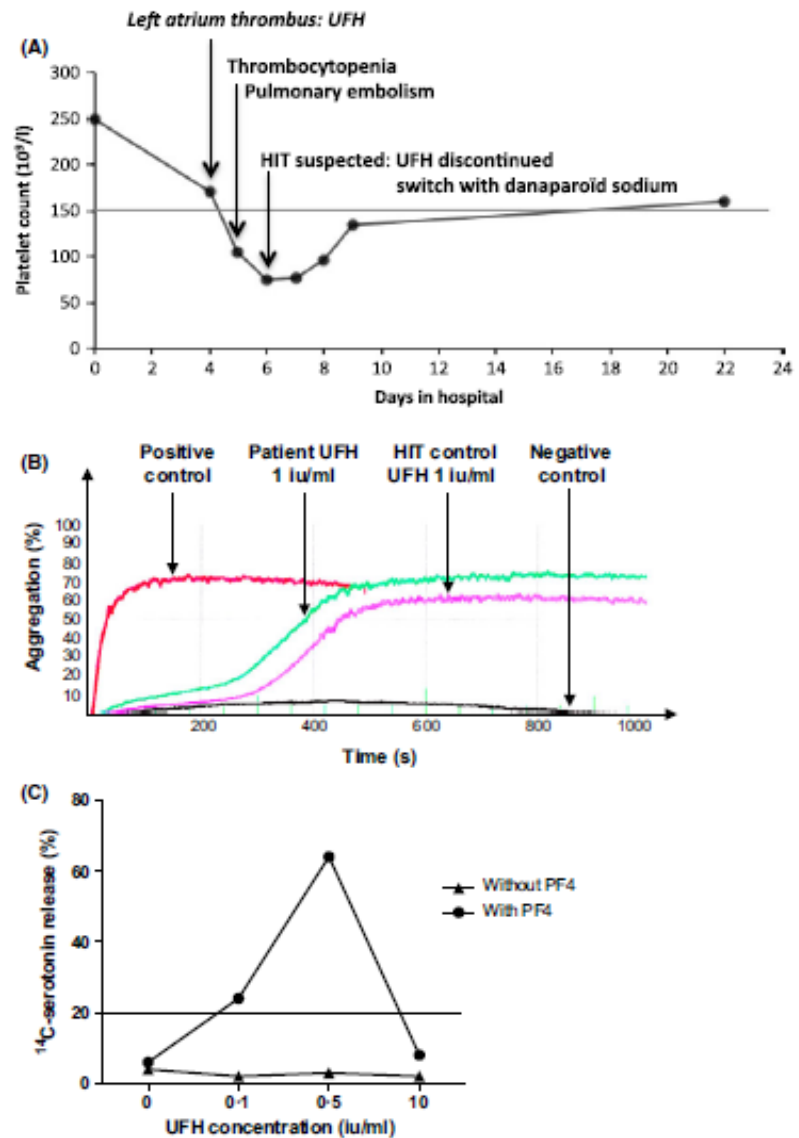


Fig 1. Index case: Summary of clinical and biological features. (A) Platelet count evolution during hospitalisation. (B) Platelet aggregation test results; in order of platelet aggregation occurrence: positive control (adenosine 5'-diphosphate [ADP] 10 µmol/l), patient sample with unfractionated heparin (UFH) 1 iu/ml, heparin-induced thrombocytopenia (HIT) control sample with UFH 1 iu/ml, and negative control. (C) Serotonin release assay performed with or without platelet factor 4 (PF4) 10 µg/ml in the platelet buffer (mean, $n = 3$). [Colour figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

from 7 patients that had previously been tested positive with conventional SRA were diluted (1/10, 1/20, 1/40) and tested again with SRA and PF4-SRA.

Whatever the assay performed (conventional SRA or PF4-SRA), a test result was defined as positive with ¹⁴C-serotonin release $\geq 20\%$ measured at 0, 0.1 or 0.5 iu/ml with complete inhibition at 10 iu/ml. A test result was defined as negative if the release was $< 20\%$ or not inhibited in the presence of 10 iu/ml UFH.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism. A P value < 0.05 was considered statistically significant. Paired- t test, Mann-Whitney test with Gaussian approximation and Fisher's exact test were chosen to compare mean serotonin

release, median anti-PF4 antibodies titres, and occurrence of thrombotic events between patients groups respectively.

Results

Exogenous PF4 sensitizes heparin-dependent platelet activation induced by 5B9 on SRA

The effect of various concentrations of 5B9 was first evaluated by SRA without the addition of PF4. As expected, positive results with typical platelet activation patterns were obtained with the highest 5B9 concentrations (20 and 10 µg/ml) tested with UFH at 0.1 iu/ml, with maximal serotonin release values of 47% and 40%, respectively. When lower 5B9 antibody concentrations were tested (1 and 2.5 µg/ml), the serotonin release markedly decreased and was lower than

20% with 2.5 and 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, regardless of UFH concentration (Fig 2A).

When 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ PF4 was added to the platelet buffer, these low concentrations of 5B9 induced significant serotonin release with 0.1 iu/ml UFH (maximal values of 33% and 39% with 1 and 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 5B9, respectively; Figure 2B and C). The strongest serotonin release was measured with UFH 0.5 iu/ml rather than 0.1 iu/ml when 10 and 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 5B9 were tested with exogenous PF4 (Fig 2D for 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 5B9; data not shown for 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 5B9).

Exogenous PF4 improves the sensitivity of SRA to detect heparin-dependent platelet-activating antibodies in patients with suspected HIT

From the results obtained with 5B9, subsequent experiments were systematically performed without (SRA) and with 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ exogenous PF4 (PF4-SRA) in the same run.

First, PF4-SRA performed with plasma from the index case showed strong serotonin release (64%), evidenced in the presence of 0.5 iu/ml UFH, which was fully inhibited with 10 iu/ml UFH. This result confirmed the presence of

potentially pathogenic HIT antibodies in the sample (Fig 1C).

Samples collected from 50 other patients with suspected HIT were then tested without additional PF4, and SRA was positive in 17 cases (SRA^{pos} group) with a mean maximal serotonin release of 46% at 0.1 iu/ml UFH (range: 23–85%) (Fig 3A, C). When PF4 (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) was added to the platelet buffer, heparin-dependent platelet activation with typical pattern and mean maximal serotonin release of 39% at 0.5 iu/ml UFH (range: 29–54%) was evidenced in an additional 9 samples (PF4-SRA^{pos} group) (Fig 3B, C). Whatever the incubation conditions (with or without PF4), this release was always inhibited with UFH 10 iu/ml, which supports the presence of HIT antibodies.

Serotonin release assay performed in the presence of additional PF4 remained negative in the 24 other cases (PF4-SRA^{neg} group) (Fig 3B). On the other hand, the pattern of platelet activation was different with samples from the SRA^{pos} group, with stronger serotonin release without heparin in the presence of 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ PF4 (47% vs. 21% with and without PF4, respectively, $P = 0.0005$; $n = 17$) (Fig 3A and B). While 30% of the SRA^{pos} group samples (5/17) induced platelet activation without requiring heparin in conventional

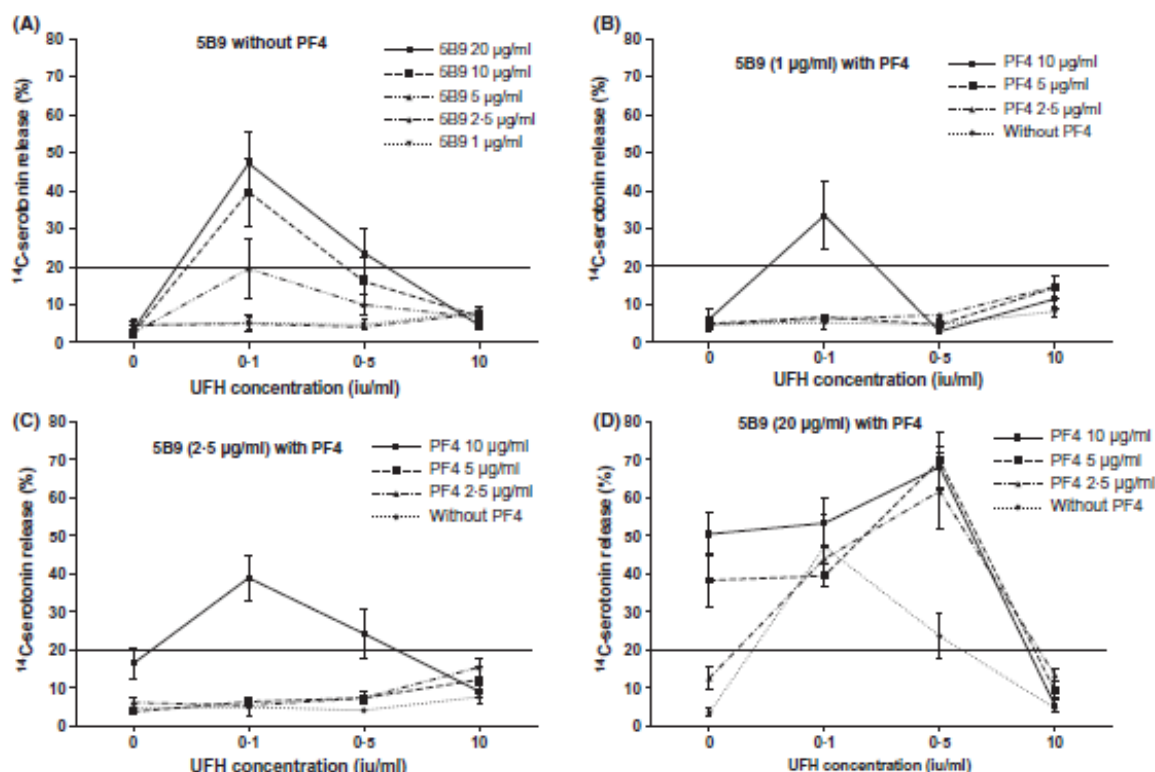


Fig 2. Exogenous PF4 increases serotonin release induced by low levels of 5B9 HIT antibody. (A) Conventional serotonin release assay (SRA) performed with increasing concentrations of 5B9 (1–20 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Data (%) are mean $\pm$ SEM ($n = 6$ donors). (B, C, and D) SRA performed without or with increasing concentrations of exogenous platelet factor 4 (PF4; 0, 2.5, 5 and 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) pre-incubated in the platelet buffer. Washed platelets were stimulated with 5B9 added at a concentration of 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (B), 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (C) and 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (D). Data (%) are mean $\pm$ SEM (B: $n = 4$ donors; C, D: $n = 6$ donors). UFH, unfractionated heparin.

SRA, almost 90% of them (15/17) activated platelets without heparin when PF4 was present (Fig 3D). In contrast, only 2 of 9 PF4-SRA^{pos} samples (22%) slightly activated platelets in the same conditions.

In addition, levels of IgG antibodies specific to PF4 were similar in PF4-SRA^{pos} samples and the 24 samples for which PF4-SRA remained negative (median OD: 1.6; range: 0.78–3.00 vs. median OD: 1.3; range: 0.63–2.59 respectively; $P = 0.38$). In contrast, plasma samples yielding a positive result in SRA without PF4 had higher levels of PF4-specific IgG antibodies (median OD: 2.7; range: 0.78–3.00; $P = 0.03$ compared with PF4-SRA^{pos} group and $P < 0.0001$ with PF4-SRA^{neg} group) (Fig 4A).

Plasma samples from 7 selected positive patients were further tested in SRA after dilution (1/10, 1/20, 1/40) with and without 10 µg/ml PF4. Conventional SRA was negative with diluted plasma samples, but the addition of PF4 enabled the detection of lower levels of activating HIT antibodies (Fig 4B), in accordance with the preliminary results obtained with 5B9.

The 4Ts pre-test probability score obtained with 40 patients was high, intermediate and low for 12, 20 and 7

cases, respectively (Table I). HIT had been suspected after cardiac surgery in the 11 remaining cases based on the evolution of platelet count post-operatively, and the 4Ts score was not obtained. Conventional SRA (i.e., without PF4) was positive for 4 of these patients and a significant serotonin release was also measured in 3 additional cases after the addition of PF4.

Of note, the pre-test probability of HIT was intermediate or high for all SRA^{pos} and PF4-SRA^{pos} groups but was low in 29% of the PF4-SRA^{neg} group. Heparin had been systematically replaced by a non-heparin anticoagulant in patients of the PF4-SRA^{pos} group, with recovery of normal platelet count in all cases: this evolution is in agreement with HIT diagnosis.

Discussion

Serotonin release assay is considered the most specific functional test for demonstrating heparin-dependent platelet-activating antibodies in patients with suspected HIT. However, the sensitivity of SRA may sometimes be too low, particularly when plasma levels of IgG antibodies and/or PF4 are not

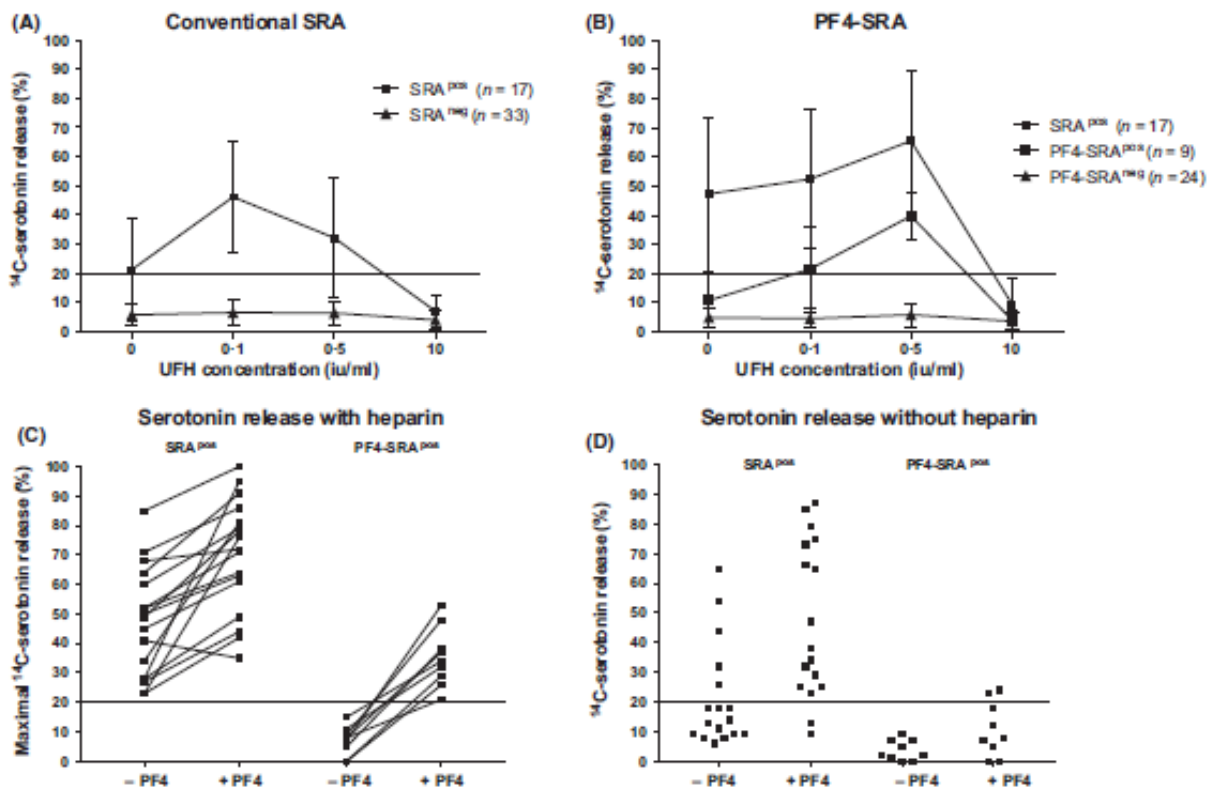


Fig 3. Addition of PF4 enhances the detection of heparin-dependent platelet-activating antibodies in patients with suspected HIT. Serotonin release assay (SRA) performed without (A) and with PF4 10 µg/ml (B) on 50 plasma samples from patients suspected of heparin-induced thrombocytopenia (HIT). Data (%) are mean $\pm$ SD. (C) Serotonin release (maximal, %) measured with or without 10 µg/ml platelet factor 4 (PF4) in the platelet buffer and in the presence of heparin in SRA^{pos} ($n = 17$) and PF4-SRA^{pos} ($n = 9$) groups. (D) Serotonin release (%) measured without heparin in SRA^{pos} and PF4-SRA^{pos} groups, with or without PF4 10 µg/ml in the platelet buffer. UFH: unfractionated heparin.

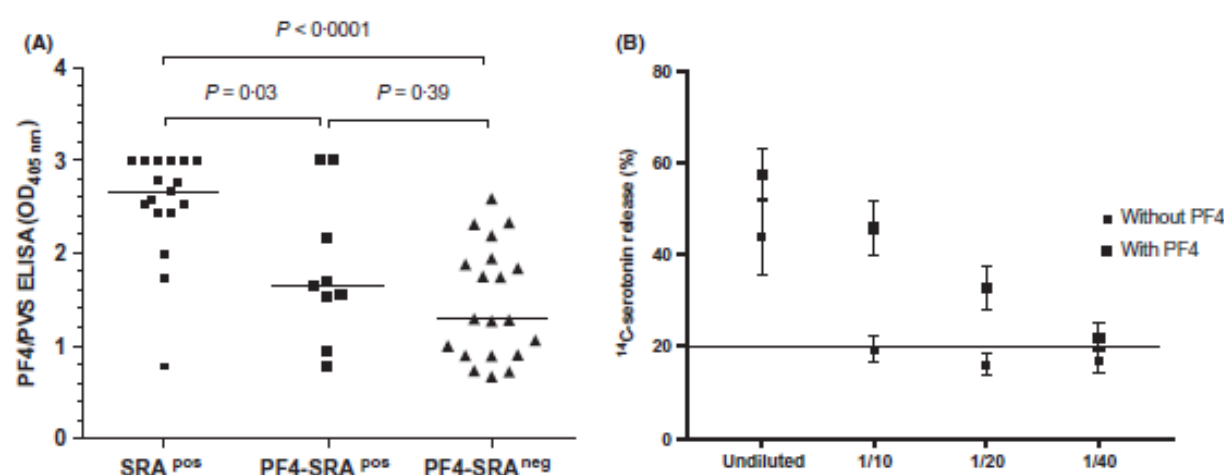


Fig 4. Exogenous PF4 increases serotonin release induced by low levels of patient HIT antibodies. (A) Levels of PF4-specific specific IgG antibodies in the 50 patients suspected of heparin-induced thrombocytopenia (HIT). Data for the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) are displayed as optical density (OD_{405 nm}) with median bars, and classified into 3 groups by SRA and SRA-PF4 results. (B) SRA performed without or with PF4 (10 µg/ml) on HIT plasma samples ($n = 7$). Data (%) are mean $\pm$ SEM obtained with UFH 0.5 iu/ml. PF4, platelet factor 4; PVS, polyvinyl sulphate; SRA, serotonin release assay.

Table 1. Type of heparin, clinical probability of HIT, thrombotic complications, and sepsis in patients with suspected HIT by SRA results.

Group	Heparin treatment	4Ts score	Thrombotic complications	Sepsis
SRA ^{pos} ($n = 17$)	UFH: 11 (65%) LMWH: 3 (17.5%) Both: 3 (17.5%)	High: 9 (53%) Intermediate: 4 (23.5%) Low: 0 NA: 4 (23.5%)	11 (65%)	1 (6%)
PF4-SRA ^{pos} ($n = 9$)	UFH: 7 (78%) LMWH: 2 (22%) Both: 0	High: 1 (11%) Intermediate: 5 (55.5%) Low: 0 NA: 3 (33.5%)	3 (33%)	2 (22%)
PF4-SRA ^{neg} ($n = 24$)	UFH: 13 (54%) LMWH: 9 (37.5%) Both: 2 (8.5%)	High: 2 (8.5%) Intermediate: 11 (46%) Low: 7 (29%) NA: 4 (16.5%)	9 (37.5%)	9 (37.5%)

Type of heparin administered = UFH, LMWH or both; clinical probability of HIT assessed in non-cardiac surgery patients using the 4Ts score. Patients who underwent cardiopulmonary bypass were not assessed for 4Ts score. HIT, heparin-induced thrombocytopenia; LMWH, low molecular weight heparin; NA, not assessed; PF4, platelet factor 4; SRA, serotonin release assay; UFH, unfractionated heparin.

high enough. This limitation of SRA performance was illustrated by the history of our patient suspected of having early-onset HIT: significant levels of PF4-specific antibodies were detected on ELISA, and PAT performed with PRP gave positive results. However, unexpectedly, the SRA results remained negative after testing 2 different donors, although this method is considered more sensitive and specific than PAT for detecting HIT antibodies.

The variability of platelet response to PF4-specific IgG antibodies among donors has been reported for many years and is the reason why testing PRP from at least 5 donors is recommended when performing PAT for the diagnosis of HIT (Chong *et al*, 1993). No specific recommendation was proposed for the number of donors to be tested in SRA, even though marked variability in platelet response to HIT sera

has been shown among donors (Warkentin *et al*, 1992) (Warkentin *et al*, 2011). Gene polymorphisms affecting the binding of HIT IgG-PF4-heparin complexes to FcγRIIa receptors or subsequent platelet signalling and activation may contribute to this variable response (Rollin *et al*, 2012, 2015). However, we hypothesized that the amount of PF4 on the platelet membrane was also a critical factor, particularly when testing washed platelets and as supported by our study. Indeed, the addition of 10 µg/ml PF4 to the platelet buffer allowed for lower levels of 5B9 to activate platelets with heparin. In that way, when samples from suspected HIT patients were tested in SRA with additional PF4, a significant release was measured, with some previously tested as negative with the conventional assay. Interestingly, 15 of 17 plasma samples from SRA^{pos} patients also induced platelet activation without

exogenous heparin when PF4 was added. Noticeably, residual heparin was detected using a sensitive chromogenic assay in 8 of these samples (data not shown), probably contributing to this effect. Significant serotonin release was also induced without heparin in the presence of exogenous PF4 with 5B9 when tested at relatively high concentrations (i.e., 10 or 20 µg/ml). Using KKO, a murine monoclonal antibody specific to PF4-heparin complexes, Rauova *et al* (2006) were the first to show that heparin was not necessary for platelet binding of HIT antibodies when additional PF4 was present. More recently, Padmanabhan *et al* (2015) demonstrated in SRA-positive samples that PF4 promoted HIT IgG binding on platelets without heparin. Warkentin and Kelton (2001) also described a subset of HIT antibodies that induced platelet activation without heparin nor PF4 (Warkentin & Kelton, 2001), which were particularly pathogenic, being associated with deeper thrombocytopenia, delayed platelet count recovery and more frequent clinical complications (Linkins & Warkentin, 2011). In our study, a similar SRA pattern was evidenced for 5 SRA^{pos} patients, including 4 in whom no residual heparin could be detected, all having high clinical probability of HIT (4Ts score ≥ 6 or biphasic PC evolution after CPB) with thrombotic complications in 4 cases.

PF4 is a cationic protein with a positive ring that is critical for its interaction with negatively charged molecules, including heparin (Zhang *et al*, 1994) or glycosaminoglycans (GAG) and may bind to various cells that expose proteoglycans, including platelets (Nader, 1991). In this regard, PF4 released *in vivo* by activated platelets only transiently circulates in plasma and quickly binds GAG on cells (Rybak *et al*, 1989; Stringer & Gallagher, 1997). Therefore, if present in sufficient amount, PF4 tetramers may form ultra-large complexes (ULC) with chondroitin 4 sulphate molecules on platelets (Rauova *et al*, 2005), and heparin is no longer required for HIT IgG platelet binding and activation. In support of this concept, platelet treatment with chondroitinase ABC was recently found to reduce PF4-dependent HIT IgG binding (Padmanabhan *et al*, 2015).

Recently, Padmanabhan *et al* designed an assay in which platelet activation by HIT antibodies was assessed by evaluating P-selection expression on platelet surface using flow cytometry (PEA) (Padmanabhan *et al*, 2015). Pre-incubation of platelets with PF4 sensitized the detection of HIT activating antibodies in PEA and our results are in agreement with this finding (Padmanabhan *et al*, 2016).

Nazi *et al* (2015) also recently showed that exogenous PF4 led to positive SRA results with 36% of samples initially tested as negative with conventional SRA. However, patients with positive PF4-SRA results had low clinical probability of HIT and no thrombosis, and the authors assumed that PF4-SRA lacked specificity and therefore could lead to HIT over-diagnosis by detecting sub-threshold levels of pathogenic antibodies (Nazi *et al*, 2015). In our study, all patients in the PF4-SRA^{pos} group had intermediate or high 4Ts score, and 4 experienced thromboses. In addition, the platelet count

recovered to a normal value after heparin withdrawal in all these cases; therefore, we considered that a positive PF4-SRA result combined with significant levels of PF4-specific IgG, favoured HIT.

Of note, we used a 5 times lower concentration of PF4 (10 µg/ml) than chosen by Nazi *et al* (50 µg/ml), as this enabled the lowest concentrations of 5B9 to be detected by SRA. Moreover, the concentration of 10 µg/ml was close to those measured in serum (Brandt *et al*, 2000) or in PRP stimulated with HIT IgG and heparin (Newman & Chong, 2000), i.e. 3–15 or 5 µg/ml, respectively. Hence, very high levels of exogenous PF4 may reduce the specificity of PF4-SRA, as suggested by Nazi *et al* (2015), whereas lower concentrations could help detect antibodies with real clinical significance.

Titres of HIT IgG, evaluated by immunoassays, strongly predict a positive SRA result (Warkentin, 2012). Nevertheless, in our study, similar levels of PF4-specific IgG antibodies were measured in PF4-SRA^{pos} and PF4-SRA^{neg} groups, and thus PF4-SRA results were not exclusively dependent on antibody titres. Several PF4 regions have been recently identified by crystallographic studies to be critical in HIT pathophysiology (Cai *et al*, 2015), and PF4-SRA might detect other PF4 epitopes with variable affinity for antibodies to PF4-heparin complexes.

In conclusion, PF4-SRA appears to sensitize the detection of low levels of pathogenic HIT antibodies and might be helpful in the laboratory diagnosis of HIT. However, larger studies are needed to confirm the beneficial effect of exogenous PF4 on SRA performance.

Author contributions

Caroline Vayne contributed to patient enrolment and collection of clinical data, performed the experiments, analysed the data and wrote the paper. Eve Anne Guery contributed to the experiments and analysis of the data. Claire Kizlik-Masson contributed to the experiments and analysis of the data. Jérôme Rollin contributed to analysis of the data and revised the intellectual content of the manuscript. Anne Bauters contributed to patient enrolment and collection of clinical data. Yves Gruel designed the research study, analysed the data, and revised the intellectual content of the manuscript. Claire Pouplard designed the research study, analysed the data, and revised the intellectual content of the manuscript.

Acknowledgements

This study was supported by the Institut pour la Recherche sur la Thrombose et l'Hémostase (IRTH). We thank Ms Laura Smales for editing the English language.

Conflict of interest

The authors declare there are no competing financial interests.

References

- Amiral, J., Bridey, F., Dreyfus, M., Vissoc, A.M., Pressinard, E., Wolf, M. & Meyer, D. (1992) Platelet factor 4 complexed to heparin is the target for antibodies generated in heparin-induced thrombocytopenia. *Thrombosis and Haemostasis*, **68**, 95–96.
- Arepally, G.M. & Ortel, T.L. (2010) Heparin-induced thrombocytopenia. *Annual Review of Medicine*, **61**, 77–90.
- Brandt, J.T., Isenhardt, C.E., Osborne, J.M., Ahmed, A. & Anderson, C.L. (1995) On the role of platelet Fc gamma RIIa phenotype in heparin-induced thrombocytopenia. *Thrombosis and Haemostasis*, **74**, 1564–1572.
- Brandt, E., Ludwig, A., Petersen, F. & Hlad, H.D. (2000) Platelet-derived CXC chemokines: old players in new games. *Immunological Reviews*, **177**, 204–216.
- Cai, Z., Yarovoi, S.V., Zhu, Z., Rauova, L., Hayes, V., Lebedeva, T., Liu, Q., Poncz, M., Arepally, G., Cines, D.B. & Greene, M.I. (2015) Atomic description of the immune complex involved in heparin-induced thrombocytopenia. *Nature Communications*, **6**, 8277.
- Chong, B.H., Burgess, J. & Imai, F. (1993) The clinical usefulness of the platelet aggregation test for the diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia. *Thrombosis and Haemostasis*, **69**, 344–350.
- Cuker, A. (2014) Clinical and laboratory diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia: an integrated approach. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, **40**, 106–114.
- Gruel, Y. & Pouplard, C. (2010) Post-operative platelet count profile: the most reliable tool for identifying patients with true heparin-induced thrombocytopenia after cardiac surgery. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, **8**, 27–29.
- Husseinizadeh, H.D., Gimotty, P.A., Pishko, A.M., Buckley, M., Warkentin, T.E. & Cuker, A. (2017) Diagnostic accuracy of IgG-specific versus polyspecific enzyme-linked immunoassay for the diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, **15**, 1203–1212.
- Leroux, D., Hezard, N., Lebreton, A., Bauters, A., Suchon, P., de Maistre, E., Biron, C., Huize, M.G., Ternisien, C., Voisin, S., Gruel, Y. & Pouplard, C. (2014) Prospective evaluation of a rapid nanoparticle-based lateral flow immunoassay (Stic Expert®) HIT for the diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia. *British Journal of Haematology*, **166**, 774–782.
- Linkins, L.A. & Warkentin, T.E. (2011) Heparin-induced thrombocytopenia: real-world issues. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, **37**, 653–663.
- Linkins, L.A., Dans, A.L., Moores, L.K., Bona, R., Davidson, B.L., Schulman, S. & Crowther, M. (2012) Treatment and prevention of heparin-induced thrombocytopenia: Antithrombotic Therapy and Prevention of Thrombosis, 9th ed. American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines. *Chest*, **141**, e495S–e505S.
- Lo, G.K., Sigouin, C.S. & Warkentin, T.E. (2007) What is the potential for overdiagnosis of heparin-induced thrombocytopenia? *American Journal of Hematology*, **82**, 1037–1043.
- Lubenow, N., Hinz, P., Thomaschewski, S., Lietz, T., Vogler, M., Ladwig, A., Junger, M., Nauck, M., Schellong, S., Wander, K., Engel, G., Bickernkamp, A. & Greinacher, A. (2010) The severity of trauma determines the immune response to PF4/heparin and the frequency of heparin-induced thrombocytopenia. *Blood*, **115**, 1797–1803.
- Nader, H.B. (1991) Characterization of a heparan sulfate and a peculiar chondroitin 4-sulfate proteoglycan from platelets. Inhibition of the aggregation process by platelet chondroitin sulfate proteoglycan. *Journal of Biological Chemistry*, **266**, 10518–10523.
- Nazi, I., Arnold, D.M., Warkentin, T.E., Smith, J.W., Staibano, P. & Kelton, J.G. (2015) Distinguishing between anti-platelet factor 4/heparin antibodies that can and cannot cause heparin-induced thrombocytopenia. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, **13**, 1900–1907.
- Newman, P.M. & Chong, B.H. (2000) Heparin-induced thrombocytopenia: new evidence for the dynamic binding of purified anti-PF4-heparin antibodies to platelets and the resultant platelet activation. *Blood*, **96**, 182–187.
- Padmanabhan, A., Jones, C.G., Bougie, D.W., Curtis, B.R., McFarland, J.G., Wang, D. & Aster, R.H. (2015) Heparin-independent, PF4-dependent binding of HIT antibodies to platelets: implications for HIT pathogenesis. *Blood*, **125**, 155–161.
- Padmanabhan, A., Jones, C.G., Curtis, B.R., Bougie, D.W., Sullivan, M.J., Penwani, N., McFarland, J.G., Eastwood, D., Wang, D. & Aster, R.H. (2016) A novel PF4-dependent platelet activation assay identifies patients likely to have heparin-induced thrombocytopenia/thrombosis. *Chest*, **150**, 506–515.
- Pouplard, C., May, M.A., Regina, S., Marchand, M., Fuscuardi, J. & Gruel, Y. (2005) Changes in platelet count after cardiac surgery can effectively predict the development of pathogenic heparin-dependent antibodies. *British Journal of Haematology*, **128**, 837–841.
- Pouplard, C., Gueret, P., Fouassier, M., Ternisien, C., Trossier, M., Regina, S. & Gruel, Y. (2007) Prospective evaluation of the '4Ts' score and particle gel immunoassay specific to heparin/PF4 for the diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, **5**, 1373–1379.
- Pouplard, C., Leroux, D., Regina, S., Rollin, J. & Gruel, Y. (2010) Effectiveness of a new immunoassay for the diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia and improved specificity when detecting IgG antibodies. *Thrombosis and Haemostasis*, **103**, 145–150.
- Rauova, L., Poncz, M., McKenzie, S.E., Reilly, M.P., Arepally, G., Weisel, J.W., Nagasawa, C., Cines, D.B. & Sachais, B.S. (2005) Ultrahigh complexes of PF4 and heparin are central to the pathogenesis of heparin-induced thrombocytopenia. *Blood*, **105**, 131–138.
- Rauova, L., Zhai, L., Kowalska, M.A., Arepally, G.M., Cines, D.B. & Poncz, M. (2006) Role of platelet surface PF4 antigenic complexes in heparin-induced thrombocytopenia pathogenesis: diagnostic and therapeutic implications. *Blood*, **107**, 2346–2353.
- Rollin, J., Pouplard, C., Gratacap, M.P., Leroux, D., May, M.A., Aupart, M., Gouilleux-Gruart, V., Payrastre, B. & Gruel, Y. (2012) Polymorphisms of protein tyrosine phosphatase CD148 influence Fc gamma RIIa-dependent platelet activation and the risk of heparin-induced thrombocytopenia. *Blood*, **120**, 1309–1316.
- Rollin, J., Pouplard, C., Sung, H.C., Leroux, D., Saada, A., Gouilleux-Gruart, V., Thibault, G. & Gruel, Y. (2015) Increased risk of thrombosis in Fc gamma RIIa 131RR patients with HIT due to defective control of platelet activation by plasma IgG2. *Blood*, **125**, 2397–2404.
- Rollin, J., Pouplard, C. & Gruel, Y. (2016) Risk factors for heparin-induced thrombocytopenia: focus on Fc gamma receptors. *Thrombosis and Haemostasis*, **116**, 799–805.
- Rybak, M.E., Gimbrone, M.A. Jr, Davies, P.F. & Handin, R.I. (1989) Interaction of platelet factor four with cultured vascular endothelial cells. *Blood*, **73**, 1534–1539.
- Sheridan, D., Carter, C. & Kelton, J.G. (1986) A diagnostic test for heparin-induced thrombocytopenia. *Blood*, **67**, 27–30.
- Stringer, S.E. & Gallagher, J.T. (1997) Specific binding of the chemokine platelet factor 4 to heparan sulfate. *Journal of Biological Chemistry*, **272**, 20508–20514.
- Warkentin, T.E. (2011) HIT paradigms and paradoxes. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, **9**, 105–117.
- Warkentin, T.E. (2012) Optical densities reduce odds of heparin-induced thrombocytopenia over-diagnosis. *American Journal of Medicine*, **125**, 3–4.
- Warkentin, T.E. & Kelton, J.G. (1996) A 14-year study of heparin-induced thrombocytopenia. *American Journal of Medicine*, **101**, 502–507.
- Warkentin, T.E. & Kelton, J.G. (2001) Delayed-onset heparin-induced thrombocytopenia and thrombosis. *Annals of Internal Medicine*, **135**, 502–506.
- Warkentin, T.E., Hayward, C.P., Smith, C.A., Kelly, P.M. & Kelton, J.G. (1992) Determinants of donor platelet variability when testing for heparin-induced thrombocytopenia. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, **120**, 371–379.
- Warkentin, T.E., Sheppard, J.A., Moore, J.C., Moore, K.M., Sigouin, C.S. & Kelton, J.G. (2005) Laboratory testing for the antibodies that

- cause heparin-induced thrombocytopenia: how much class do we need? *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 146, 341–346.
- Warkentin, T.E., Sheppard, J.L., Moore, J.C., Sigouin, C.S. & Kelton, J.G. (2008) Quantitative interpretation of optical density measurements using PF4-dependent enzyme-immunoassays. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 6, 1304–1312.
- Warkentin, T.E., Greinacher, A., Gruel, Y., Aster, R.H. & Chong, B.H. (2011) Laboratory testing for heparin-induced thrombocytopenia: a conceptual framework and implications for diagnosis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 9, 2498–2500.
- Warkentin, T.E., Arnold, D.M., Nazi, I. & Kelton, J.G. (2015) The platelet serotonin-release assay. *American Journal of Hematology*, 90, 564–572.
- Zhang, X., Chen, L., Bancroft, D.P., Lai, C.K. & Maione, T.E. (1994) Crystal structure of recombinant human platelet factor 4. *Biochemistry*, 33, 8361–8366.

Annexe 2

Centre	Patients inclus	Test immunologique TIH	Test fonctionnel TIH	Correspondants locaux
Amiens	3	ELISA HAT45G IgG Immucor	<i>n.r</i>	Mailys Le Guyader
Angers	21	Test rapide HemosIL AcuStar HIT-IgG	TAP	Marie Tuffigo
Annecy	8	Test rapide Diamed/ test rapide HemosIL AcuStar HIT-IgG	TAP	Florence Blanc-Jouvan
Brest	10	ELISA Asserachrom HPIA IgG Stago	TAP	Hubert Galinat/ Fanny Mingant
Clermont-Ferrand	33	ELISA HAT45G IgG Immucor	TAP	Aurélien Lebreton/Thomas Sinegre/Laurie Talon
Dijon	4	ELISA Asserachrom HPIA IgG Stago	TAP	Emmanuelle De Maistre
La Réunion	6	Test rapide HemosIL AcuStar HIT-IgG	Non	Angele-Nguekam
Le Mans	7	ELISA Asserachrom HPIA IgG Stago	TAP	Vincent Cussac
Lille	45	ELISA HAT45G IgG Immucor	TAP	Anne Bauters
Marseille	36	Test rapide HemosIL AcuStar HIT-IgG	TAP	Laurence Camoin
Montpellier	15	ELISA Zymutest HIA IgG Hyphen	<i>n.r</i>	Isabelle Diaz
Nantes	5	Test rapide HemosIL AcuStar HIT-IgG	TAP	Catherine Ternisien/Nicolas Drillaud
Nîmes	1	ELISA Immucor	<i>n.r</i>	Eva Nouvellon
Nouméa	3	ELISA Asserachrom HPIA IgG Stago	Non	Erwan Choblet
Paris	1	<i>n.r</i>	Non	Isabelle Martin
Poitiers	7	ELISA Zymutest HIA IgG Hyphen	TAP	François Grand / Stéphanie Moyrand
Reims	7	Test rapide HemosIL AcuStar HIT-IgG	TAP	Sophie Guillou
Rennes	7	ELISA Asserachrom HPIA IgG Stago	TAP	Fabienne Nedelec/Isabelle Gouin
Toulouse	2	Test rapide HemosIL AcuStar HIT-IgG	TAP	Sophie Voisin/Vincent Mémier
Tours	26	ELISA HAT45G IgG Immucor	SRA/SRA-FP4	Claire Pouplard/Eve-Anne Guéry/Caroline Vayne
TAP : Test d'agrégation plaquettaire				

Liste des centres inclus après exclusion des patients

Annexe 3 :

Fiche renseignement suspicion de TIH

Numéro du patient : 1

Sexe : Homme

Age : 68

Etat infectieux : Non

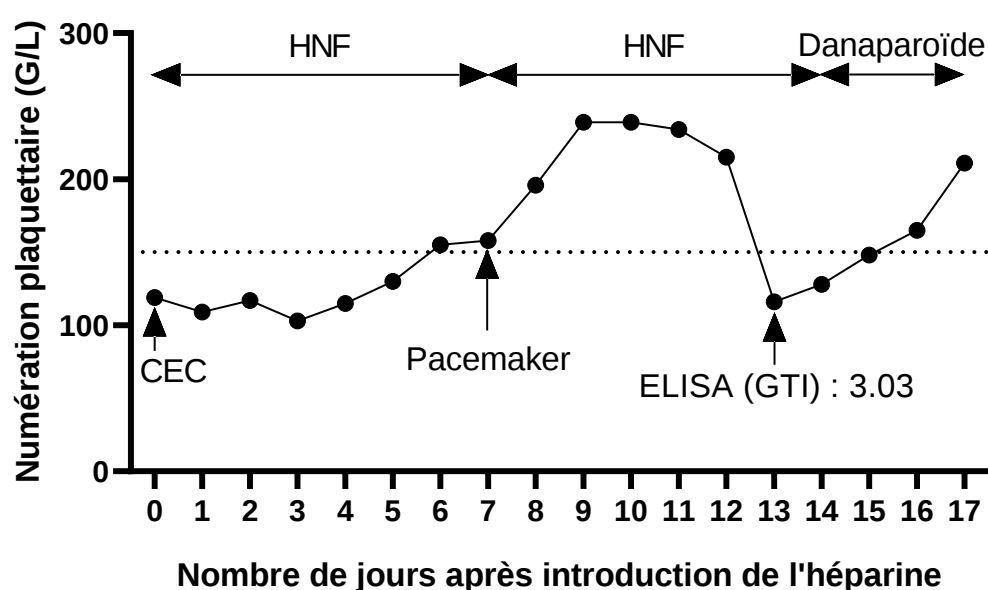
Chirurgie dans les 72h : Non

Médicaments thrombopéniants reçus par le patient : Non

Indication de l'héparinothérapie : CEC

Type d'héparine reçu : HNF

Probabilité clinique évaluée : Elevée (CEC, biphasique)



Numération plaquettaire au début de l'héparinothérapie : 119 G/L

Numération plaquettaire à la suspicion : 116 G/L Délai avant suspicion : 13 jours

Nadir de la numération : 103 G/L

Délai du nadir : 3 jours

Pourcentage de chute de la NP au moment de la suspicion : 46% (chute de 215 à 116 G/L)

Complication(s)

thrombotique(s) :

Non

Manifestation(s)

atypique(s) :

Non

Saignements : Non

CIVD : Non

Test immunologique : ELISA GTI (DO : 3.03)

Anticoagulation alternative : Danaparoïde sodique

Correction de la numération plaquettaire : Oui, 1 jour

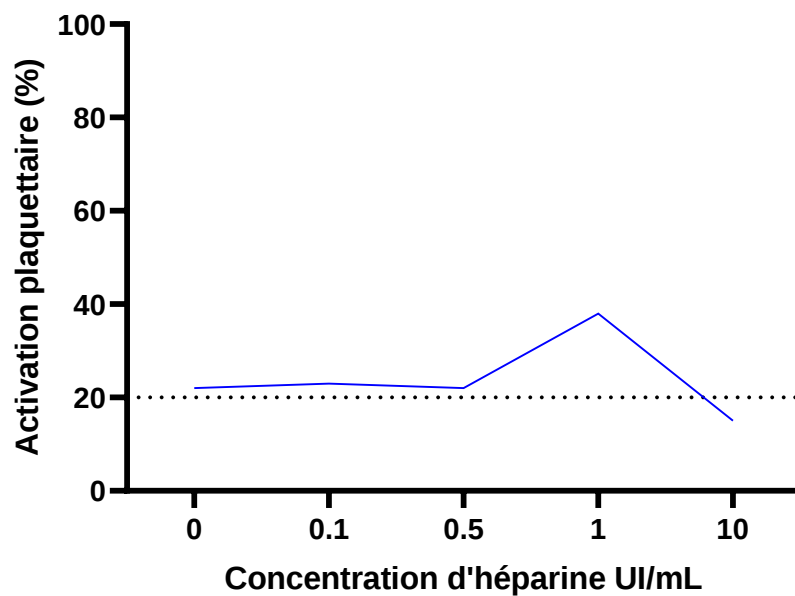
Autre(s) renseignement(s) : Non

Avis des experts :

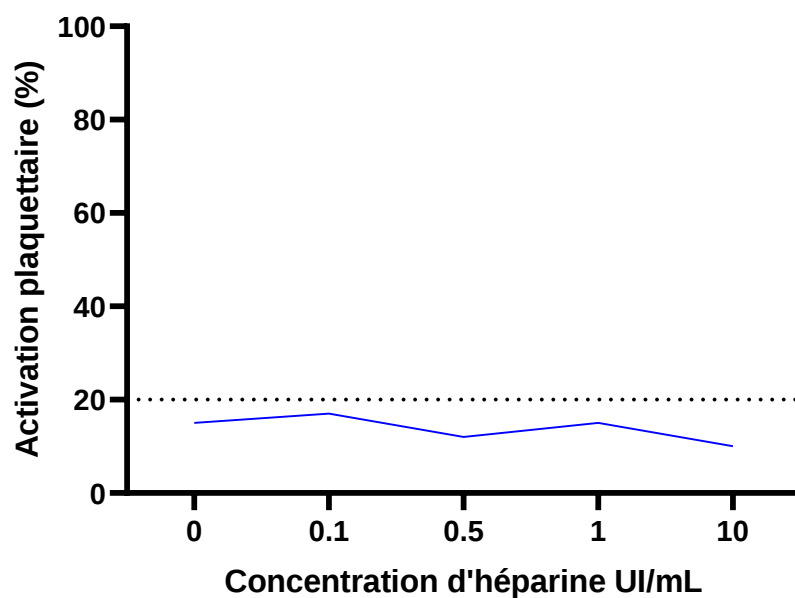
Expert n°1 : Probable

Expert n°2 : Probable

Profil d'activation plaquettaire en SRA-FP4 : (non fournis aux experts pour classification des cas)



Profil d'activation plaquettaire en SRA : (non fournis aux experts pour classification des cas)



Annexe 4

Fiche renseignement suspicion de TIH

Numéro du patient : 2

Sexe : Homme

Age : 83

Etat infectieux : Oui (cholécystite)

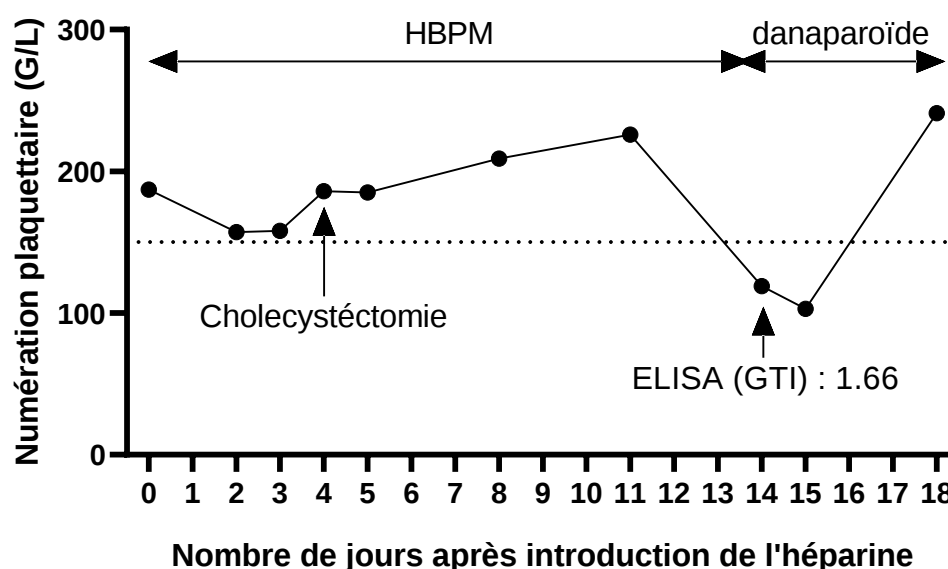
Chirurgie dans les 72h : Non

Médicaments thrombopéniants reçus par le patient : Augmentin, Furosémide

Indication de l'héparinothérapie : Post-opératoire pour pose de prothèse de genou

Type d'héparine reçu : HBPM

Probabilité clinique évaluée : Modérée (5)



Numération plaquettaire au début de l'héparinothérapie : 187 G/L

Numération plaquettaire à la suspicion : 103 G/L **Délai avant suspicion :** 14 jours

Nadir de la numération : 103 G/L

Délai du nadir : 14 jours

Pourcentage de chute de la NP au moment de la suspicion : 47.3% (chute de 226 à 119 G/L)

Complication(s) thrombotique(s) : Non

Manifestation(s) atypique(s) : Plaques érythémateuses au site d'injection

Saignements : Non

CIVD : Non

Test immunologique : ELISA GTI (DO : 1.66)

Anticoagulation alternative : Danaparoïde sodique

Correction de la numération plaquettaire : Oui, 3 jours

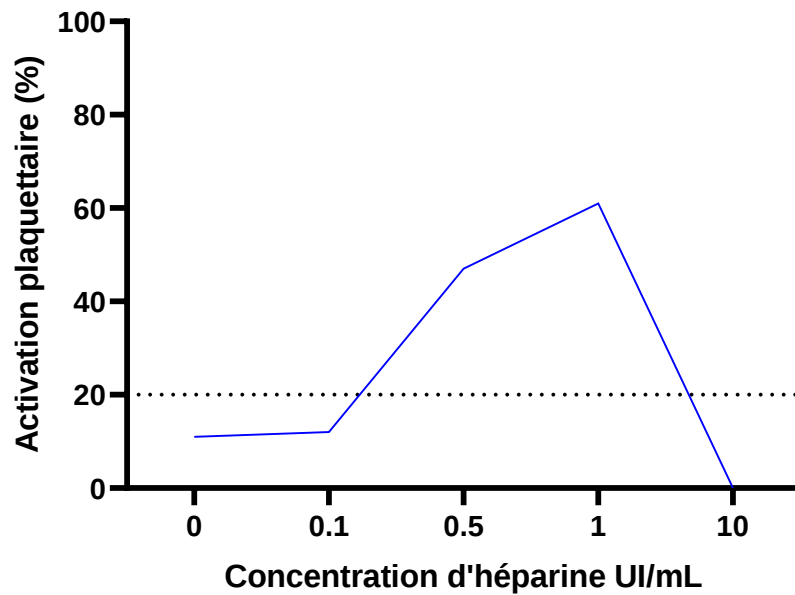
Autre(s) renseignement(s) : Non

Avis des experts :

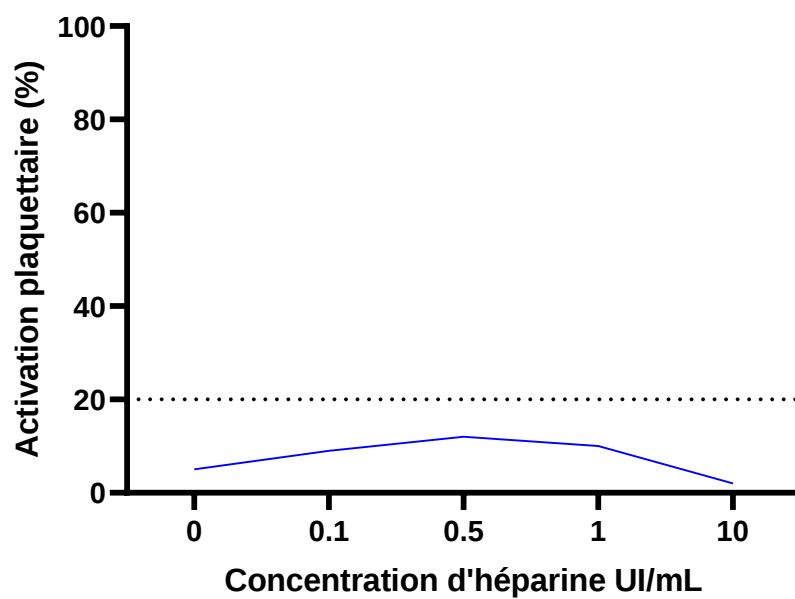
Expert n°1 : Probable

Expert n°2 : Probable

Profil d'activation plaquettaire en SRA-FP4 : (non fournis aux experts pour classification des cas)



Profil d'activation plaquettaire en SRA : (non fournis aux experts pour classification des cas)



Annexe 5

Fiche renseignement suspicion de TIH

Numéro du patient : 3

Sexe : Homme

Age : 85

Etat infectieux : Oui (sans précision)

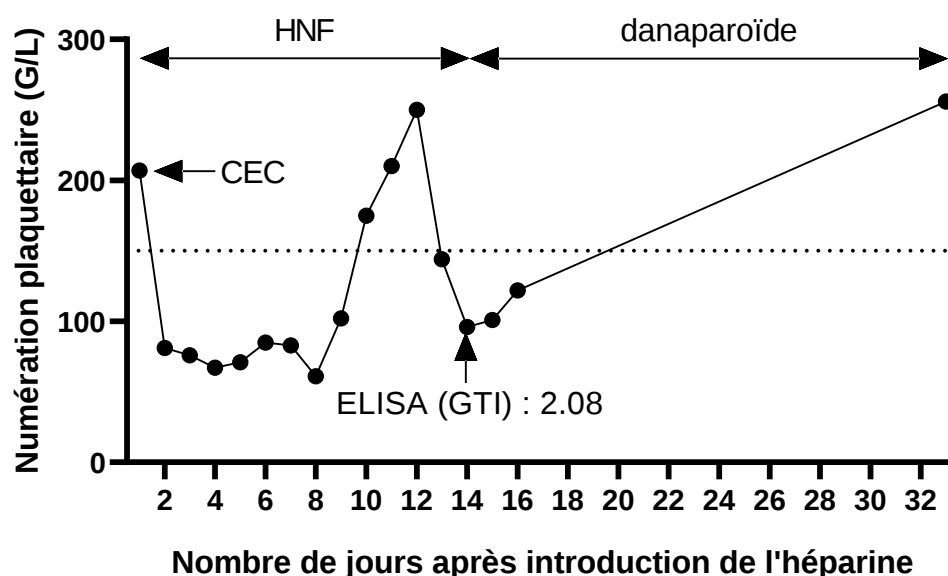
Chirurgie dans les 72h : Non

Médicaments thrombopéniants reçus par le patient : Claforan, Amoxicilline, Méropénème, Colimycine

Indication de l'héparinothérapie : Post-opératoire pour dissection aortique

Type d'héparine reçue : HNF

Probabilité clinique évaluée : Elevé (CEC, biphasique)



Numération plaquettaire au début de l'héparinothérapie : 207 G/L

Numération plaquettaire à la suspicion : 96 G/L

Délai avant suspicion : 14 jours

Nadir de la numération : 61 G/L

Délai du nadir : 8 jours

Pourcentage de chute de la NP au moment de la suspicion : 61,6% (chute de 207 à 96 G/L)

Complication(s) thrombotique(s) : Non

Manifestation(s) atypique(s) : Non

Saignements : Non

CIVD : Non

Test immunologique : ELISA GTI (DO : 2.08)

Anticoagulation alternative : Danaparoïde sodique

Correction de la numération plaquettaire : Oui, 2 jours

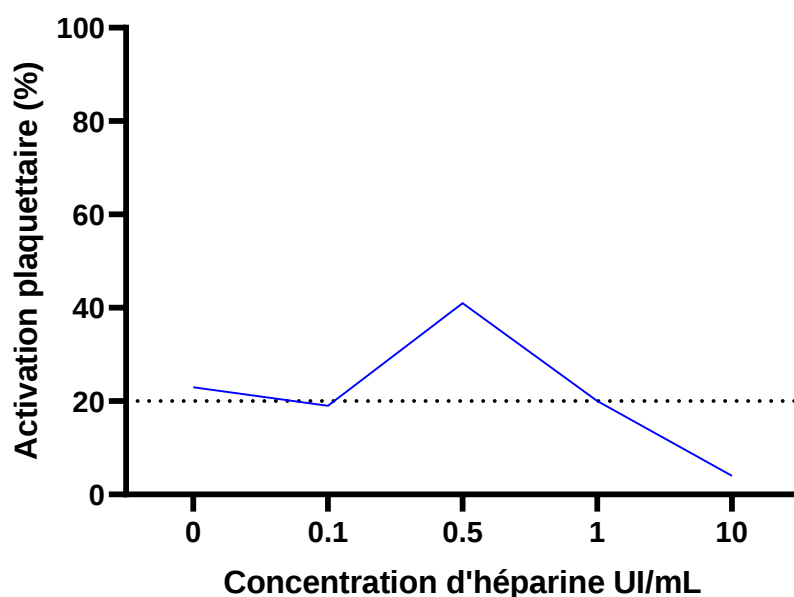
Autre(s) renseignement(s) : Patient dialysé chronique

Avis des experts :

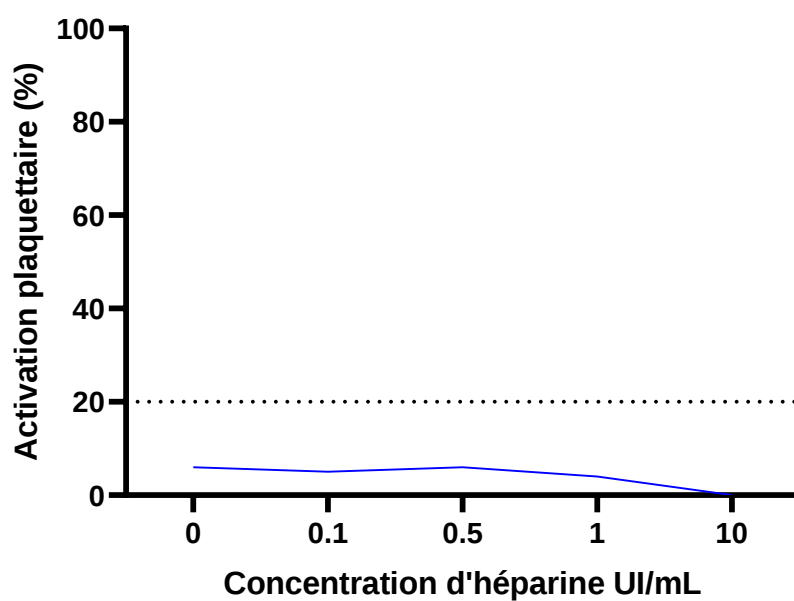
Expert n°1 : Probable

Expert n°2 : Probable

Profil d'activation plaquettaire en SRA-FP4 : (non fournis aux experts pour classification des cas)



Profil d'activation plaquettaire en SRA : (non fournis aux experts pour classification des cas)



Annexe 6

Fiche renseignement suspicion de TIH

Numéro du patient : 4

Sexe : Homme

Age : 68

Etat infectieux : Infection de valve

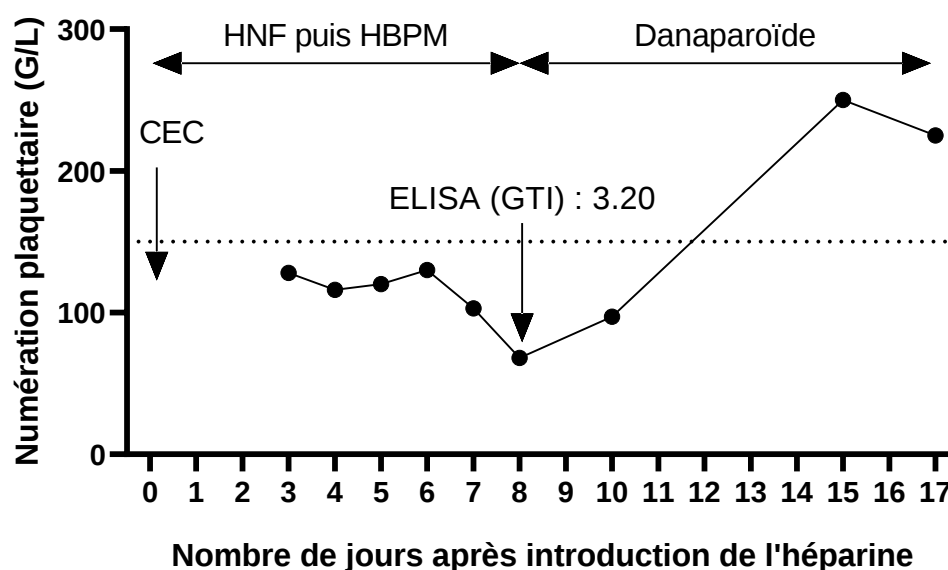
Chirurgie dans les 72h : Non

Médicaments thrombopéniants reçus par le patient : Non renseignés

Indication de l'héparinothérapie : CEC (pose de bioprothèse)

Type d'héparine reçu : HNF et HBPM

Probabilité clinique évaluée : Elevée (CEC, Biphase)



Numération plaquettaire au début de l'héparinothérapie : 128 G/L

Numération plaquettaire à la suspicion : 68 G/L

Délai avant suspicion : 8 jours

Nadir de la numération : 68 G/L

Délai du nadir : 8 jours

Pourcentage de chute de la NP au moment de la suspicion : 46.9%

Complication(s) thrombotique(s) : Non

Manifestation(s) atypique(s) : Non

Saignements : Non

CIVD : Non

Test immunologique : ELISA GTI (DO : 3.20)

Anticoagulation alternative : Danaparoïde sodique

Correction de la numération plaquettaire : Oui, 4 jours

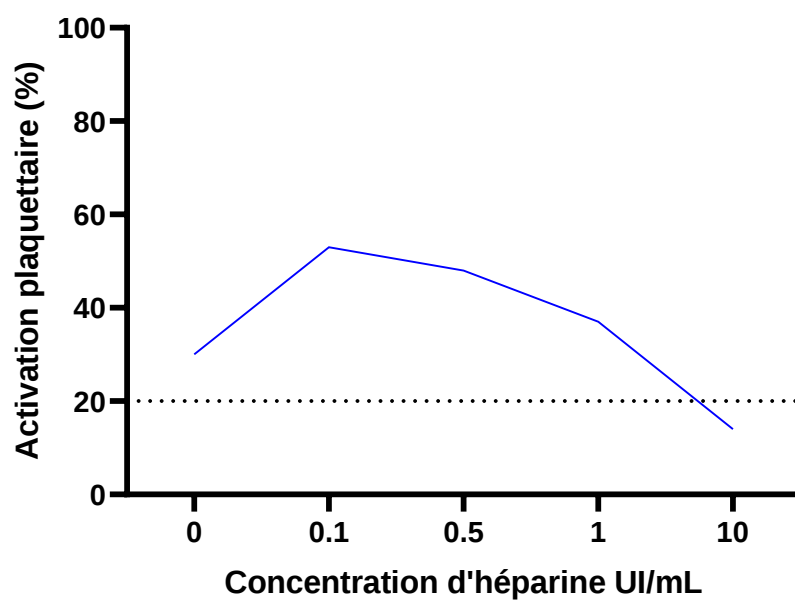
Autre(s) renseignement(s) : Infection de valve et arythmie post-opératoire ayant nécessité la pose de pacemaker (date non renseignée)

Avis des experts :

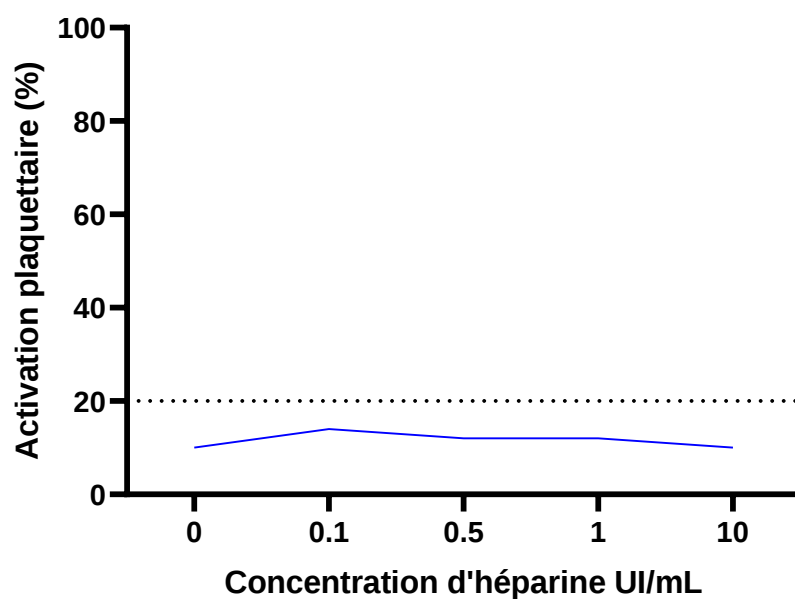
Expert n°1 : Probable

Expert n°2 : Probable

Profil d'activation plaquettaire en SRA-FP4 : (non fournis aux experts pour classification des cas)



Profil d'activation plaquettaire en SRA : (non fournis aux experts pour classification des cas)



Annexe 7

Fiche renseignement suspicion de TIH

Numéro du patient : 5

Sexe : Femme

Age : 70

Etat infectieux : Oui (infection urinaire)

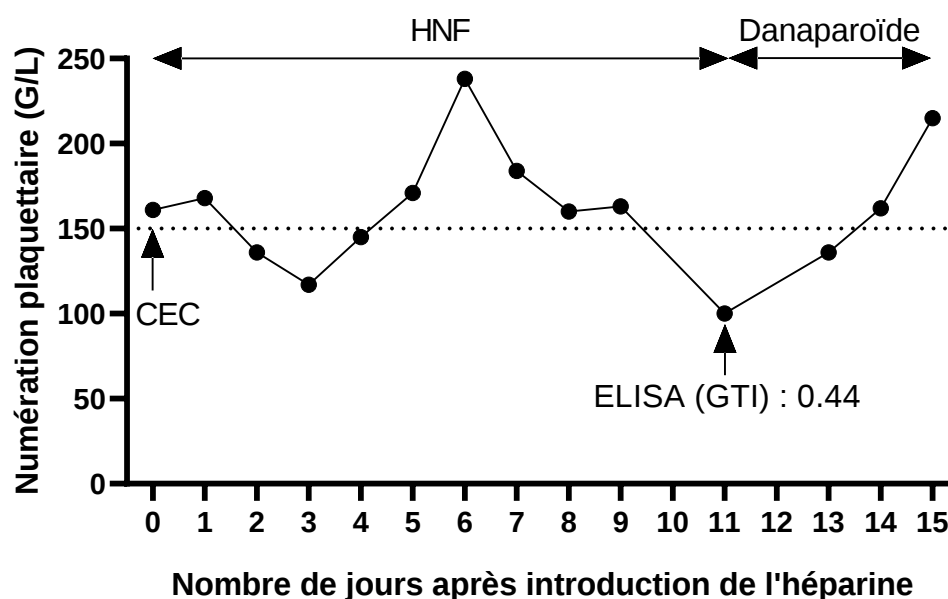
Chirurgie dans les 72h : Non

Médicaments thrombopéniants reçus par le patient : Furosémide, Ciprofloxacine

Indication de l'héparinothérapie : CEC

Type d'héparine reçue : HNF

Probabilité clinique évaluée : Elevée (CEC, Biphase)



Numération plaquettaire au début de l'héparinothérapie : 161 G/L

Numération plaquettaire à la suspicion : 100 G/L **Délai avant suspicion :** 11 jours

Nadir de la numération : 100 G/L

Délai du nadir : 11 jours

Pourcentage de chute de la NP au moment de la suspicion : 58% (chute de 238 à 100 G/L)

Complication(s) thrombotique(s) : Non

Manifestation(s) atypique(s) : Non

Saignements : Non

CIVD : Non

Test immunologique : ELISA GTI (DO : 0.44)

Anticoagulation alternative : Danaparoïde sodique

Correction de la numération plaquettaire : Oui, 3 jours

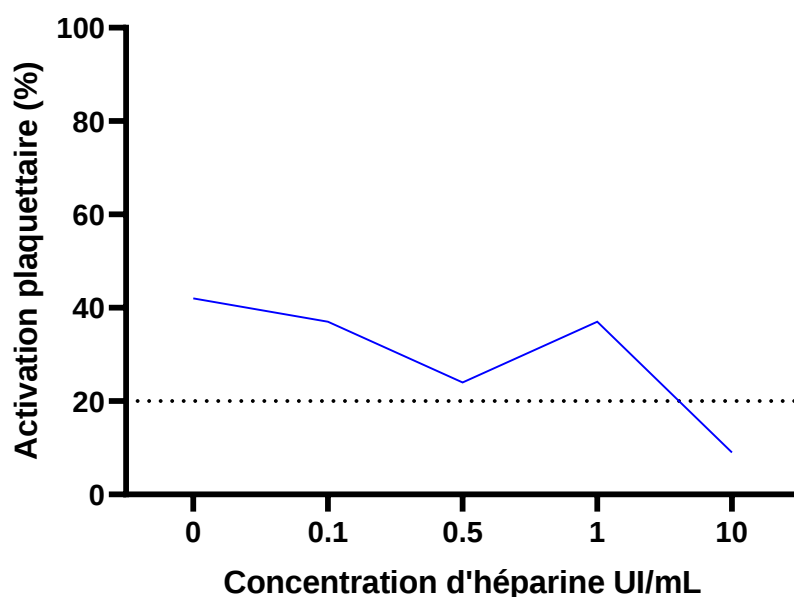
Autre(s) renseignement(s) : Non

Avis des experts :

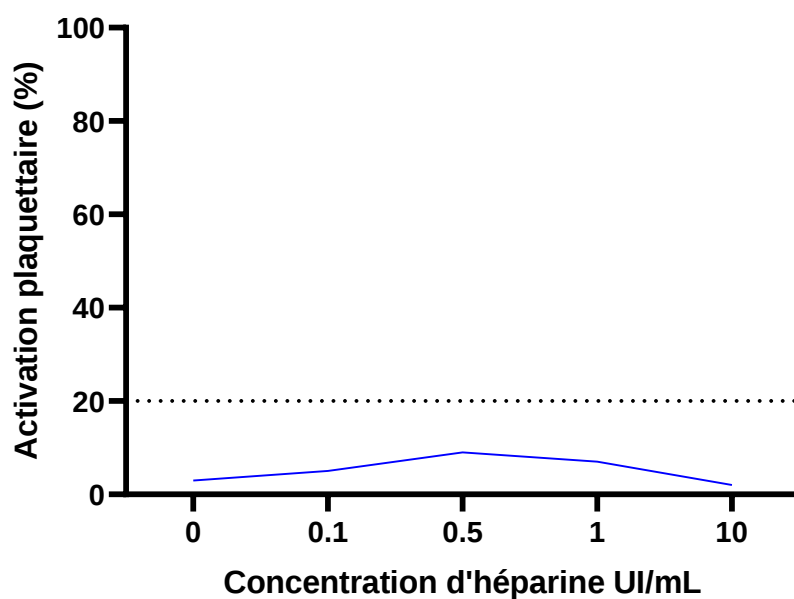
Expert n°1 : Probable

Expert n°2 : Probable

Profil d'activation plaquettaire en SRA-FP4 : (non fournis aux experts pour classification des cas)



Profil d'activation plaquettaire en SRA : (non fournis aux experts pour classification des cas)



Annexe 8

Fiche renseignement suspicion de TIH

Numéro du patient : 6

Sexe : Femme

Age : 89

Etat infectieux : Oui (sans précision)

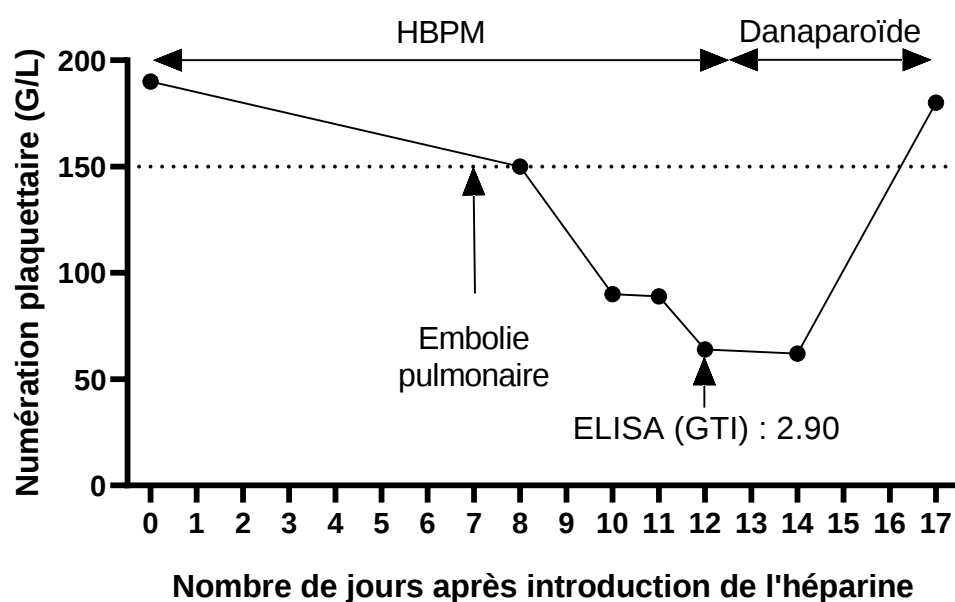
Chirurgie dans les 72h : Non

Médicaments thrombopéniants reçus par le patient : Tazocilline, Amikacine

Indication de l'héparinothérapie : Préventif pour immobilisation suite à un traumatisme

Type d'héparine reçu : HBPM

Probabilité clinique évaluée : Elevée (6)



Numération plaquettaire au début de l'héparinothérapie : 190 G/L

Numération plaquettaire à la suspicion : 64 G/L

Délai avant suspicion : 12 jours

Nadir de la numération : 64 G/L

Délai du nadir : 12 jours

Pourcentage de chute de la NP au moment de la suspicion : 66.3%

Complication(s) thrombotique(s) : Embolie pulmonaire

Manifestation(s) atypique(s) : Non

Saignements : Non

CIVD : Non

Test immunologique : ELISA GTI (DO : 2.90)

Anticoagulation alternative : Danaparoïde sodique

Correction de la numération plaquettaire : Oui, 3 jours

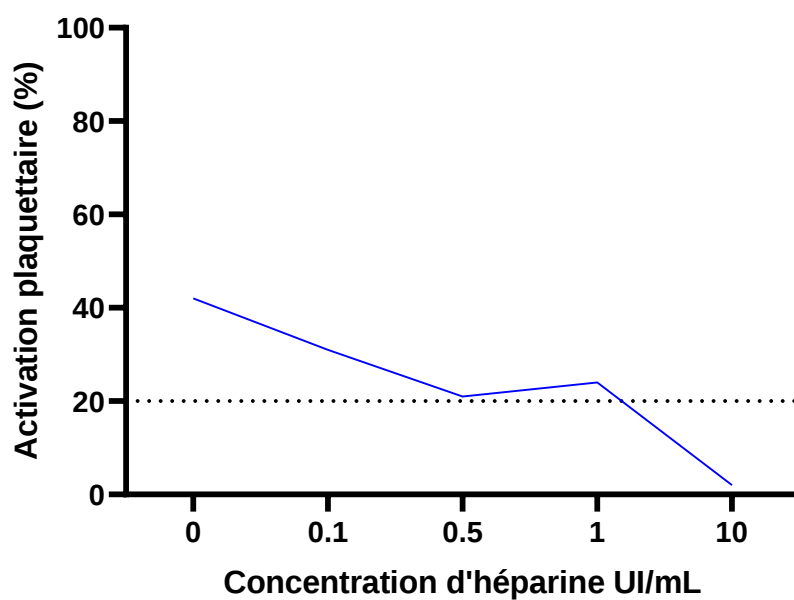
Autre(s) renseignement(s) : Patient décédé.

Avis des experts :

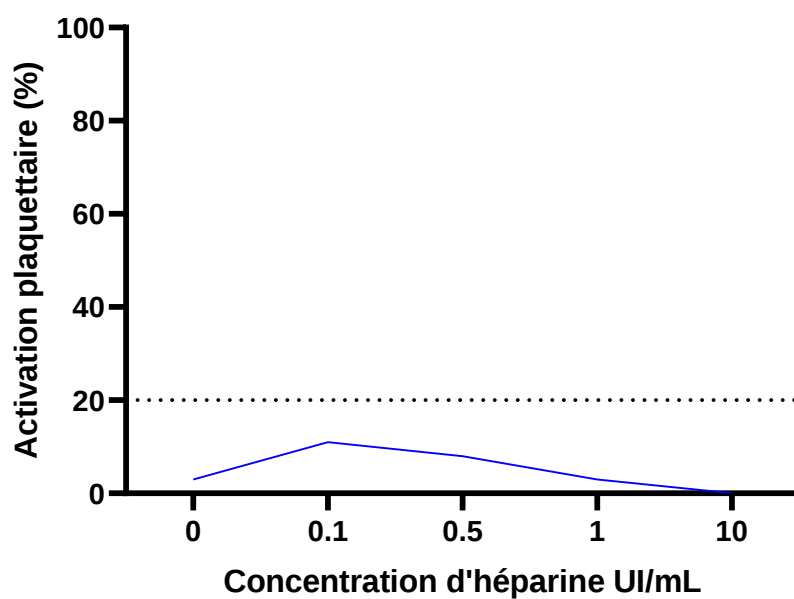
Expert n°1 : Probable

Expert n°2 : Probable

Profil d'activation plaquettaire en SRA-FP4 : (non fournis aux experts pour classification des cas)



Profil d'activation plaquettaire en SRA : (non fournis aux experts pour classification des cas)



Annexe 9

Fiche renseignement suspicion de TIH

Numéro du patient : 7

Sexe : Femme

Age : 51

Etat infectieux : Non

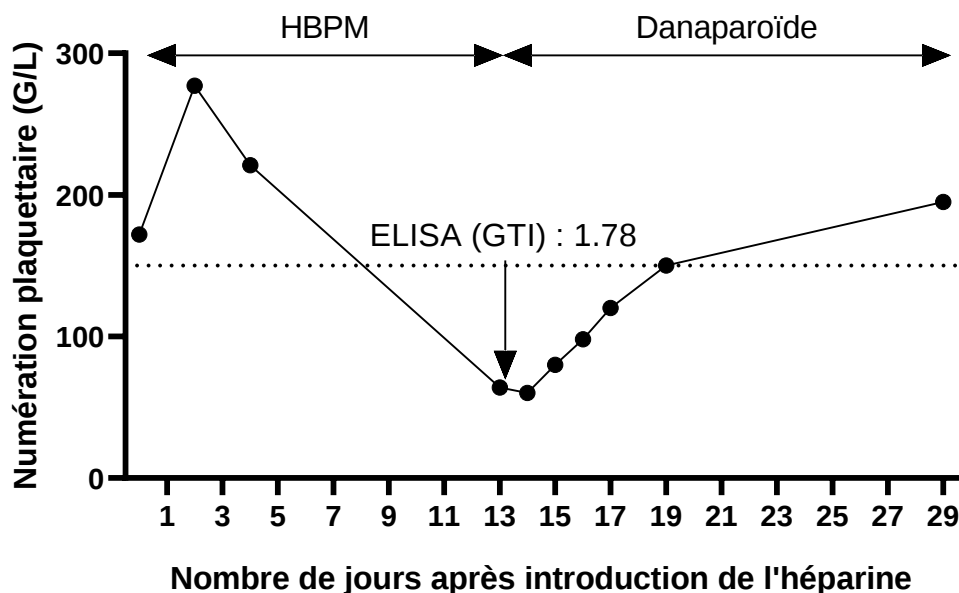
Chirurgie dans les 72h : Non

Médicaments thrombopéniants reçus par le patient : Non

Indication de l'héparinothérapie : Thrombose porte (contexte de thrombocytémie essentielle)

Type d'héparine reçu : HBPM

Probabilité clinique évaluée : Elevée (7)



Numération plaquettaire au début de l'héparinothérapie : 172 G/L

Numération plaquettaire à la suspicion : 64 G/L **Délai avant suspicion :** 13 jours

Nadir de la numération : 64 G/L

Délai du nadir : 13 jours

Pourcentage de chute de la NP au moment de la suspicion : 76.9% (chute de 277 à 64 G/L)

Complication(s) thrombotique(s) : Non

Manifestation(s) atypique(s) : Non

Saignements : Non

CIVD : Non

Test immunologique : ELISA GTI (DO : 1.78)

Anticoagulation alternative : danaparoïde sodique

Correction de la numération plaquettaire : Oui, 6 jours

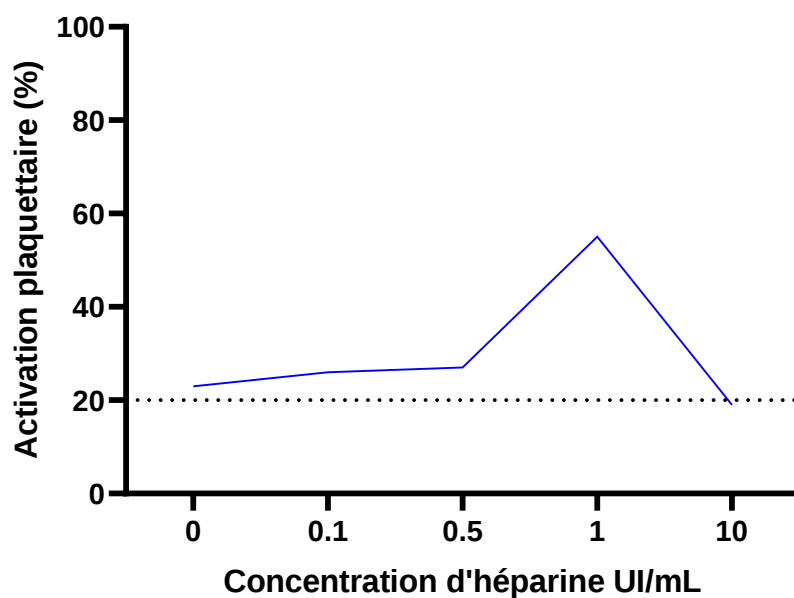
Autre(s) renseignement(s) : Non

Avis des experts :

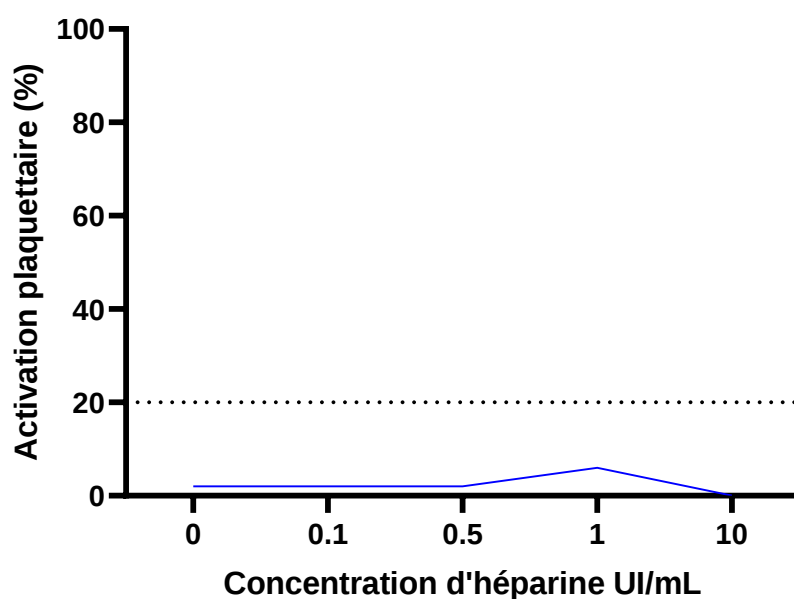
Expert n°1 : Probable

Expert n°2 : Probable

Profil d'activation plaquettaire en SRA-FP4 : (non fournis aux experts pour classification des cas)



Profil d'activation plaquettaire en SRA : (non fournis aux experts pour classification des cas)



Annexe 10

Fiche renseignement suspicion de TIH

Numéro du patient : 8

Sexe : Femme

Age : 56

Etat infectieux : Non

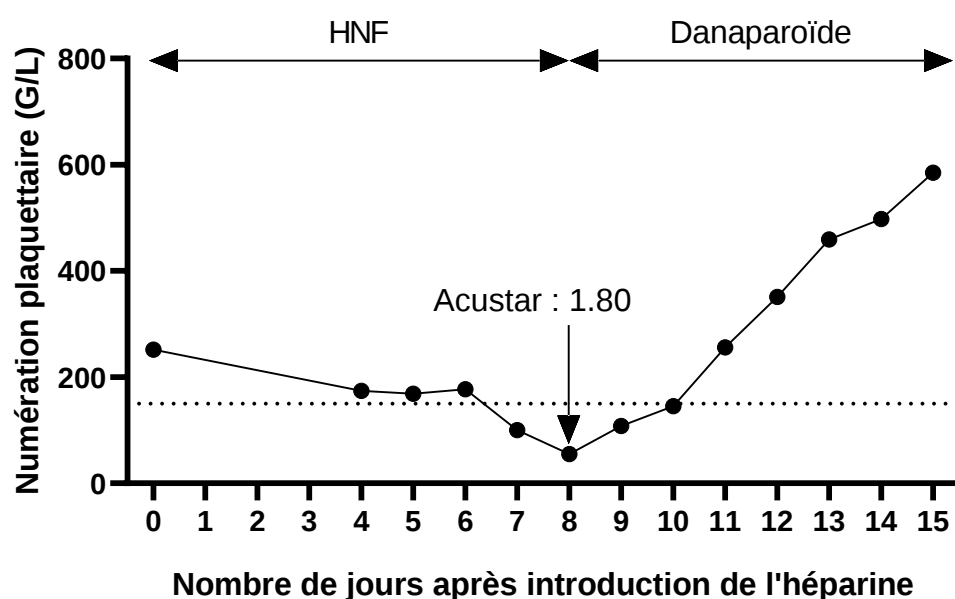
Chirurgie dans les 72h : Non

Médicaments thrombopéniants reçus par le patient : Non

Indication de l'héparinothérapie : Post-opératoire sans précision

Type d'héparine reçu : HNF

Probabilité clinique : Elevé (6)



Numération plaquettaire au début de l'héparinothérapie : 252 G/L

Numération plaquettaire à la suspicion : 55 G/L Délai avant suspicion : 8 jours

Nadir de la numération : 55 G/L

Délai du nadir : 8 jours

Pourcentage de chute de la NP au moment de la suspicion : 78.2%

Complication(s) thrombotique(s) : Thrombose de la veine cave

Manifestation(s) atypique(s) : Non

Saignements : Non

CIVD : Non

Test immunologique : Acustar (1.80)

Anticoagulation alternative : Danaparoïde sodique

Correction de la numération plaquettaire : Oui, 3 jours

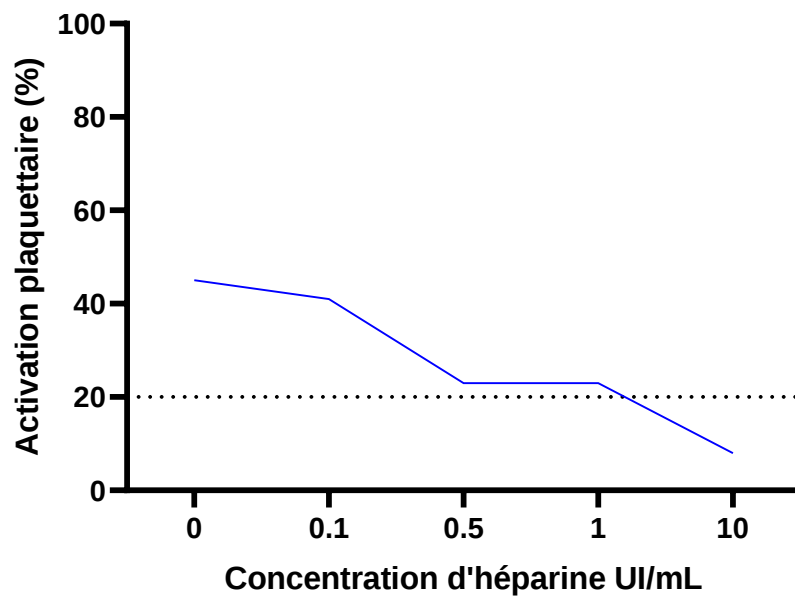
Autre(s) renseignement(s) : Antécédent de CEC pour ablation de tumeur de l'oreillette droite.

Avis des experts :

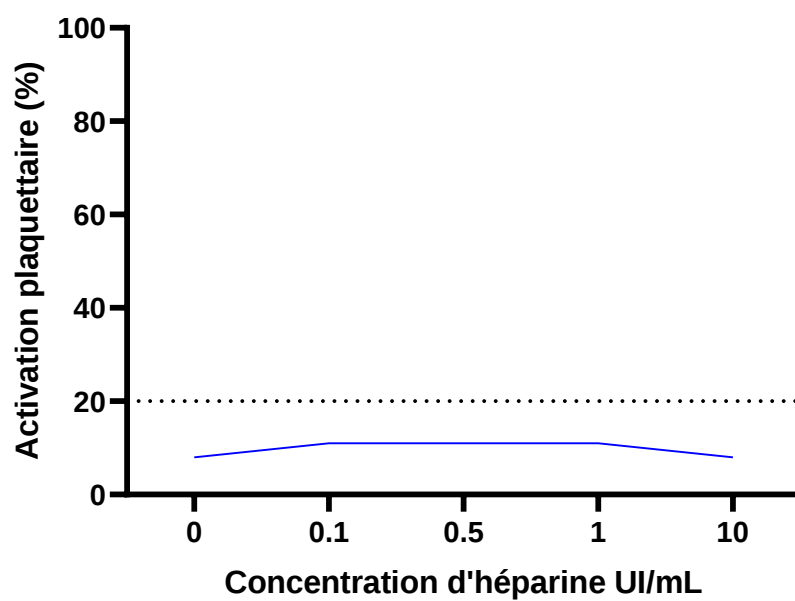
Expert n°1 : Probable

Expert n°2 : Probable

Profil d'activation plaquettaire en SRA-FP4 : (non fournis aux experts pour classification des cas)



Profil d'activation plaquettaire en SRA : (non fournis aux experts pour classification des cas)



Annexe 11

Fiche renseignement suspicion de TIH

Numéro du patient : 9

Sexe : Homme

Age : 50

Etat infectieux : COVID

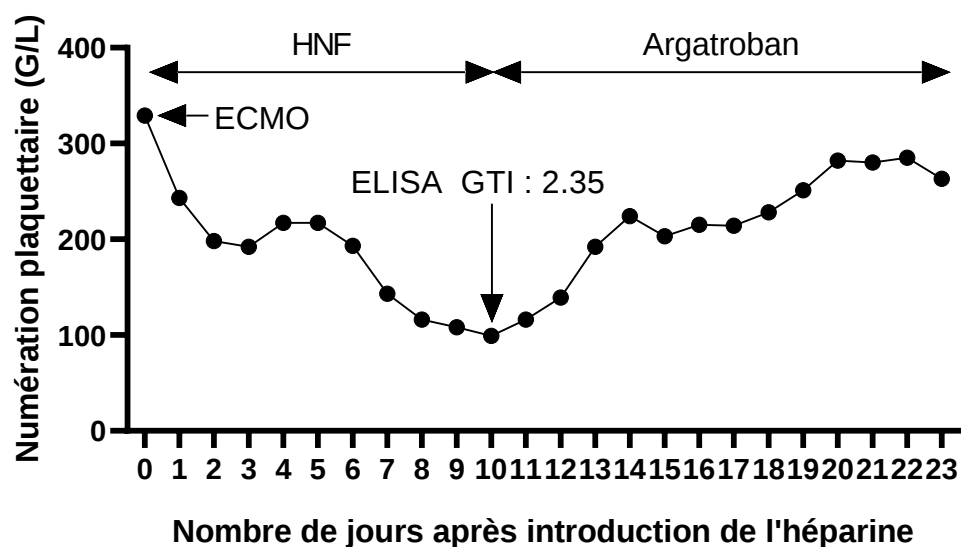
Chirurgie dans les 72h : Non

Médicaments thrombopéniants reçus par le patient : Tazocilline, Ruxolitinib, Tocilizumab

Indication de l'héparinothérapie : COVID et ECMO

Type d'héparine reçu : HNF

Probabilité clinique évaluée : Elevée (ECMO)



Numération plaquettaire au début de l'héparinothérapie : 329 G/L

Numération plaquettaire à la suspicion : 99 G/L Délai avant suspicion : 10 jours

Nadir de la numération : 99 G/L Délai du nadir : 10 jours

Pourcentage de chute de la NP au moment de la suspicion : 69.9%

Complication(s) thrombotique(s) : Thrombose du filtre de l'ECMO

Manifestation(s) atypique(s) : Non

Saignements : Non

CIVD : Non

Test immunologique : ELISA GTI (2.35)

Anticoagulation alternative : Argatroban

Correction de la numération plaquettaire : Oui, 10 jours

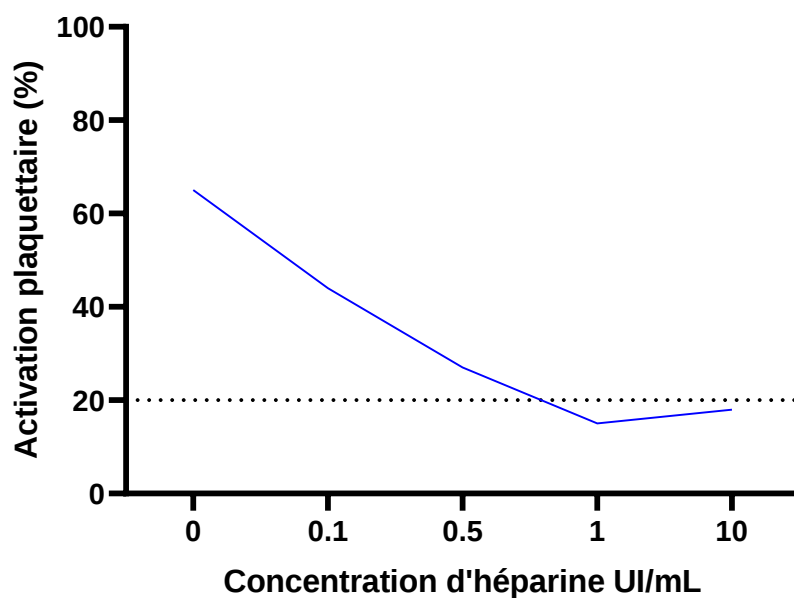
Autre(s) renseignement(s) : Non

Avis des experts :

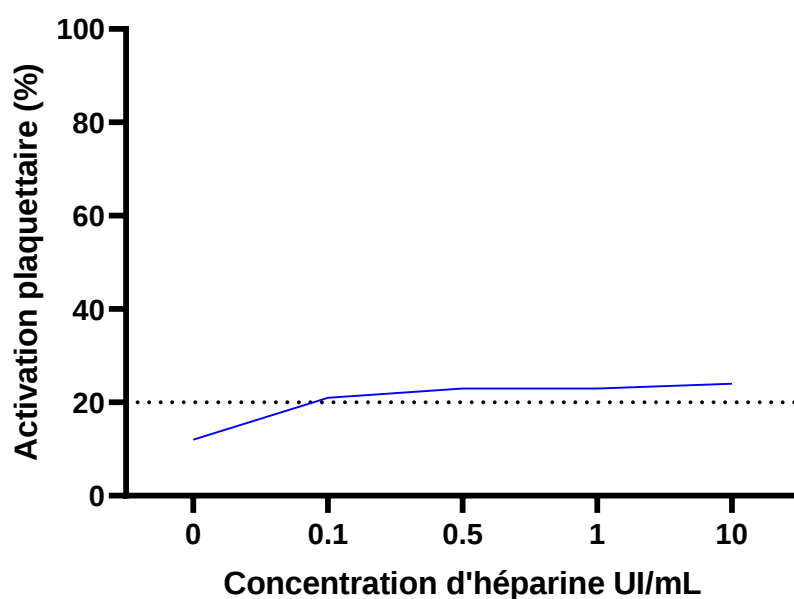
Expert n°1 : Probable

Expert n°2 : Probable

Profil d'activation plaquettaire en SRA-FP4 : (non fournis aux experts pour classification des cas)



Profil d'activation plaquettaire en SRA : (non fournis aux experts pour classification des cas)



Annexe 12

Fiche renseignement suspicion de TIH

Numéro du patient : 10

Sexe : Femme

Age : 60

Etat infectieux : Non

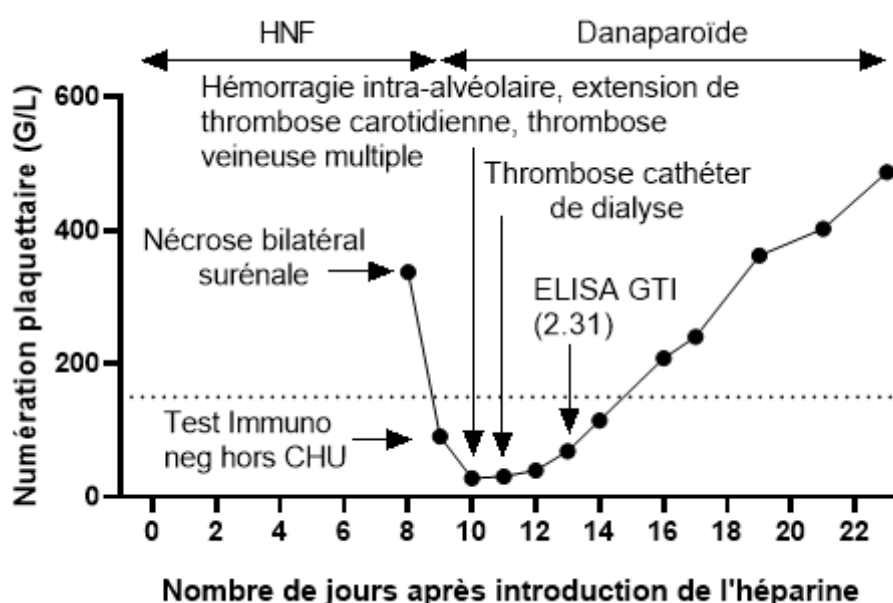
Chirurgie dans les 72h : Non

Médicaments thrombopéniants reçus par le patient : Pravastatine

Indication de l'héparinothérapie : Thrombose artérielle secondaire à une dissection de la carotide

Type d'héparine reçu : HNF

Probabilité clinique évaluée : Elevée (6)



Numération plaquettaire au début de l'héparinothérapie : 337 G/L

Numération plaquettaire à la suspicion : 91 G/L Délai avant suspicion : 9 jours

Nadir de la numération : 91 G/L

Délai du nadir : 9 jours

Pourcentage de chute de la NP au moment de la suspicion : 73%

Complication(s) thrombotique(s) : Thrombose aorte abdominale, thrombose veineuse multiple, extension de thrombose carotidienne, thrombose de cathéter de dialyse

Manifestation(s) atypique(s) : Nécrose bilatérale surrénale, hémorragie intra-alvéolaire

Saignements : Non

CIVD : Non

Test immunologique : ELISA (DO : 2.31)

Anticoagulation alternative : Danaparoïde sodique

Correction de la numération plaquettaire : 7 jours

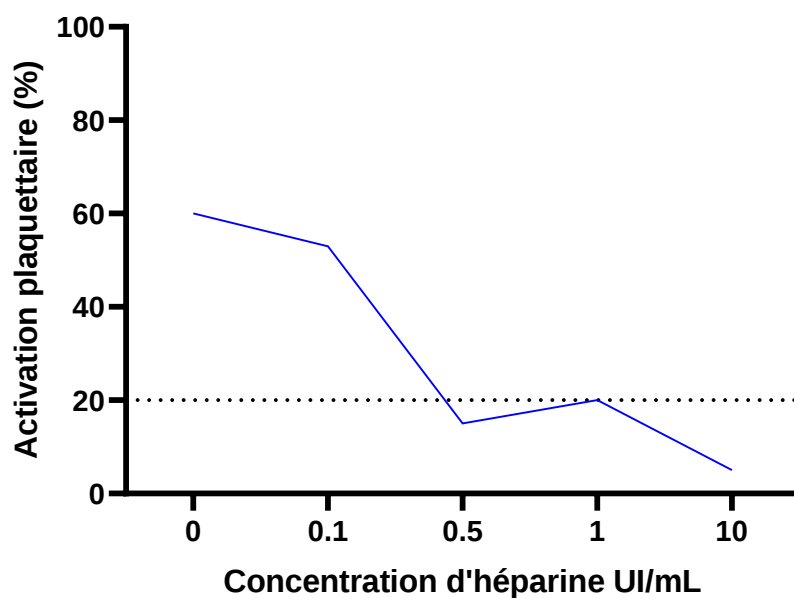
Autre(s) renseignement(s) : SAPL

Avis des experts :

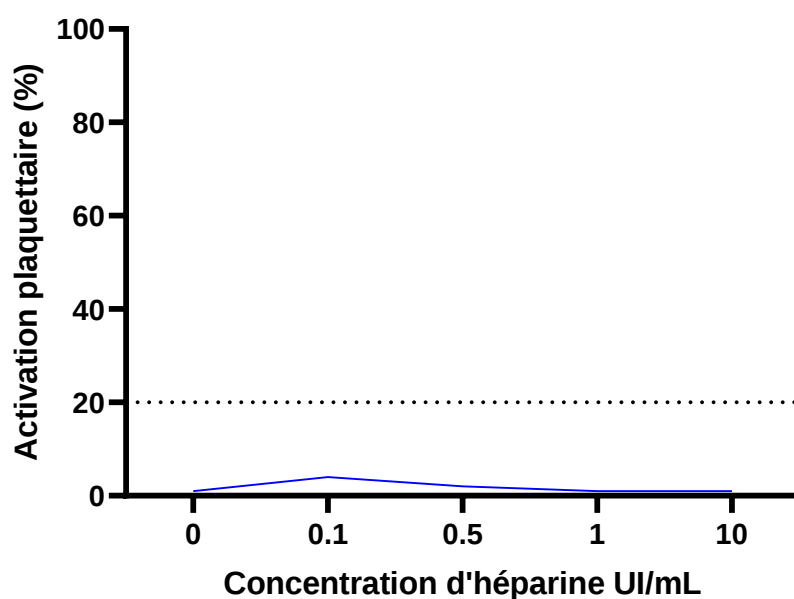
Expert n°1 : Probable

Expert n°2 : Probable

Profil d'activation plaquettaire en SRA-FP4 : (non fournis aux experts pour classification des cas)



Profil d'activation plaquettaire en SRA : (non fournis aux experts pour classification des cas)



Annexe 13

Fiche renseignement suspicion de TIH

Numéro du patient : 11

Sexe : Homme

Age : 65

Etat infectieux : Non renseigné

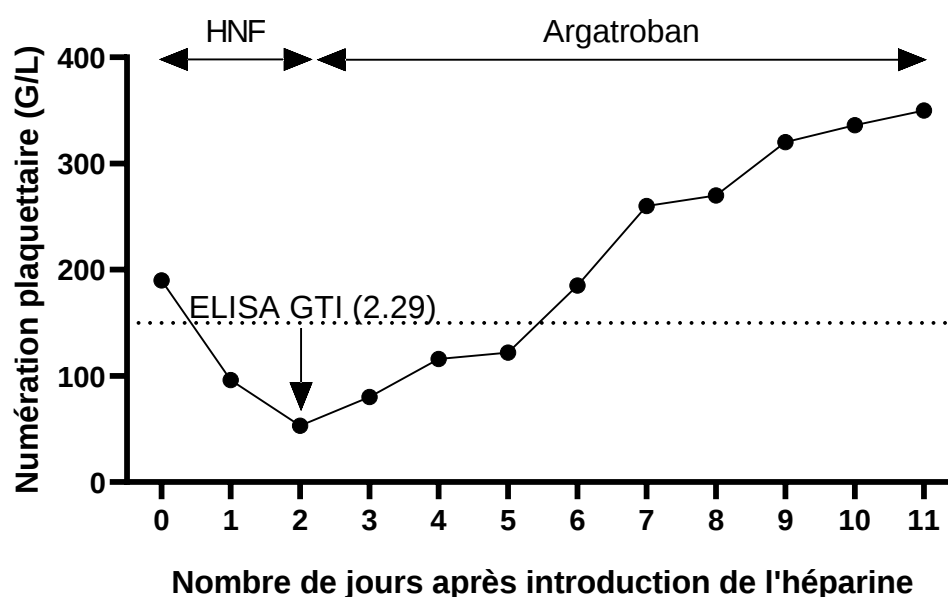
Chirurgie dans les 72h : Non renseignée

Médicaments thrombopéniants reçus par le patient : Non renseignés

Indication de l'héparinothérapie : Post-opératoire pour réimplantation de l'artère mésentérique supérieur (et exposition fréquente par dialyse 3 fois par semaine)

Type d'héparine reçu : HNF

Probabilité clinique évaluée : Modérée (4)



Numération plaquettaire au début de l'héparinothérapie : 190 G/L

Numération plaquettaire à la suspicion : 56 G/L

Délai avant suspicion : 2 jours

Nadir de la numération : 56 G/L

Délai du nadir : 2 jours

Pourcentage de chute de la NP au moment de la suspicion : 70.5%

Complication(s) thrombotique(s) : Non

Manifestation(s) atypique(s) : Non

Saignements : Non

CIVD : Non

Test immunologique : ELISA GTI (DO : 2.29)

Anticoagulation alternative : Argatroban

Correction de la numération plaquettaire : Oui, 2 jours

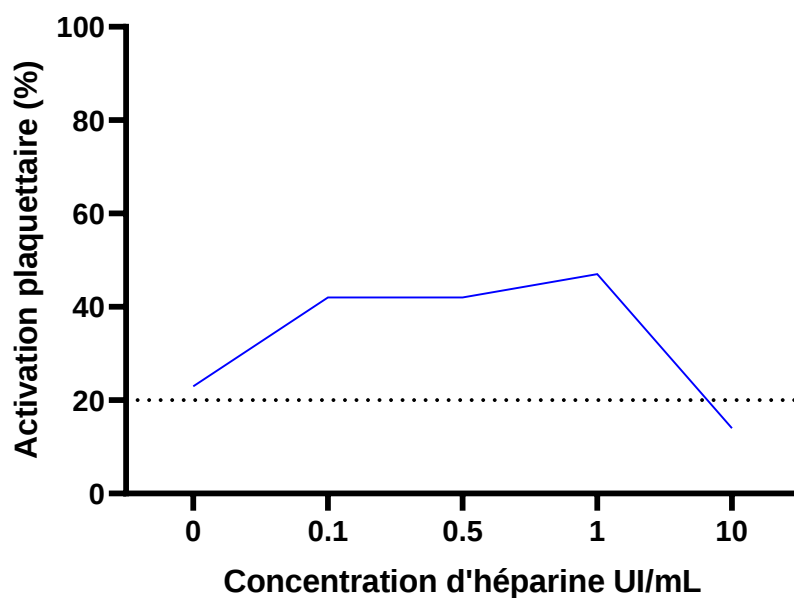
Autre(s) renseignement(s) : Non

Avis des experts :

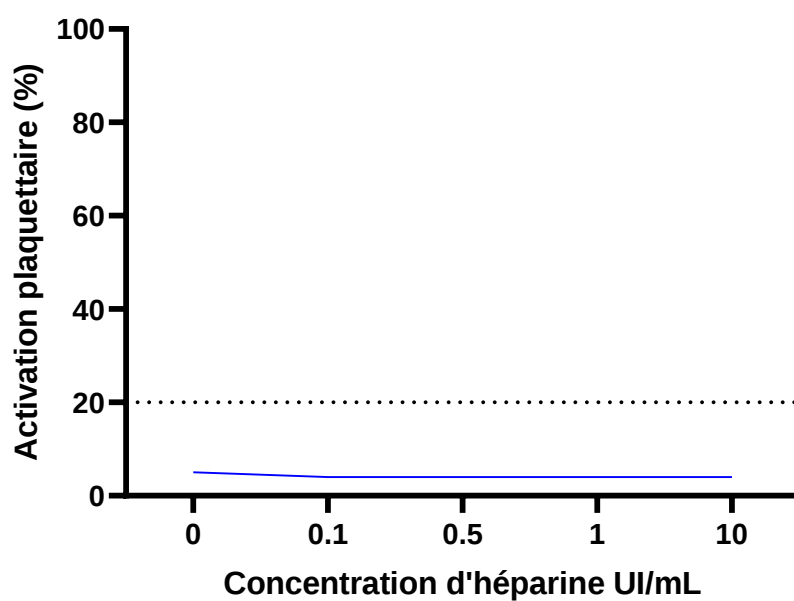
Expert n°1 : Probable

Expert n°2 : Probable

Profil d'activation plaquettaire en SRA-FP4 : (non fournis aux experts pour classification des cas)



Profil d'activation plaquettaire en SRA : (non fournis aux experts pour classification des cas)



Annexe 14

Fiche renseignement suspicion de TIH

Numéro du patient : 12

Sexe : Femme

Age : 62

Etat infectieux : Non

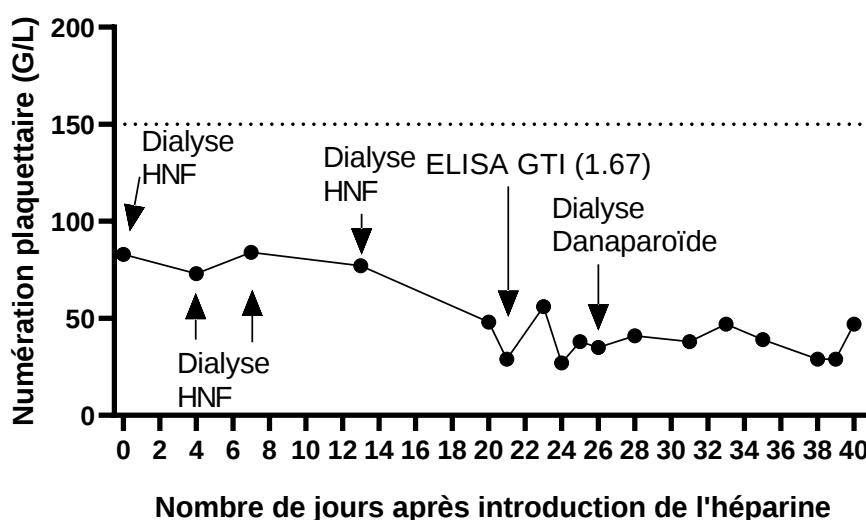
Chirurgie dans les 72h : Non

Médicaments thrombopéniants reçus par le patient : Non

Indication de l'héparinothérapie : Dialyse

Type d'héparine reçu : HNF (Dans le circuit de dialyse)

Probabilité clinique évaluée : Modéré (4)



Numération plaquettaire au début de l'héparinothérapie : 83 G/L

Numération plaquettaire à la suspicion : 27 G/L

Délai avant suspicion : 24 jours

Nadir de la numération : 27 G/L

Délai du nadir : 24 jours

Pourcentage de chute de la NP au moment de la suspicion : 67,4%

Complication(s) thrombotique(s) : Non

Manifestation(s) atypique(s) : Non

Saignements : Non

CIVD : Non

Test immunologique : ELISA GTI (DO : 1.67)

Anticoagulation alternative : Danaparoïde sodique (dans le circuit de dialyse)

Correction de la numération plaquettaire : Non

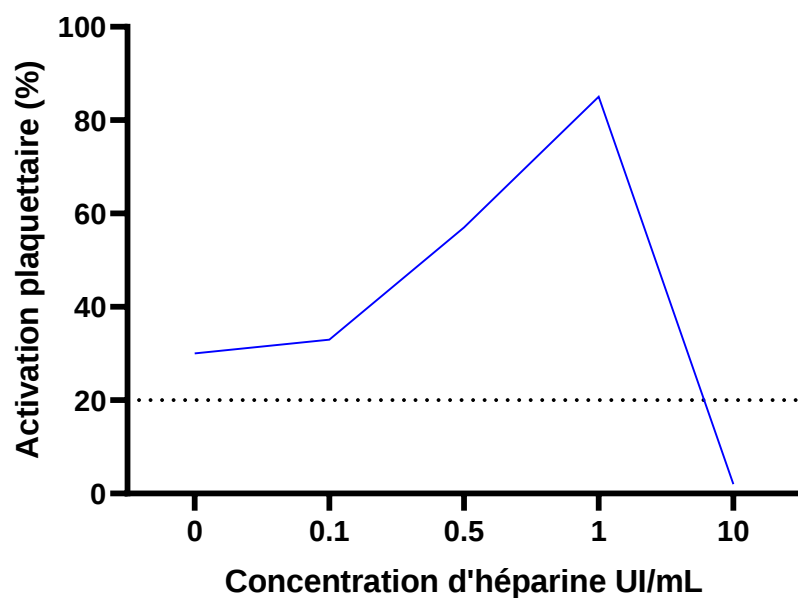
Autre(s) renseignement(s) : Syndrome hépatorénal sur décompensation oedémato-ascitique

Avis des experts :

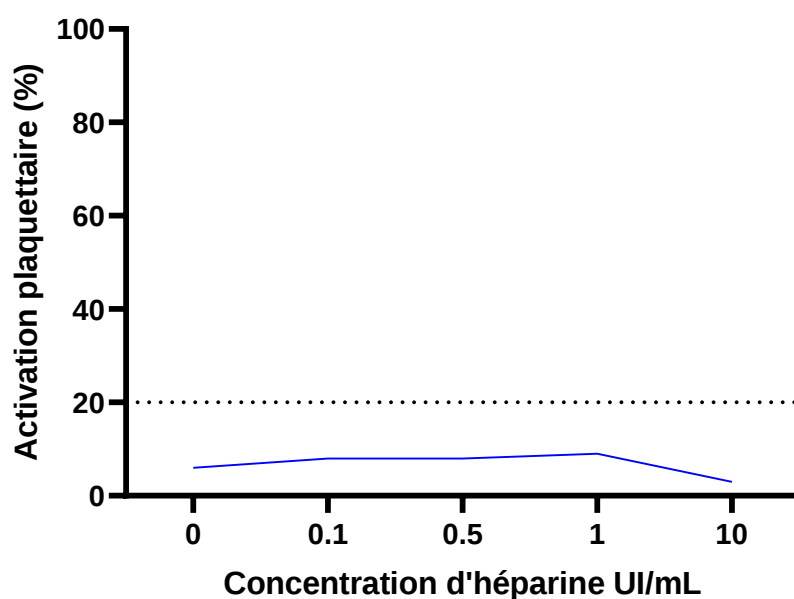
Expert n°1 : Possible

Expert n°2 : Possible

Profil d'activation plaquettaire en SRA-FP4 : (non fournis aux experts pour classification des cas)



Profil d'activation plaquettaire en SRA : (non fournis aux experts pour classification des cas)



Annexe 15

Fiche renseignement suspicion de TIH

Numéro du patient : 13

Sexe : Homme

Age : 56

Etat infectieux : Sepsis documenté

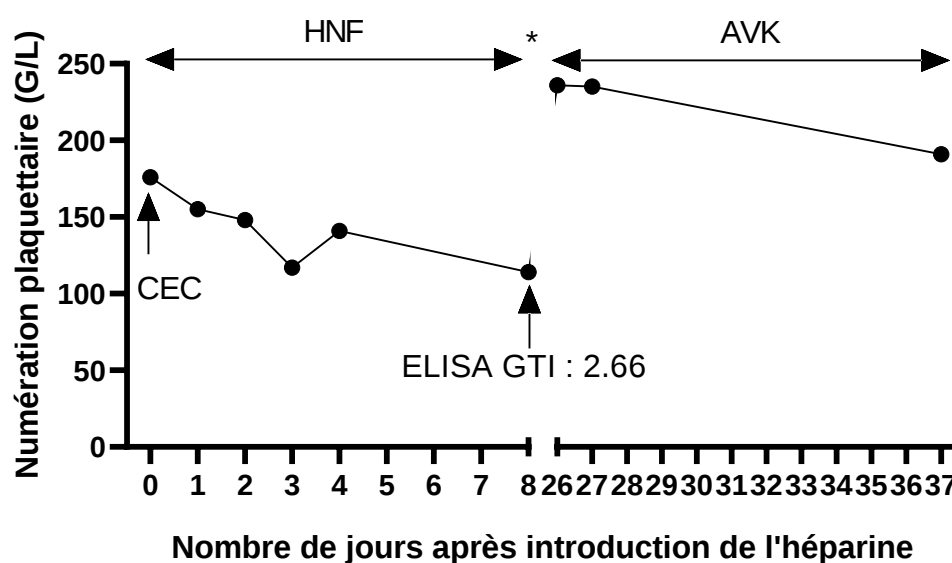
Chirurgie dans les 72h : Non

Médicaments thrombopéniants reçus par le patient : Non

Indication de l'héparinothérapie : CEC

Type d'héparine reçu : HNF

Probabilité clinique évaluée : Modérée (CEC, monophasique)



* Perte de vue du patient, hors CHU

Numération plaquettaire au début de l'héparinothérapie : 176 G/L

Numération plaquettaire à la suspicion : 114 G/L **Délai avant suspicion :** 8 jours

Nadir de la numération : 114 G/L

Délai du nadir : 8 jours

Pourcentage de chute de la NP au moment de la suspicion : 35.2%

Complication(s) thrombotique(s) : Non

Manifestation(s) atypique(s) : Non

Saignements : Non

CIVD : Non

Test immunologique : ELISA GTI (DO : 2.66)

Anticoagulation alternative : Non renseignée

Correction de la numération plaquettaire : Oui, délai non renseigné

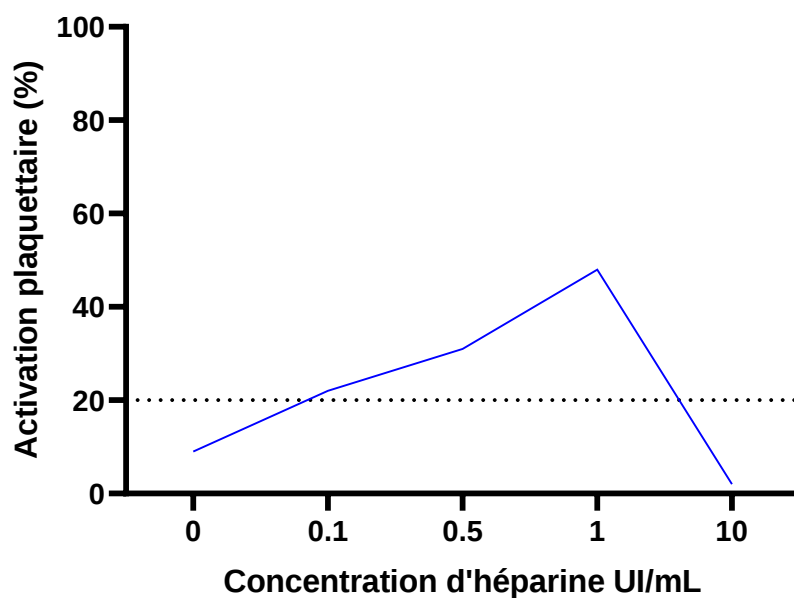
Autre(s) renseignement(s) : Perte de vue du patient après diagnostique (transféré hors du CHU)

Avis des experts :

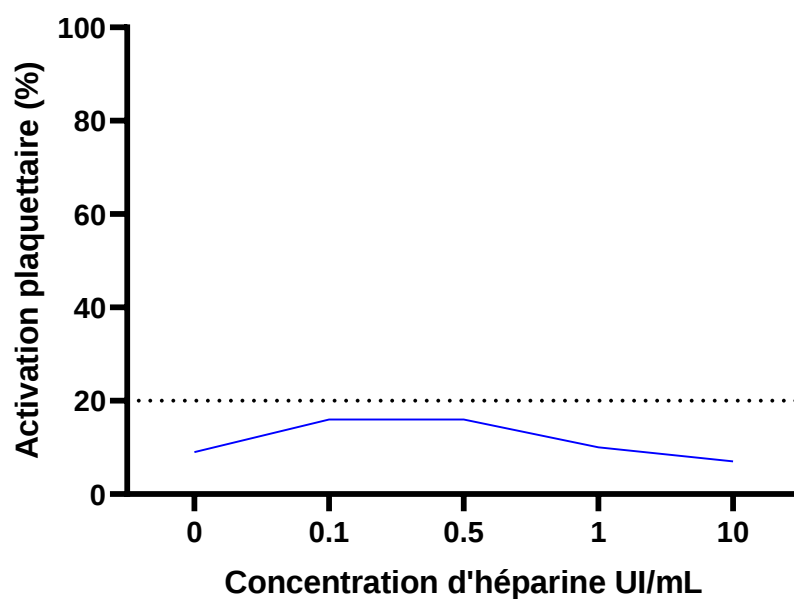
Expert n°1 : Possible

Expert n°2 : Possible

Profil d'activation plaquettaire en SRA-FP4 : (non fournis aux experts pour classification des cas)



Profil d'activation plaquettaire en SRA : (non fournis aux experts pour classification des cas)



Annexe 16

Fiche renseignement suspicion de TIH

Numéro du patient : 14

Sexe : Homme

Age : 63

Etat infectieux : Non

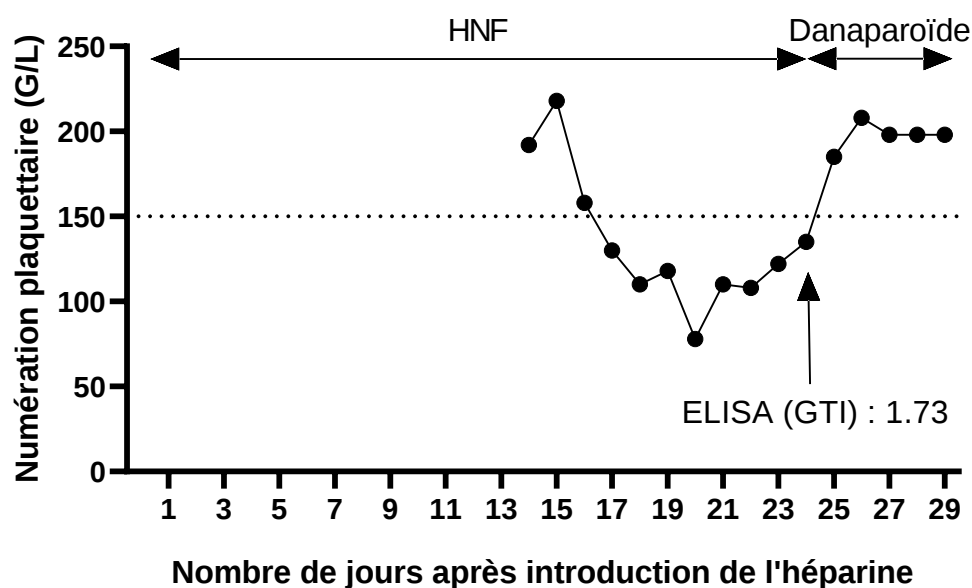
Chirurgie dans les 72h : Non

Médicaments thrombopéniants reçus par le patient : Non

Indication de l'héparinothérapie : Prophylaxie de la MTEV (ACFA)

Type d'héparine reçue : HNF

Probabilité clinique évaluée : Modérée (4)



Numération plaquettaire au début de l'héparinothérapie : 218 G/L

Numération plaquettaire à la suspicion : 138 G/L **Délai avant suspicion :** 24 jours

Nadir de la numération : 78 G/L

Délai du nadir : 20 jours

Pourcentage de chute de la NP au moment de la suspicion : 36.7%

Complication(s) thrombotique(s) : Oui, sans précision

Manifestation(s) atypique(s) : Non

Saignements : Non

CIVD : Non

Test immunologique : ELISA GTI (DO : 1.73)

Anticoagulation alternative : Danaparoïde sodique

Correction de la numération plaquettaire : Oui, 6 jours

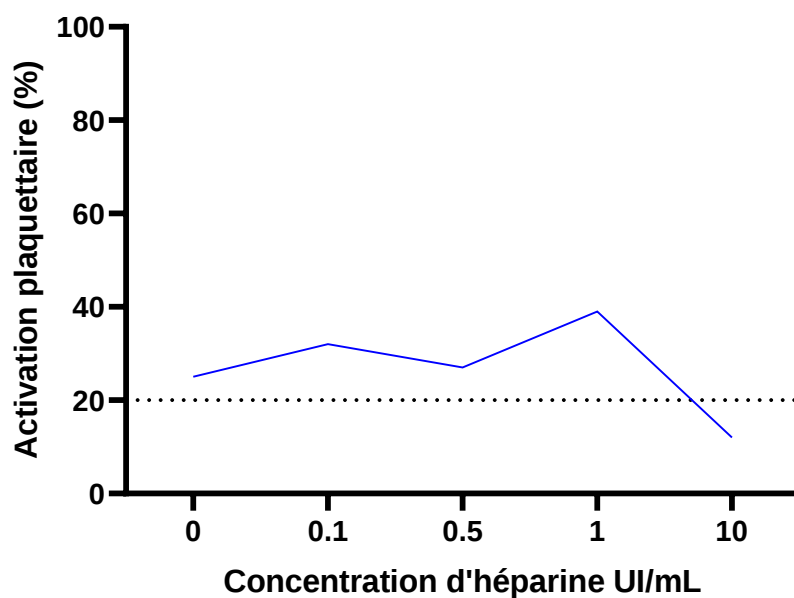
Autre(s) renseignement(s) : Absence d'information sur la numération plaquettaire au début du traitement par héparine

Avis des experts :

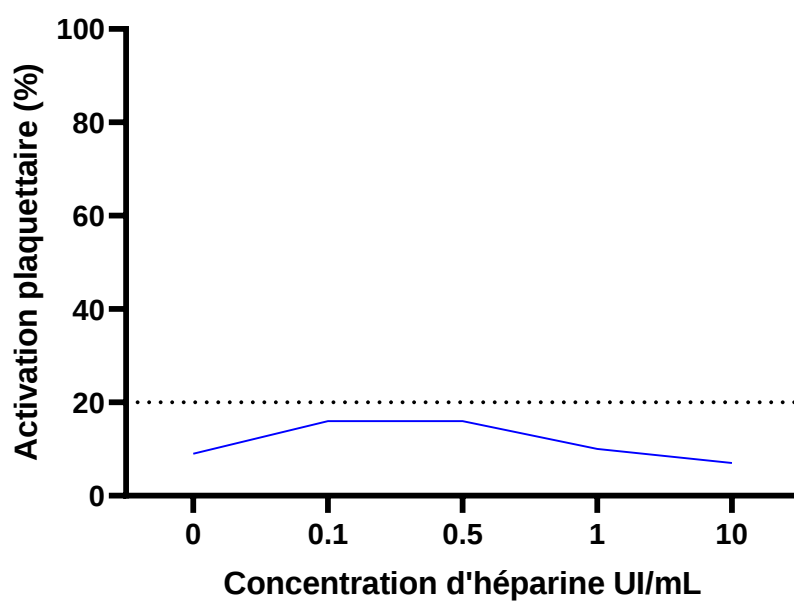
Expert n°1 : Possible

Expert n°2 : Possible

Profil d'activation plaquettaire en SRA-FP4 : (non fournis aux experts pour classification des cas)



Profil d'activation plaquettaire en SRA : (non fournis aux experts pour classification des cas)



Annexe 17

Fiche renseignement suspicion de TIH

Numéro du patient : 15

Sexe : Femme

Age : 70

Etat infectieux : Non

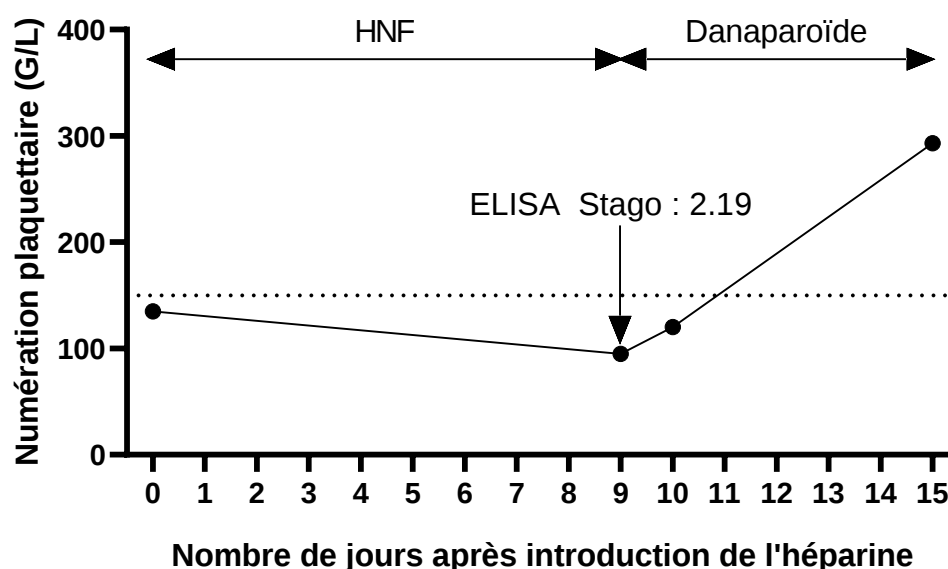
Chirurgie dans les 72h : Non

Médicaments thrombopéniants reçus par le patient : Non

Indication de l'héparinothérapie : Post-opératoire pour prothèse du genou

Type d'héparine reçu : HNF

Probabilité clinique évaluée : Modérée (4)



Numération plaquettaire au début de l'héparinothérapie : 132 G/L

Numération plaquettaire à la suspicion : 95 G/L

Délai avant suspicion : 9 jours

Nadir de la numération : 95 G/L

Délai du nadir : 9 jours

Pourcentage de chute de la NP au moment de la suspicion : 28.0%

Complication(s) thrombotique(s) : Non

Manifestation(s) atypique(s) : Non

Saignements : Hémarthrose sur PTG

CIVD : Non

Test immunologique : ELISA GTI (DO : 2.19)

Anticoagulation alternative : Danaparoïde sodique

Correction de la numération plaquettaire : Oui, 6 jours

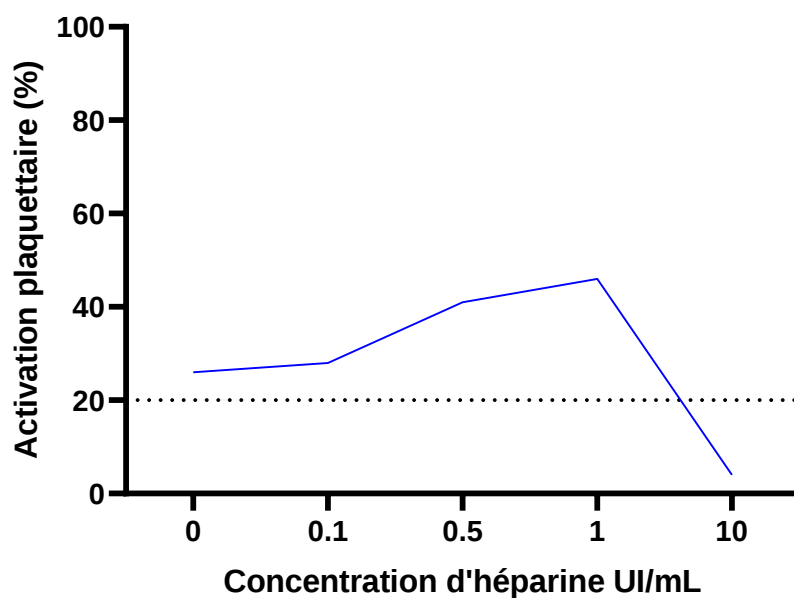
Autre(s) renseignement(s) : Non

Avis des experts :

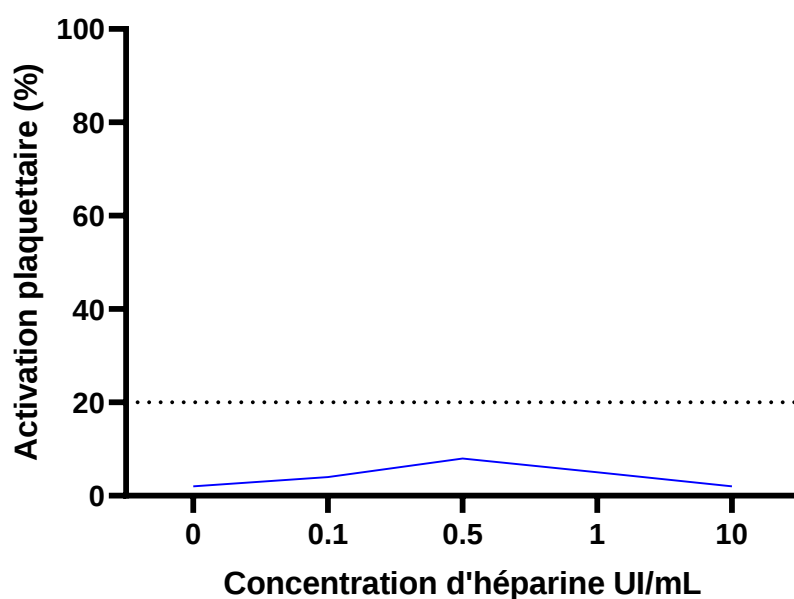
Expert n°1 : Possible

Expert n°2 : Possible

Profil d'activation plaquettaire en SRA-FP4 : (non fournis aux experts pour classification des cas)



Profil d'activation plaquettaire en SRA : (non fournis aux experts pour classification des cas)



Annexe 18

Fiche renseignement suspicion de TIH

Numéro du patient : 16

Sexe : Homme

Age : 55

Etat infectieux : COVID

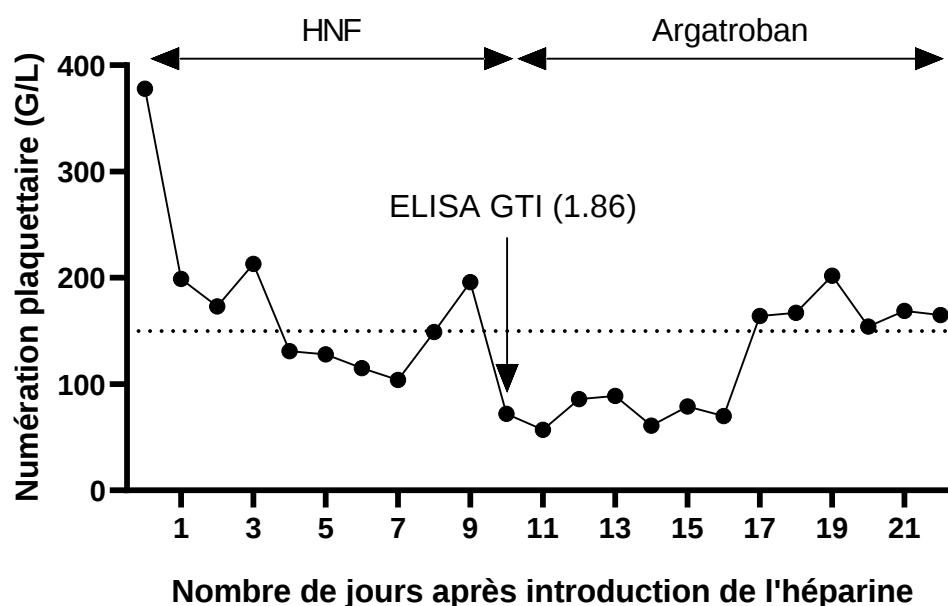
Chirurgie dans les 72h : Non

Médicaments thrombopéniants reçus par le patient : Céfotaxime, Lopinavir, Ritonavir

Indication de l'héparinothérapie : COVID

Type d'héparine reçu : HNF

Probabilité clinique évaluée : Modérée (ECMO)



Numération plaquettaire au début de l'héparinothérapie : 195 G/L

Numération plaquettaire à la suspicion : 56 G/L Délai avant suspicion : 9 jours

Nadir de la numération : 56 G/L Délai du nadir : 9 jours

Pourcentage de chute de la NP au moment de la suspicion : 71.3%

Complication(s) thrombotique(s) : Non

Manifestation(s) atypique(s) : Non

Saignements : Non CIVD : Non

Test immunologique : ELISA GTI (1.86)

Anticoagulation alternative : Argatroban

Correction de la numération plaquettaire : Non

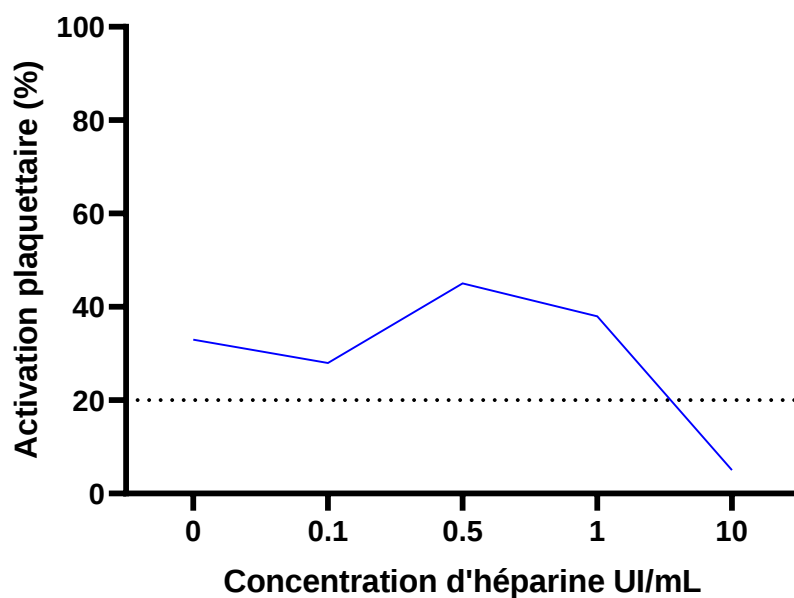
Autre(s) renseignement(s) : Non

Avis des experts :

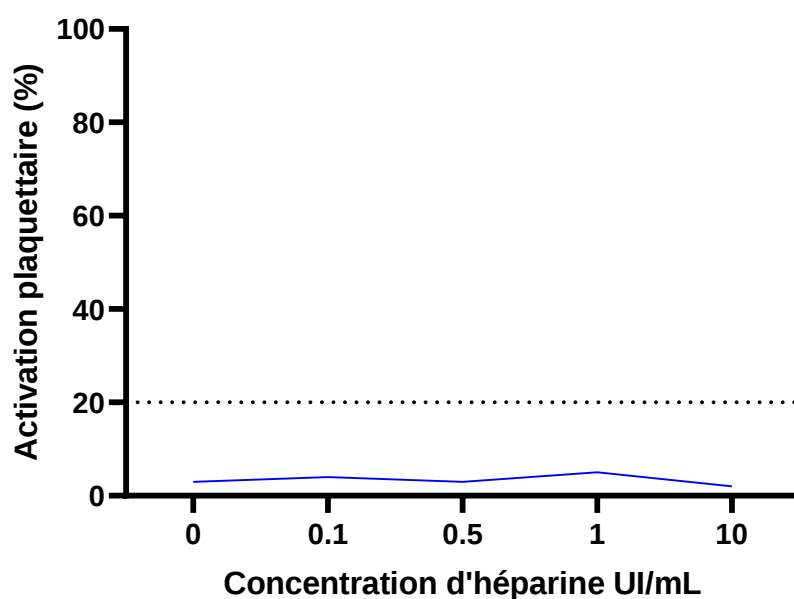
Expert n°1 : Possible

Expert n°2 : Possible

Profil d'activation plaquettaire en SRA-FP4 : (non fournis aux experts pour classification des cas)



Profil d'activation plaquettaire en SRA : (non fournis aux experts pour classification des cas)



Annexe 19

Fiche renseignement suspicion de TIH

Numéro du patient : 17

Sexe : Femme

Age : 88

Etat infectieux : Non

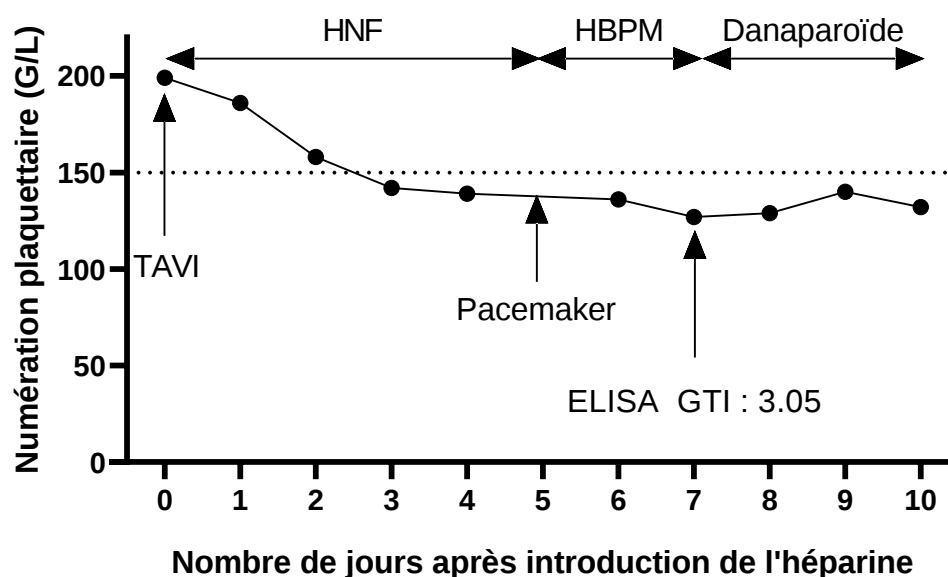
Chirurgie dans les 72h : Pose de pacemaker

Médicaments thrombopéniants reçus par le patient : Non

Indication de l'héparinothérapie : TAVI puis post-opératoire pour pose de pacemaker

Type d'héparine reçu : HNF et HBPM

Probabilité clinique évaluée : Faible (2)



Numération plaquettaire au début de l'héparinothérapie : 199 G/L

Numération plaquettaire à la suspicion : 127 G/L Délai avant suspicion : 7 jours

Nadir de la numération : 127 G/L Délai du nadir : 7 jours

Pourcentage de chute de la NP au moment de la suspicion : 36.2%

Complication(s) thrombotique(s) : Non

Manifestation(s) atypique(s) : Non

Saignements : Non

CIVD : Non

Test immunologique : ELISA GTI (DO : 3.05)

Anticoagulation alternative : Danaparoïde sodique

Correction de la numération plaquettaire : Non

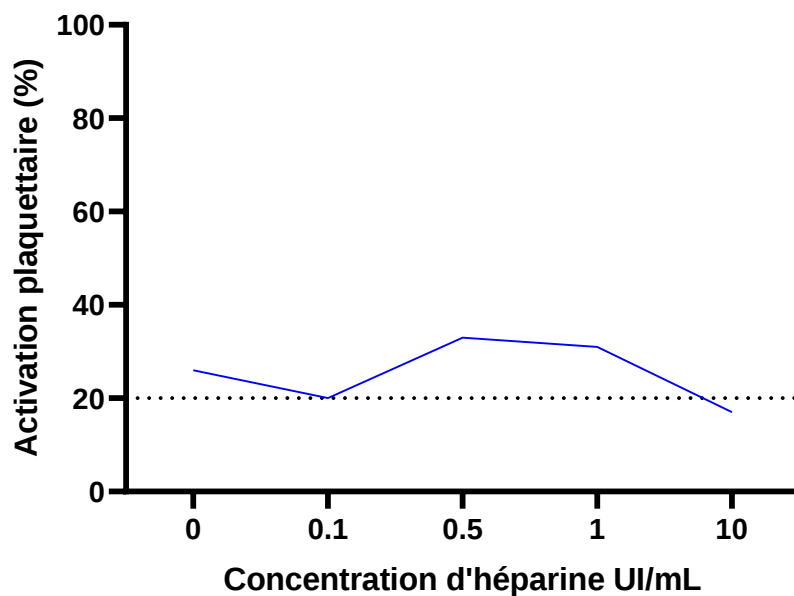
Autre(s) renseignement(s) : Non

Avis des experts :

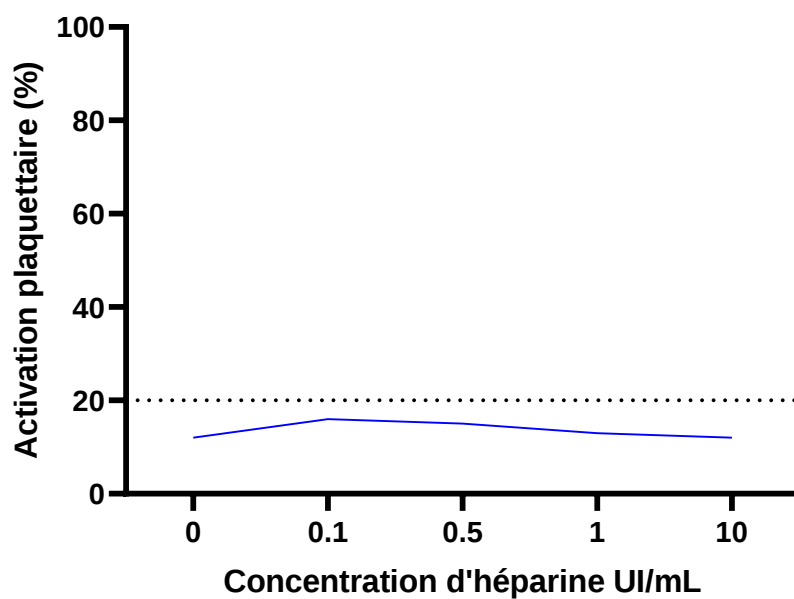
Expert n°1 : Possible

Expert n°2 : Possible

Profil d'activation plaquettaire en SRA-FP4 : (non fournis aux experts pour classification des cas)



Profil d'activation plaquettaire en SRA : (non fournis aux experts pour classification des cas)



Annexe 20

Fiche renseignement suspicion de TIH

Numéro du patient : 18

Sexe : Homme

Age : 68

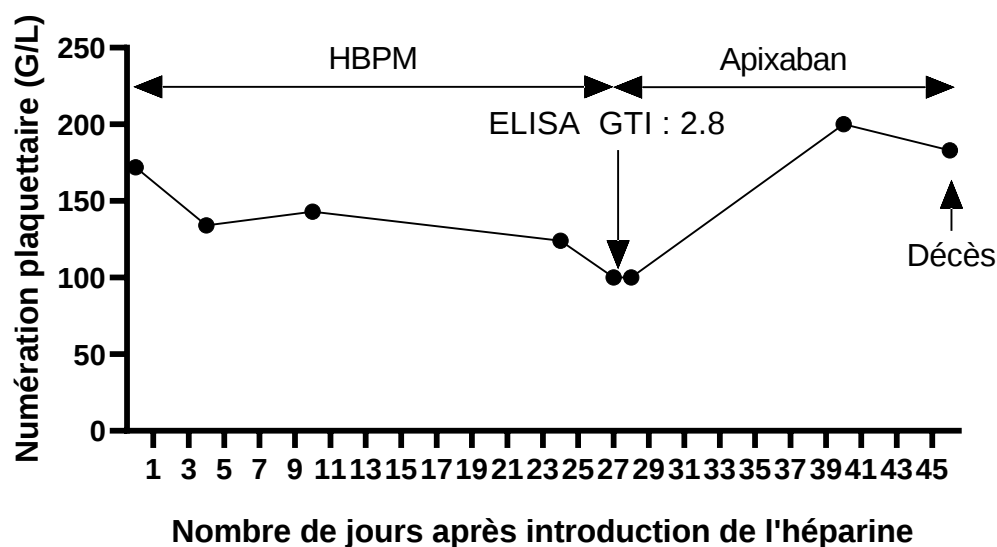
Etat infectieux : Non renseigné Chirurgie dans les 72h : Non

Médicaments thrombopéniants reçus par le patient : Non renseignés

Indication de l'héparinothérapie : Thrombose veineuse profonde (sans précision)

Type d'héparine reçu : HBPM

Probabilité clinique évaluée : Faible (3)



Numération plaquettaire au début de l'héparinothérapie : 172 G/L

Numération plaquettaire à la suspicion : 100 G/L Délai avant suspicion : 26 jours

Nadir de la numération : 100 G/L Délai du nadir : 26 jours

Pourcentage de chute de la NP au moment de la suspicion : 41.9%

Complication(s) thrombotique(s) : Non

Manifestation(s) atypique(s) : Non

Saignements : Non CIVD : Non

Test immunologique : ELISA GTI (DO : 2.8)

Anticoagulation alternative : Apixaban

Correction de la numération plaquettaire : Oui, 12 jours

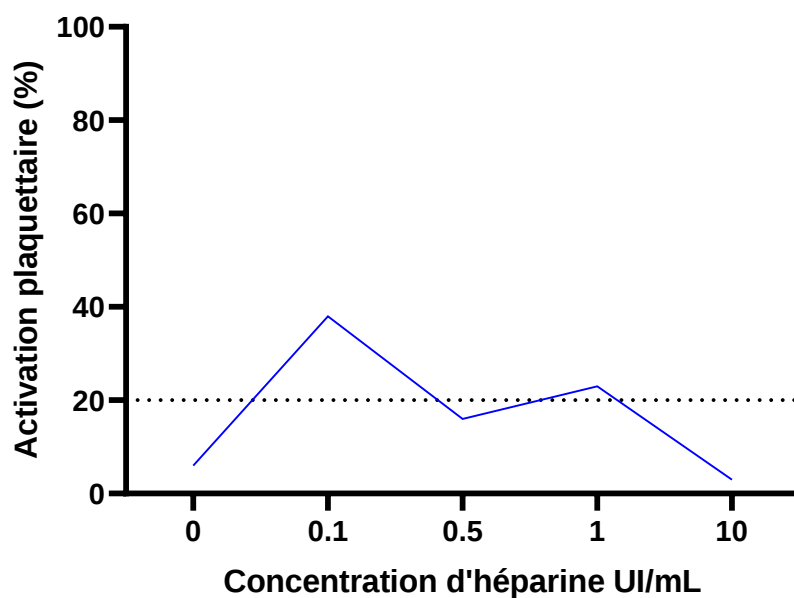
Autre(s) renseignement(s) : Décès

Avis des experts :

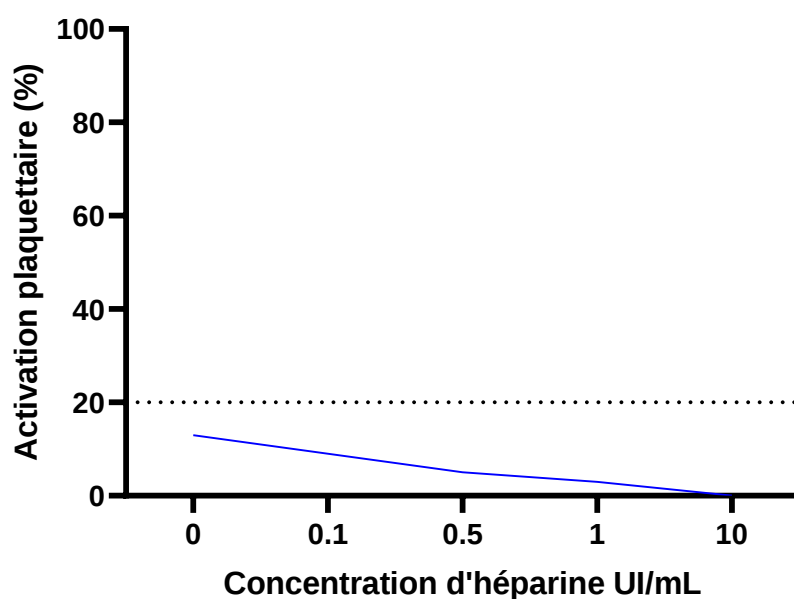
Expert n°1 : Possible

Expert n°2 : Possible

Profil d'activation plaquettaire en SRA-FP4 : (non fournis aux experts pour classification des cas)



Profil d'activation plaquettaire en SRA : (non fournis aux experts pour classification des cas)



Annexe 21

Fiche renseignement suspicion de TIH

Numéro du patient : 19

Sexe : Homme

Age : 67

Etat infectieux : Oui (sans précision)

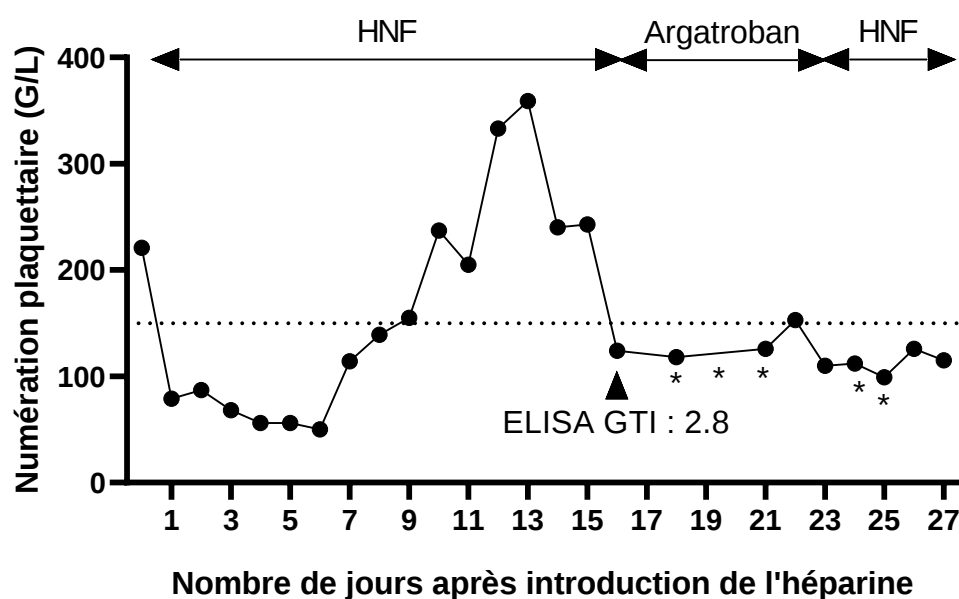
Chirurgie dans les 72h : Non

Médicaments thrombopéniants reçus par le patient : Méropénème, Caspufongine, Piperacilline, Tazobactam

Indication de l'héparinothérapie : Préventif de la MTEV

Type d'héparine reçu : HNF

Probabilité clinique évaluée : Faible (3)



Numération plaquettaire au début de l'héparinothérapie : 221 G/L

Numération plaquettaire à la suspicion : 124 G/L **Délai avant suspicion :** 16 jours

Nadir de la numération : 50 G/L

Délai du nadir : 6 jours

Pourcentage de chute de la NP au moment de la suspicion : 65.4% (attention difficulté à numérer les plaquettes due à la présence d'agrégats, voir * sur la courbe) (chute de 359 à 124 G/L)

Complication(s) thrombotique(s) : Non

Manifestation(s) atypique(s) : Non

Saignements : Non

CIVD : Non

Test immunologique : ELISA GTI (DO : 2.80)

Anticoagulation alternative : Argatroban

Correction de la numération plaquettaire : Non, mais réintroduction de l'HNF à J23 du relais

Autre(s) renseignement(s) : Réintroduction de l'héparine après un temps sous Argatroban, sans problème particulier

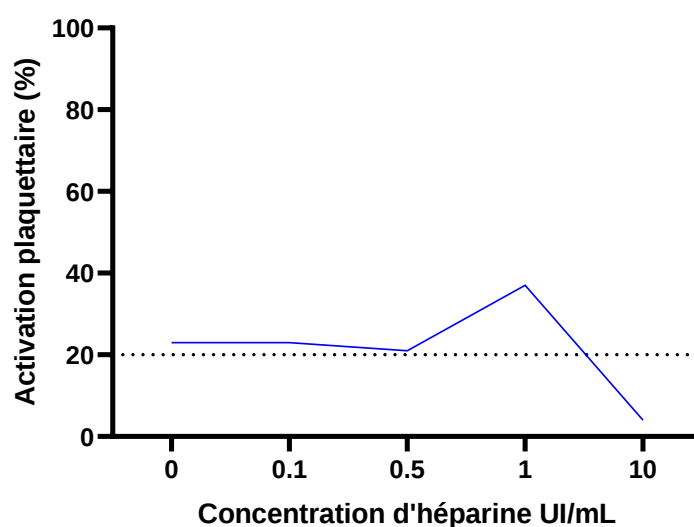
Avis des experts :

Expert n°1 : Peu probable

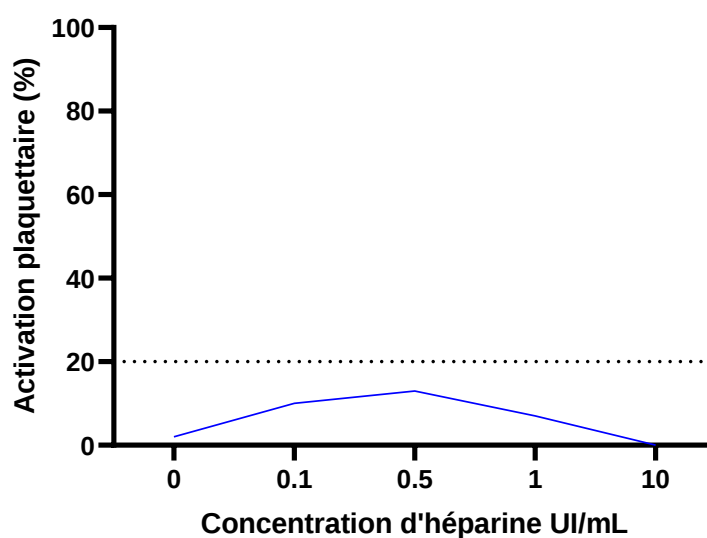
Expert n°2 : Probable

Expert n°3 : Probable

Profil d'activation plaquettaire en SRA-FP4 : (non fournis aux experts pour classification des cas)



Profil d'activation plaquettaire en SRA : (non fournis aux experts pour classification des cas)



Annexe 22

Fiche renseignement suspicion de TIH

Numéro du patient : 20

Sexe : Homme

Age : 73

Etat infectieux : Non

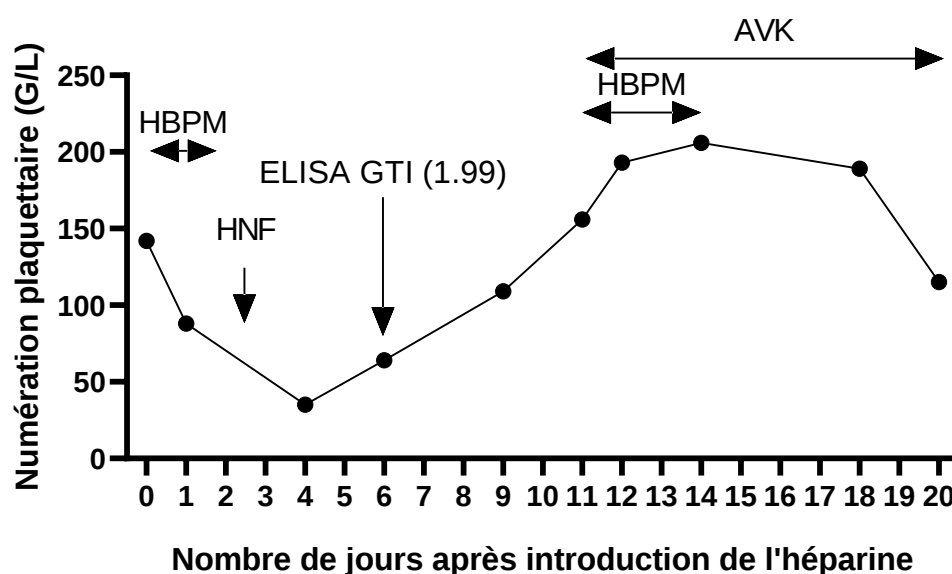
Chirurgie dans les 72h : Non

Médicaments thrombopéniants reçus par le patient : Non renseignés

Indication de l'héparinothérapie : Post-opératoire pour résection de glioblastome

Type d'héparine reçu : HNF et HBPM

Probabilité clinique évaluée : Faible (2)



Numération plaquettaire au début de l'héparinothérapie : 142 G/L

Numération plaquettaire à la suspicion : 64 G/L

Délai avant suspicion : 6 jours

Nadir de la numération : 35 G/L

Délai du nadir : 4 jours

Pourcentage de chute de la NP au moment de la suspicion : 73.4%

Complication(s) thrombotique(s) : Non

Manifestation(s) atypique(s) : Non

Saignements : Non

CIVD : Non

Test immunologique : ELISA GTI (1.99)

Anticoagulation alternative : Non

Correction de la numération plaquettaire : Oui, 7 jours

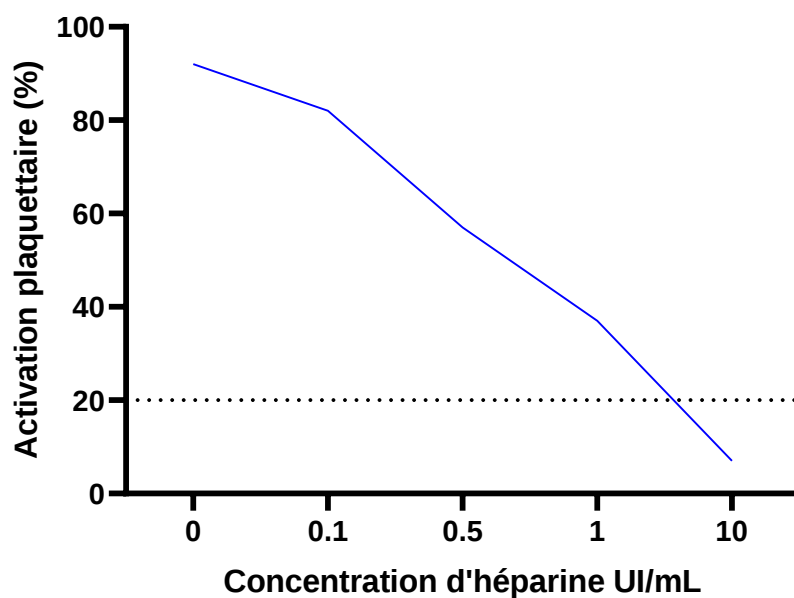
Autre(s) renseignement(s): Pas d'exposition antérieur à l'héparine, suspicion 4 jours après résection du glioblastome

Avis des experts :

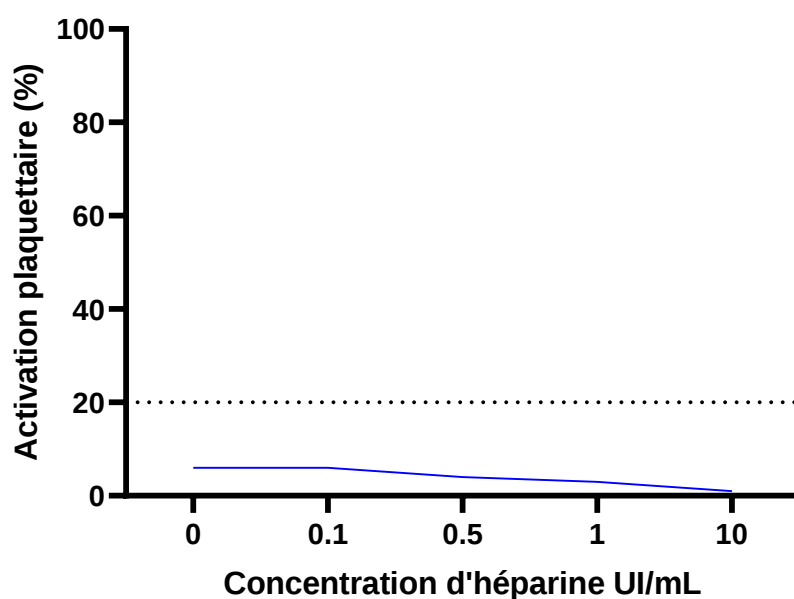
Expert n°1 : Possible

Expert n°2 : Possible

Profil d'activation plaquettaire en SRA-FP4 : (non fournis aux experts pour classification des cas)



Profil d'activation plaquettaire en SRA : (non fournis aux experts pour classification des cas)



Annexe 23

Fiche renseignement suspicion de TIH

Numéro du patient : 21

Sexe : Homme

Age : 72

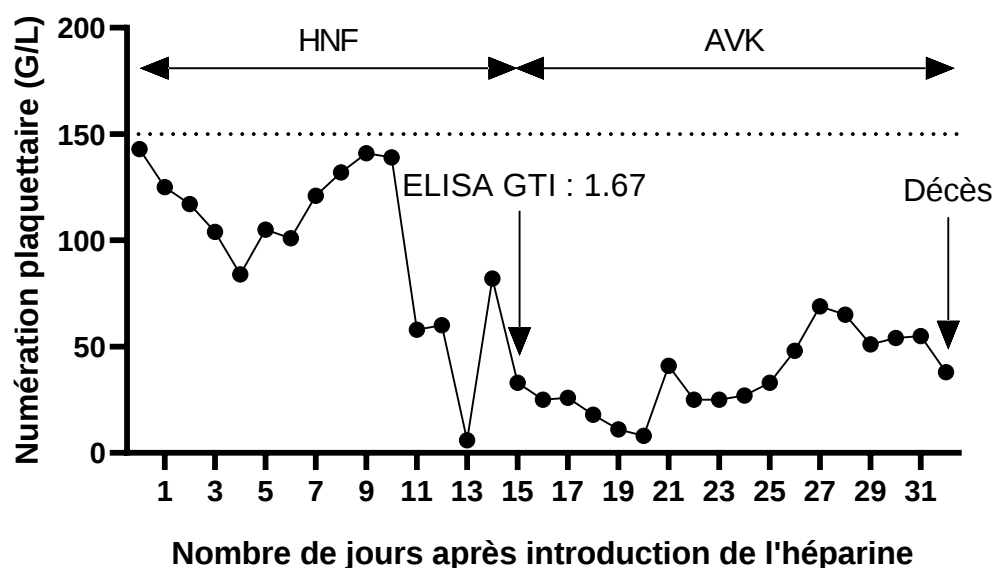
Etat infectieux : Choc septique sur pyélonéphrite Chirurgie dans les 72h : Non

Médicaments thrombopéniants reçus par le patient : Tygécycline, Céfépime

Indication de l'héparinothérapie : Dialyse

Type d'héparine reçu : HNF

Probabilité clinique évaluée : Faible (3)



Numération plaquettaire au début de l'héparinothérapie : 143 G/L

Numération plaquettaire à la suspicion : 33 G/L

Délai avant suspicion : 16 jours

Nadir de la numération : 6 G/L

Délai du nadir : 13 jours

Pourcentage de chute de la NP au moment de la suspicion : 76.9%

Complication(s) thrombotique(s) : Non

Manifestation(s) atypique(s) : Non

Saignements : Non

CIVD : Non

Test immunologique : ELISA GTI (1.67)

Anticoagulation alternative : AVK (sans relai)

Correction de la numération plaquettaire : Oui, 12 jours

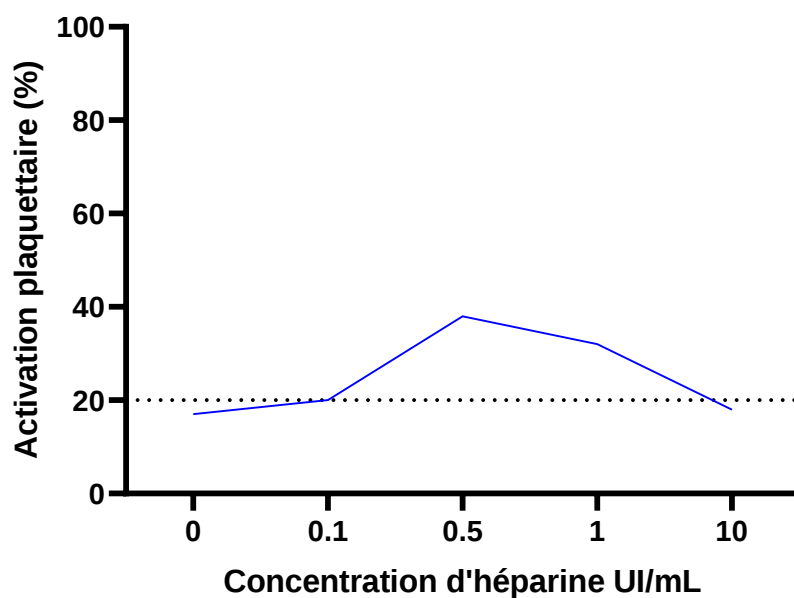
Autre(s) renseignement(s) : Syndrome d'activation macrophagique, absence de notion d'exposition récente à l'héparine. Introduction de l'héparine suite à la pyélonéphrite nécessitant des dialyses.

Avis des experts :

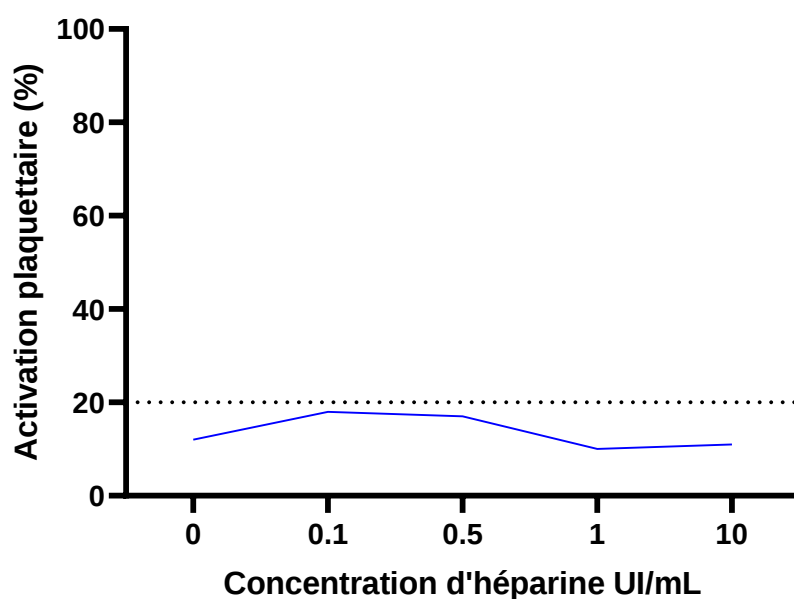
Expert n°1 : Peu probable

Expert n°2 : Peu probable

Profil d'activation plaquettaire en SRA-FP4 : (non fournis aux experts pour classification des cas)



Profil d'activation plaquettaire en SRA : (non fournis aux experts pour classification des cas)



Annexe 24

Fiche renseignement suspicion de TIH

Numéro du patient : 22

Sexe : Femme

Age : 49

Etat infectieux : Non renseigné

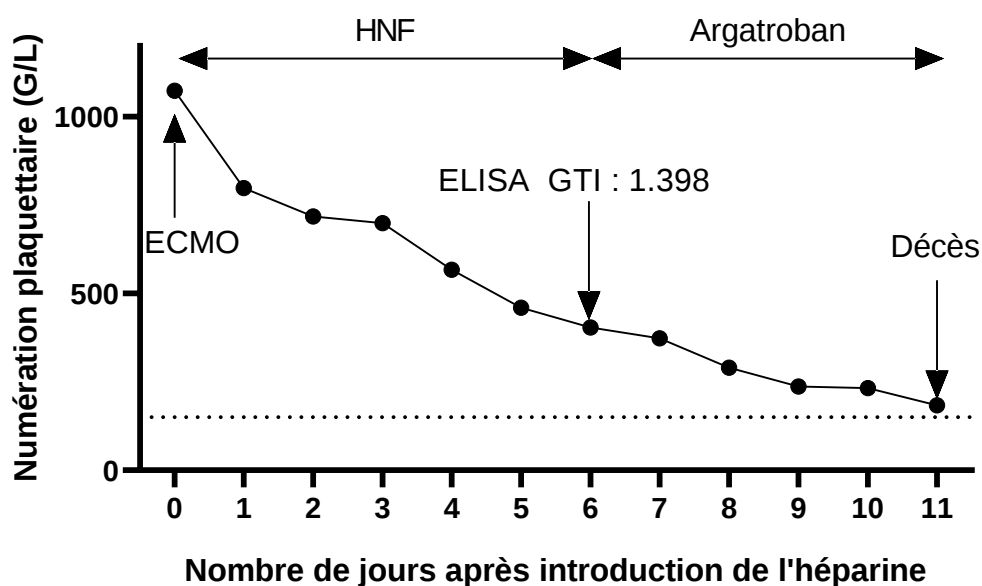
Chirurgie dans les 72h : Non

Médicaments thrombopéniants reçus par le patient : Non renseignés

Indication de l'héparinothérapie : ECMO

Type d'héparine reçu : HNF

Probabilité clinique évaluée : Faible (ECMO)



Numération plaquettaire au début de l'héparinothérapie : 1073 G/L

Numération plaquettaire à la suspicion : 404 G/L Délai avant suspicion : 6 jours

Nadir de la numération : 404 G/L

Délai du nadir : 6 jours

Pourcentage de chute de la NP au moment de la suspicion : 62.3%

Complication(s) thrombotique(s) : Non

Manifestation(s) atypique(s) : Non

Saignements : Non

CIVD : Non

Test immunologique : ELISA GTI (1.398)

Anticoagulation alternative : Argatroban

Correction de la numération plaquettaire : Non

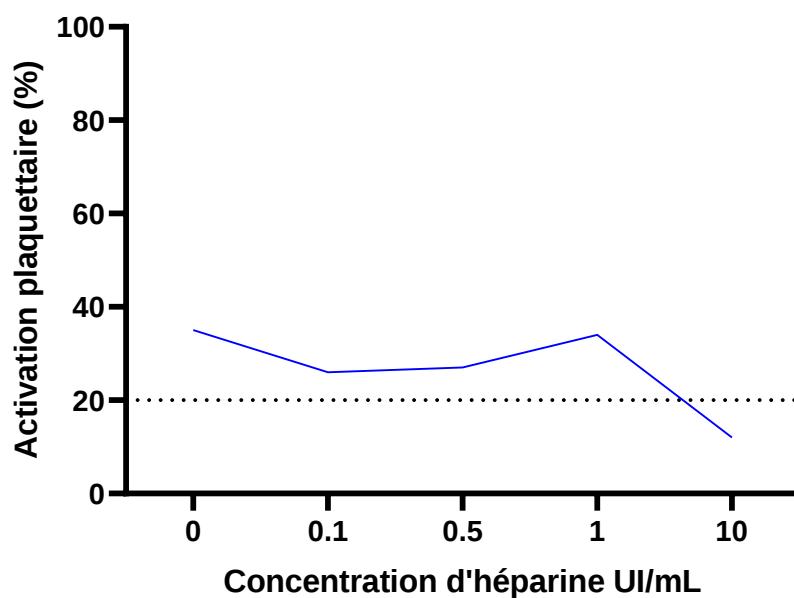
Autre(s) renseignement(s) : Thrombocytemie essentielle, ATCD de TIH en 2014

Avis des experts :

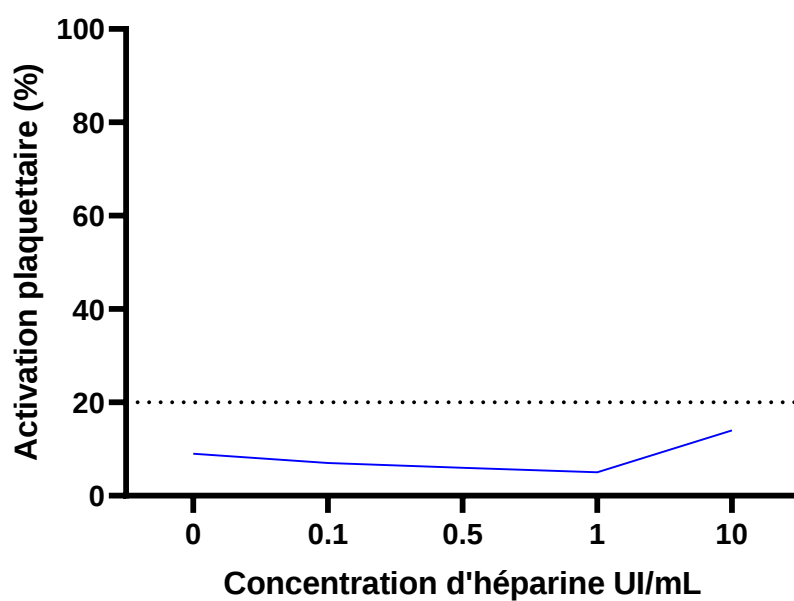
Expert n°1 : Peu probable

Expert n°2 : Peu probable

Profil d'activation plaquettaire en SRA-FP4 : (non fournis aux experts pour classification des cas)



Profil d'activation plaquettaire en SRA : (non fournis aux experts pour classification des cas)



Annexe 25

Fiche renseignement suspicion de TIH

Numéro du patient : 23

Sexe : Homme

Age : 20

Etat infectieux : Non

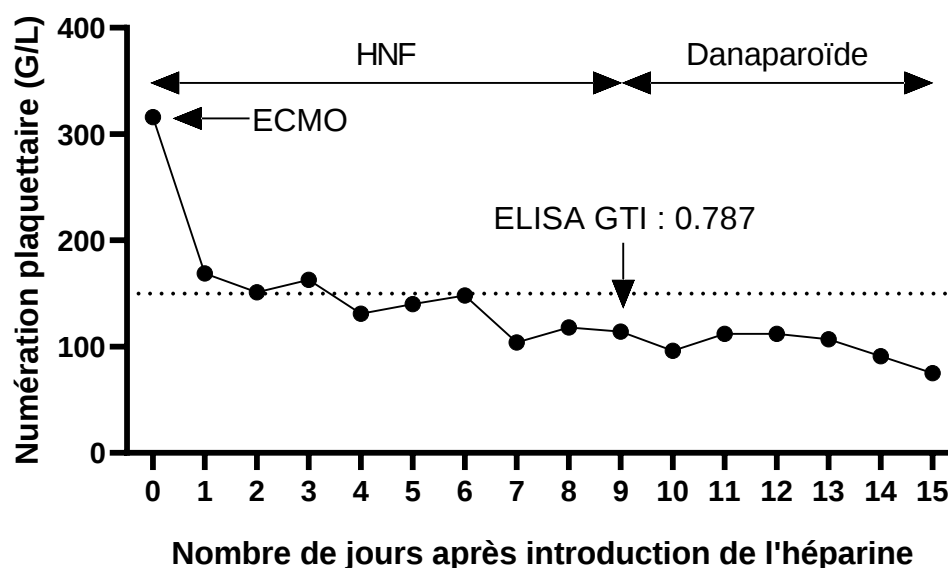
Chirurgie dans les 72h : Non

Médicaments thrombopéniants reçus par le patient : Antibiotique (sans précision)

Indication de l'héparinothérapie : ECMO pour SDRA

Type d'héparine reçu : HNF

Probabilité clinique évaluée : Faible (ECMO)



Numération plaquettaire au début de l'héparinothérapie : 316 G/L

Numération plaquettaire à la suspicion : 114 G/L Délai avant suspicion : 9 jours

Nadir de la numération : 104 G/L

Délai du nadir : 7 jours

Pourcentage de chute de la NP au moment de la suspicion : 63,9%

Complication(s) thrombotique(s) : Non

Manifestation(s) atypique(s) : Non

Saignements : Non

CIVD : Non

Test immunologique : ELISA GTI (0.787)

Anticoagulation alternative : Danaparoïde sodique

Correction de la numération plaquettaire : Non

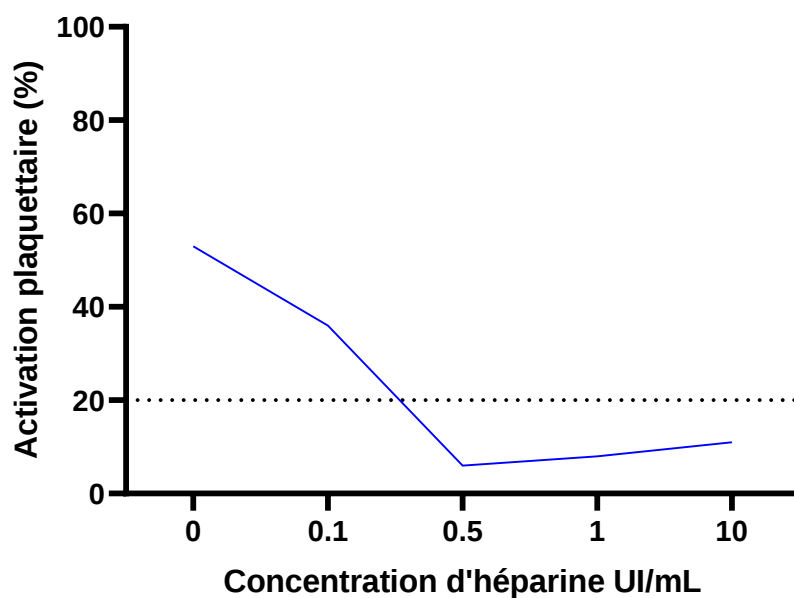
Autre(s) renseignement(s) : Non

Avis des experts :

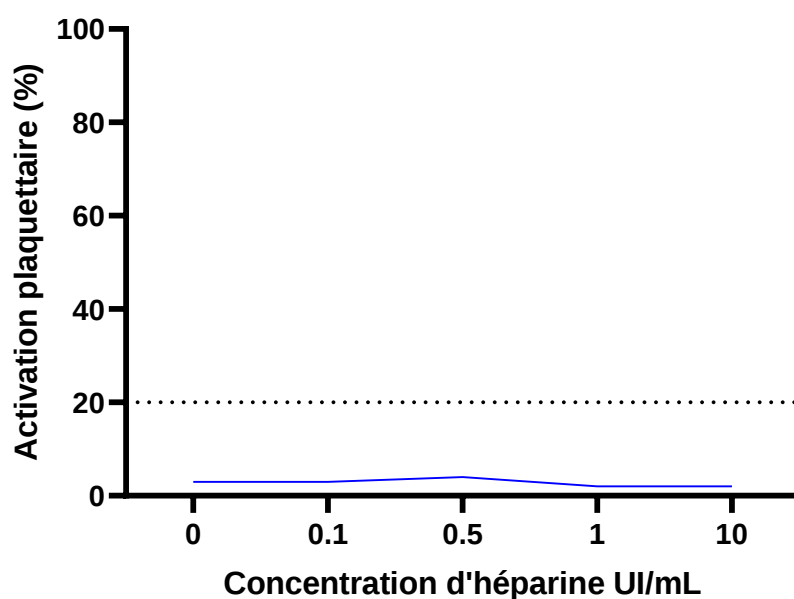
Expert n°1 : Peu probable

Expert n°2 : Peu probable

Profil d'activation plaquettaire en SRA-FP4 : (non fournis aux experts pour classification des cas)



Profil d'activation plaquettaire en SRA : (non fournis aux experts pour classification des cas)



ENGAGEMENT DE NON PLAGIAT

Je, soussigné (e) LAMBERT Wayne-Corentin

Déclare être pleinement conscient(e) que le plagiat de documents ou d'une partie d'un document publiés constitue une violation des droits d'auteur ainsi qu'une fraude caractérisée. (*Décret n°92-657 du 13 juillet 1992*)

En conséquence, je m'engage à citer toutes les sources que j'ai utilisées pour écrire ce mémoire.

Signature :



SIGNATURES DU DIRECTEUR DE THESE ET DU DOYEN

N° Étudiant : 21709929

N° Thèse : 84.....

Nom et Prénom : LAMBERT Wayne-Corentin

Sujet : Intérêt du FP4 exogène au cours du test de libération de sérotonine radiomarquée (SRA)
pour la détection des anticorps de thrombopénie induite par l'héparine (TIH) : évaluation
après 3 années d'utilisation au CHRU de Tours

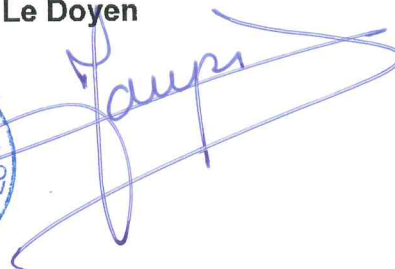
Tours, le : 07/10/2021.....

Le(s) Directeur(s) de Thèse :



Vu et Transmis :
Le Doyen





LAMBERT Wayne-Corentin

N°84

Intérêt du FP4 exogène au cours du test de libération de sérotonine radiomarquée (SRA) pour la détection des anticorps de thrombopénie induite par l'héparine (TIH) : évaluation après 3 années d'utilisation au CHRU de Tours

Introduction :

La confirmation du diagnostic de thrombopénie induite par l'héparine (TIH) repose sur la réalisation d'un test fonctionnel pour démontrer la capacité des anticorps anti-facteur plaquettaire 4 (anti-FP4) à activer les plaquettes. Bien que le test de libération de sérotonine radiomarquée (SRA) soit considéré comme le test fonctionnel de référence à l'heure actuelle, notre équipe a récemment suggéré que sa sensibilité pouvait être améliorée par l'ajout de FP4 à 10 µg/mL (SRA-FP4) (Vayne et al. Br J Haematol 2017). Dans cette nouvelle étude, nous avons évalué les performances du SRA-FP4 après 4 années d'utilisation au CHRU de Tours, et nous nous sommes questionnés sur sa place dans la stratégie diagnostique des TIH.

Patients et méthode :

D'avril 2016 à Juin 2020, un SRA classique et un SRA-FP4 ont été réalisés pour tous les échantillons reçus dans le Service d'Hématologie-Hémostase du CHRU de Tours dans le cadre de suspicions de TIH. Au total, les données clinico-biologiques de 248 patients provenant de 20 centres hospitaliers français ont été analysées de façon rétrospective. Le diagnostic de TIH a été posé en fonction des résultats des deux SRA, et grâce à l'avis d'un panel de deux experts en cas de discordance entre les deux tests. Les performances du SRA et du SRA-FP4 en termes de sensibilité et spécificité ont ensuite été comparées.

Résultats :

Pour les 117 patients présentant un SRA classique positif, l'ajout de FP4 a permis de potentialiser l'activation plaquettaire au cours du SRA-FP4 (activation maximale moyenne : 58,4% vs. 77,3%, $P < 0,0001$). Parmi les 130 patients avec un SRA classique négatif, 23 présentaient un SRA-FP4 positif (18%). Selon les experts, le diagnostic de TIH était possible ou probable pour 20 de ces patients, et semblait exclu pour les 3 autres. Ces 3 patients présentaient une probabilité clinique de TIH faible, et deux d'entre-eux bénéficiaient d'une assistance circulatoire de type ECMO (extracorporeal membrane oxygenation). Un SRA négatif en absence et en présence de FP4 a été retrouvé chez 106 patients. La sensibilité et la spécificité du SRA-FP4 pour le diagnostic de TIH étaient de 98,56% (IC 95% 97,81-99,32) et 97,27% (IC 95% 96,24-98,30%), respectivement, tandis que celles du SRA classique étaient de 85,61% (IC 95% 83,39-87,84) et 100% (IC 95% 100-100).

Conclusion :

Cette étude confirme l'intérêt pratique du SRA-FP4 pour confirmer le diagnostic des TIH en raison d'une sensibilité nettement supérieure à celle du SRA classique. Bien que son coût plus élevé et sa spécificité légèrement moins bonne questionnent sa place en tant que test fonctionnel de première intention, le SRA-FP4 apparaît extrêmement utile en cas de suspicion de TIH modérée ou forte, associée à un test fonctionnel négatif ou difficile à conclure.

MOTS-CLÉS : Héparine, thrombopénie, thrombopénie induite par l'héparine, thrombose, test de libération à la sérotonine radiomarquée, facteur plaquettaire 4

JURY

PRÉSIDENT : Mme Claire POUPLARD, PU-PH, UFR de Pharmacie et CHRU – TOURS

MEMBRES : Mme Caroline VAYNE, PHA, UFR de Médecine et CHRU – Tours

M. Yves GRUEL, PU-PH, UFR de Médecine et CHRU – TOURS

Mme Anne BAUTERS, PH, CHU – LILLE

LE JEUDI 07 OCTOBRE 2021, UFR DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES – TOURS