



**HAL**  
open science

# Étude rétrospective (2010-2017) de l'allo-immunisation chez 319 patients auto-immunisés. Apport et efficacité de l'allo-adsorption et des techniques complémentaires en immuno-hématologie

Justine Coombs

## ► To cite this version:

Justine Coombs. Étude rétrospective (2010-2017) de l'allo-immunisation chez 319 patients auto-immunisés. Apport et efficacité de l'allo-adsorption et des techniques complémentaires en immuno-hématologie. Sciences pharmaceutiques. 2018. dumas-01813363

**HAL Id: dumas-01813363**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01813363>**

Submitted on 12 Jun 2018

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

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

UNIVERSITE DE ROUEN  
UFR DE MEDECINE ET DE PHARMACIE

Année 2018

**MEMOIRE DU DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES DE BIOLOGIE MEDICALE**

Conformément aux dispositions du décret 2003/76 du 23 janvier 2003, tenant lieu de

**THESE D'EXERCICE POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN  
PHARMACIE**

Présentée et soutenue publiquement le 16 avril 2018

Par Mlle COOMBS Justine

Née le 04 août 1990 à Rouen (76)

A la FACULTE DE MEDECINE, PHARMACIE DE ROUEN

**Etude rétrospective (2010-2017) de l'allo-immunisation chez 319 patients auto-immunisés. Apport et efficacité de l'allo-adsorption et des techniques complémentaires en immuno-hématologie**

Directrice de thèse : Pr F. Pirenne, PU-PH Immuno-hématologie, CHU Henri Mondor (Créteil)

Président du jury : Pr L. Favennec, PU-PH Parasitologie, CHU de Rouen

Membres du jury : Pr Y. Benhamou, PU-PH Médecine Interne, CHU de Rouen

Dr B. Chami, Docteur en Pharmacie, CHU Henri Mondor (Créteil)

Dr S. Daliphard, Docteur en Pharmacie, CHU de Rouen

UNIVERSITE DE ROUEN  
UFR DE MEDECINE ET DE PHARMACIE

Année 2018

**MEMOIRE DU DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES DE BIOLOGIE MEDICALE**

Conformément aux dispositions du décret 2003/76 du 23 janvier 2003, tenant lieu de

**THESE D'EXERCICE POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN  
PHARMACIE**

Présentée et soutenue publiquement le 16 avril 2018

Par Mlle COOMBS Justine

Née le 04 août 1990 à Rouen (76)

A la FACULTE DE MEDECINE, PHARMACIE DE ROUEN

**Etude rétrospective (2010-2017) de l'allo-immunisation chez 319 patients auto-immunisés. Apport et efficacité de l'allo-adsorption et des techniques complémentaires en immuno-hématologie**

Directrice de thèse : Pr F. Pirenne, PU-PH Immuno-hématologie, CHU Henri Mondor (Créteil)

Président du jury : Pr L. Favennec, PU-PH Parasitologie, CHU de Rouen

Membres du jury : Pr Y. Benhamou, PU-PH Médecine Interne, CHU de Rouen

Dr B. Chami, Docteur en Pharmacie, CHU Henri Mondor (Créteil)

Dr S. Daliphard, Docteur en Pharmacie, CHU de Rouen

## Remerciements

Je souhaite remercier l'ensemble des membres du jury :

Le Professeur Loïc Favennec qui, après m'avoir soutenue dans mon projet professionnel en m'aidant à constituer un dossier pour venir me former à l'EFS site Mondor de Créteil, a accepté de présider le jury de mon mémoire de DES de Biologie Médicale tenant lieu de thèse d'exercice ;

Le Professeur France Pirene, directrice de la thèse, qui m'a permis d'effectuer trois semestres dans son laboratoire d'immuno-hématologie et un Master 2 recherche au sein du laboratoire qu'elle dirige – Merci pour cette formation et vos précieux conseils ;

Le Professeur Ygal Benhamou, qui m'a appris, « dans une autre vie », de nombreuses choses en hémostase et qui a accepté d'apporter à ce jury son expertise médicale en tant qu'Interniste ;

Le Docteur Btissam Chami qui m'a tout appris en immuno-hématologie et a pris le temps de corriger ma thèse malgré son emploi du temps chargé – Merci pour ta patience et ta gentillesse ;

Le Docteur Sylvie Daliphard, mon mentor en hématologie, qui complète ce jury de thèse.

Je tiens à remercier toute l'équipe de l'EFS site Mondor, « Porte 35 ». Je remercie les techniciens de la BNSPR qui m'ont gentiment préparé des globules rouges pour mes manips de thèse. Delphine et Véronique qui ont commandé des réactifs supplémentaires pour que je puisse mener à bien mes manips. Bruno et Christine pour leur expertise technique et leurs précieux conseils lorsque j'ai rédigé mes protocoles. Et l'ensemble des techniciens qui m'ont aidée, de près ou de loin, dans mes manips (merci à ceux qui ont mis à cuire/centrifuger mes cartes-gels pendant mes pause-café, merci aussi à ceux qui ont été sceptiques en me voyant à la paillasse, ça a égayé mes journées de manips !). Merci aux techniciens (notamment Fiona) et à Anissa (bientôt technicienne !) qui m'ont aidé à jongler entre le laboratoire et la rédaction de la thèse. Je remercie également Mélanie pour sa formation et son optimisme lorsque je lui faisais part de mes résultats et de l'avancée de ma thèse. J'en profite pour remercier Fériat pour sa bonne humeur et sa formation en Distribution, j'espère que je n'aurais pas à t'appeler à l'aide trop souvent ! Merci également à Maud pour sa bonne humeur au cours de ces six derniers mois d'internat.

Merci à tous les membres de l'équipe 2 de recherche pour leurs encouragements lors de la rédaction de ce manuscrit. Merci à Benoît pour la lecture critique de ce travail et son soutien,

tu es un « vrai père pour moi ». Merci à Marion (lapin) et Imane pour leur bonne humeur, à Sadaf pour sa présence aux moments clés (pause-café du matin !) et merci à Jennifer pour m'avoir si souvent nourrie et corrigé ce travail, tu es une « vraie mère pour moi ».

Je remercie l'ensemble des techniciens/secrétaires avec qui j'ai eu le plaisir de travailler au cours de mon internat, que ce soit à Amiens ou à Rouen.

Je remercie mes co-internes, notamment Joséphine, Elodie, Marie-Joëlle, Marion et Elsa, devenues de très bonnes amies, pour m'avoir supportée ces années passées ensemble à l'hôpital.

Je remercie mes copines de Master 2, Anaëlle et Alizée qui ont réussi à me maintenir éveillée pendant les longues heures de cours d'immunologie.

Je remercie mes copines de fac, dont Lucie, Diane, Mathilde G, Constance et Alice-Andrée qui, malgré la distance géographique, n'étaient jamais bien loin.

Je remercie tous mes amis issus d'horizons variés pour leur soutien au cours de mes dix années d'études pendant lesquelles il s'est passé de nombreuses choses, n'est-ce pas Anne-Juliette ?!

Je remercie Mathilde A, nos chemins se sont croisés au lycée et nous n'avons jamais été séparées depuis. Merci pour nos rendez-vous mensuels d'essayage de robe de mariée !

Pensée toute particulière à Margaux, que j'aurais bien aimé avoir à mes côtés aujourd'hui, tu me manques.

Une pensée affectueuse à mes grands-parents qui doivent, j'en suis sûre, être contents que mes études soient enfin finies !

Merci à mes parents pour leur soutien financier (!) et psychologique « merde puissance un milliard » et à ma sœur pour son flegme habituel.

Je remercie enfin Alexis, pour cette très belle rencontre au début de ma quatrième année de Pharmacie, ses conseils avisés tout au long de ma formation et pour avoir eu la très bonne idée de me demander en mariage.

**L'université de Rouen et l'UFR de Médecine et de Pharmacie de Rouen n'entendent donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans cette thèse. Ces opinions sont propres à leurs auteurs.**

ANNEE UNIVERSITAIRE 2017 - 2018

U.F.R. SANTÉ DE ROUEN

-----

DOYEN : **Professeur Pierre FREGER**

ASSESEURS : **Professeur Michel GUERBET**  
**Professeur Benoit VEBER**  
**Professeur Pascal JOLY**  
**Professeur Stéphane MARRET**

I - MEDECINE

**PROFESSEURS DES UNIVERSITES – PRATICIENS HOSPITALIERS**

Mr Frédéric <b>ANSELME</b>	HCN	Cardiologie
Mme Gisèle <b>APTER</b>	Havre	Pédopsychiatrie
Mme Isabelle <b>AUQUIT AUCKBUR</b>	HCN	Chirurgie plastique
Mr Fabrice <b>BAUER</b>	HCN	Cardiologie
Mme Soumeya <b>BEKRI</b>	HCN	Biochimie et biologie moléculaire
Mr Ygal <b>BENHAMOU</b>	HCN	Médecine interne
Mr Jacques <b>BENICHOU</b>	HCN	Bio statistiques et informatique médicale
Mr Olivier <b>BOYER</b>	UFR	Immunologie
Mme Sophie <b>CANDON</b>	HCN	Immunologie
Mr François <b>CARON</b>	HCN	Maladies infectieuses et tropicales
Mr Philippe <b>CHASSAGNE</b> ( <i>détachement</i> )	HCN	Médecine interne (gériatrie) – Détachement
Mr Vincent <b>COMPERE</b>	HCN	Anesthésiologie et réanimation chirurgicale
Mr Jean-Nicolas <b>CORNU</b>	HCN	Urologie
Mr Antoine <b>CUVELIER</b>	HB	Pneumologie
Mr Pierre <b>CZERNICHOW</b> ( <i>sumombre</i> )	HCH	Epidémiologie, économie de la santé
Mr Jean-Nicolas <b>DACHER</b>	HCN	Radiologie et imagerie médicale
Mr Stéfan <b>DARMONI</b>	HCN	Informatique médicale et techniques de communication
Mr Pierre <b>DECHELOTTE</b>	HCN	Nutrition
Mr Stéphane <b>DERREY</b>	HCN	Neurochirurgie

Mr Frédéric <b>DI FIORE</b>	CB	Cancérologie
Mr Fabien <b>DOGUET</b>	HCN	Chirurgie Cardio Vasculaire
Mr Jean <b>DOUCET</b>	SJ	Thérapeutique - Médecine interne et gériatrie
Mr Bernard <b>DUBRAY</b>	CB	Radiothérapie
Mr Philippe <b>DUCROTTE</b>	HCN	Hépto-gastro-entérologie
Mr Frank <b>DUJARDIN</b>	HCN	Chirurgie orthopédique - Traumatologique
Mr Fabrice <b>DUPARC</b>	HCN	Anatomie - Chirurgie orthopédique et traumatologique
Mr Eric <b>DURAND</b>	HCN	Cardiologie
Mr Bertrand <b>DUREUIL</b>	HCN	Anesthésiologie et réanimation chirurgicale
Mme Hélène <b>ELTCHANINOFF</b>	HCN	Cardiologie
Mr Manuel <b>ETIENNE</b>	HCN	Maladies infectieuses et tropicales
Mr Thierry <b>FREBOURG</b>	UFR	Génétique
Mr Pierre <b>FREGER</b>	HCN	Anatomie - Neurochirurgie
Mr Jean François <b>GEHANNO</b>	HCN	Médecine et santé au travail
Mr Emmanuel <b>GERARDIN</b>	HCN	Imagerie médicale
Mme Priscille <b>GERARDIN</b>	HCN	Pédopsychiatrie
M. Guillaume <b>GOURCEROL</b>	HCN	Physiologie
Mr Dominique <b>GUERROT</b>	HCN	Néphrologie
Mr Olivier <b>GUILLIN</b>	HCN	Psychiatrie Adultes
Mr Didier <b>HANNEQUIN</b>	HCN	Neurologie
Mr Fabrice <b>JARDIN</b>	CB	Hématologie
Mr Luc-Marie <b>JOLY</b>	HCN	Médecine d'urgence
Mr Pascal <b>JOLY</b>	HCN	Dermato – Vénérologie
Mme Bouchra <b>LAMIA</b>	Havre	Pneumologie
Mme Annie <b>LAQUERRIERE</b>	HCN	Anatomie et cytologie pathologiques
Mr Vincent <b>LAUDENBACH</b>	HCN	Anesthésie et réanimation chirurgicale
Mr Joël <b>LECHEVALLIER</b>	HCN	Chirurgie infantile
Mr Hervé <b>LEFEBVRE</b>	HB	Endocrinologie et maladies métaboliques
Mr Thierry <b>LEQUERRE</b>	HB	Rhumatologie
Mme Anne-Marie <b>LEROI</b>	HCN	Physiologie
Mr Hervé <b>LEVESQUE</b>	HB	Médecine interne
Mme Agnès <b>LIARD-ZMUDA</b>	HCN	Chirurgie Infantile
Mr Pierre Yves <b>LITZLER</b>	HCN	Chirurgie cardiaque
Mr Bertrand <b>MACE</b>	HCN	Histologie, embryologie, cytogénétique
M. David <b>MALTETE</b>	HCN	Neurologie
Mr Christophe <b>MARGUET</b>	HCN	Pédiatrie
Mme Isabelle <b>MARIE</b>	HB	Médecine interne
Mr Jean-Paul <b>MARIE</b>	HCN	Oto-rhino-laryngologie



Mr Loïc <b>MARPEAU</b>	HCN	Gynécologie - Obstétrique
Mr Stéphane <b>MARRET</b>	HCN	Pédiatrie
Mme Véronique <b>MERLE</b>	HCN	Epidémiologie
Mr Pierre <b>MICHEL</b>	HCN	Hépatogastro-entérologie
M. Benoit <b>MISSET</b>	HCN	Réanimation Médicale
Mr Jean-François <b>MUIR</b> ( <i>surnombre</i> )	HB	Pneumologie
Mr Marc <b>MURAINÉ</b>	HCN	Ophthalmologie
Mr Philippe <b>MUSETTE</b>	HCN	Dermatologie - Vénérologie
Mr Christophe <b>PEILLON</b>	HCN	Chirurgie générale
Mr Christian <b>PFISTER</b>	HCN	Urologie
Mr Jean-Christophe <b>PLANTIER</b>	HCN	Bactériologie - Virologie
Mr Didier <b>PLISSONNIER</b>	HCN	Chirurgie vasculaire
Mr Gaëtan <b>PREVOST</b>	HCN	Endocrinologie
Mr Jean-Christophe <b>RICHARD</b> ( <i>détachement</i> )	HCN	Réanimation médicale - Médecine d'urgence
Mr Vincent <b>RICHARD</b>	UFR	Pharmacologie
Mme Nathalie <b>RIVES</b>	HCN	Biologie du développement et de la reproduction
Mr Horace <b>ROMAN</b>	HCN	Gynécologie - Obstétrique
Mr Jean-Christophe <b>SABOURIN</b>	HCN	Anatomie - Pathologie
Mr Guillaume <b>SAVOYE</b>	HCN	Hépatogastrologie
Mme Céline <b>SAVOYE-COLLET</b>	HCN	Imagerie médicale
Mme Pascale <b>SCHNEIDER</b>	HCN	Pédiatrie
Mr Michel <b>SCOTTE</b>	HCN	Chirurgie digestive
Mme Fabienne <b>TAMION</b>	HCN	Thérapeutique
Mr Luc <b>THIBERVILLE</b>	HCN	Pneumologie
Mr Christian <b>THUILLEZ</b> ( <i>surnombre</i> )	HB	Pharmacologie
Mr Hervé <b>TILLY</b>	CB	Hématologie et transfusion
M. Gilles <b>TOURNEL</b>	HCN	Médecine Légale
Mr Olivier <b>TROST</b>	HCN	Chirurgie Maxillo-Faciale
Mr Jean-Jacques <b>TUECH</b>	HCN	Chirurgie digestive
Mr Jean-Pierre <b>VANNIER</b> ( <i>surnombre</i> )	HCN	Pédiatrie génétique
Mr Benoît <b>VEBER</b>	HCN	Anesthésiologie - Réanimation chirurgicale
Mr Pierre <b>VERA</b>	CB	Biophysique et traitement de l'image
Mr Eric <b>VERIN</b>	HB	Service Santé Réadaptation
Mr Eric <b>VERSPYCK</b>	HCN	Gynécologie obstétrique
Mr Olivier <b>VITTECOQ</b>	HB	Rhumatologie
Mme Marie-Laure <b>WELTER</b>	HCN	Physiologie

## MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES – PRATICIENS HOSPITALIERS

Mme Noëlle <b>BARBIER-FREBOURG</b>	HCN	Bactériologie – Virologie
Mme Carole <b>BRASSE LAGNEL</b>	HCN	Biochimie
Mme Valérie <b>BRIDOUX HUYBRECHTS</b>	HCN	Chirurgie Vasculaire
Mr Gérard <b>BUCHONNET</b>	HCN	Hématologie
Mme Mireille <b>CASTANET</b>	HCN	Pédiatrie
Mme Nathalie <b>CHASTAN</b>	HCN	Neurophysiologie
Mme Sophie <b>CLAEYSSENS</b>	HCN	Biochimie et biologie moléculaire
Mr Moïse <b>COEFFIER</b>	HCN	Nutrition
Mr Serge <b>JACQUOT</b>	UFR	Immunologie
Mr Joël <b>LADNER</b>	HCN	Epidémiologie, économie de la santé
Mr Jean-Baptiste <b>LATOUCHE</b>	UFR	Biologie cellulaire
Mr Thomas <b>MOUREZ</b>	HCN	Virologie
Mr Gaël <b>NICOLAS</b>	HCN	Génétique
Mme Muriel <b>QUILLARD</b>	HCN	Biochimie et biologie moléculaire
Mme Laëtitia <b>ROLLIN</b>	HCN	Médecine du Travail
Mr Mathieu <b>SALAUN</b>	HCN	Pneumologie
Mme Pascale <b>SAUGIER-VEBER</b>	HCN	Génétique
Mme Anne-Claire <b>TOBENAS-DUJARDIN</b>	HCN	Anatomie
Mr David <b>WALLON</b>	HCN	Neurologie

## PROFESSEUR AGREGE OU CERTIFIE

Mr Thierry <b>WABLE</b>	UFR	Communication
Mme Mélanie <b>AUVRAY-HAMEL</b>	UFR	Anglais

## II - PHARMACIE

### PROFESSEURS

Mr Thierry <b>BESSON</b>	Chimie Thérapeutique
Mr Roland <b>CAPRON</b> (PU-PH)	Biophysique
Mr Jean <b>COSTENTIN</b> (Professeur émérite)	Pharmacologie
Mme Isabelle <b>DUBUS</b>	Biochimie
Mr Loïc <b>FAVENNEC</b> (PU-PH)	Parasitologie
Mr Jean Pierre <b>GOULLE</b> (Professeur émérite)	Toxicologie
Mr Michel <b>GUERBET</b>	Toxicologie
Mme Isabelle <b>LEROUX - NICOLLET</b>	Physiologie
Mme Christelle <b>MONTEIL</b>	Toxicologie
Mme Martine <b>PESTEL-CARON</b> (PU-PH)	Microbiologie
Mr Rémi <b>VARIN</b> (PU-PH)	Pharmacie clinique
Mr Jean-Marie <b>VAUGEUIS</b>	Pharmacologie
Mr Philippe <b>VERITE</b>	Chimie analytique

### MAITRES DE CONFERENCES

Mme Cécile <b>BARBOT</b>	Chimie Générale et Minérale
Mr Jérémy <b>BELLIEN</b> (MCU-PH)	Pharmacologie
Mr Frédéric <b>BOUNOURE</b>	Pharmacie Galénique
Mr Abdeslam <b>CHAGRAOUI</b>	Physiologie
Mme Camille <b>CHARBONNIER (LE CLEZIO)</b>	Statistiques
Mme Elizabeth <b>CHOSSON</b>	Botanique
Mme Marie Catherine <b>CONCE-CHEMTOB</b>	Législation pharmaceutique et économie de la santé
Mme Cécile <b>CORBIERE</b>	Biochimie
Mr Eric <b>DITTMAR</b>	Biophysique
Mme Nathalie <b>DOURMAP</b>	Pharmacologie
Mme Isabelle <b>DUBUC</b>	Pharmacologie
Mme Dominique <b>DUTERTE- BOUCHER</b>	Pharmacologie
Mr Abdelhakim <b>ELOMRI</b>	Pharmacognosie
Mr François <b>ESTOUR</b>	Chimie Organique
Mr Gilles <b>GARGALA</b> (MCU-PH)	Parasitologie

Mme Nejla EL <b>GHARBI-HAMZA</b>	Chimie analytique
Mme Marie-Laure <b>GROULT</b>	Botanique
Mr Hervé <b>HUE</b>	Biophysique et mathématiques
Mme Laetitia <b>LE GOFF</b>	Parasitologie – Immunologie
Mme Hong <b>LU</b>	Biologie
M. Jérémie <b>MARTINET</b> (MCU-PH)	Immunologie
Mme Marine <b>MALLETER</b>	Toxicologie
Mme Sabine <b>MENAGER</b>	Chimie organique
Mme Tiphaine <b>ROGEZ-FLORENT</b>	Chimie analytique
Mr Mohamed <b>SKIBA</b>	Pharmacie galénique
Mme Malika <b>SKIBA</b>	Pharmacie galénique
Mme Christine <b>THARASSE</b>	Chimie thérapeutique
Mr Frédéric <b>ZIEGLER</b>	Biochimie

#### **PROFESSEURS ASSOCIES**

Mme Cécile <b>GUERARD-DETUNQC</b>	Pharmacie officinale
Mr Jean-François <b>HOUIVET</b>	Pharmacie officinale

#### **PROFESSEUR CERTIFIE**

Mme Mathilde <b>GUERIN</b>	Anglais
----------------------------	---------

#### **ASSISTANT HOSPITALO-UNIVERSITAIRE**

Mme Anaïs <b>SOARES</b>	Bactériologie
-------------------------	---------------

#### **ATTACHES TEMPORAIRES D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE**

Mme Anne-Sophie <b>CHAMPY</b>	Pharmacognosie
M. Jonathan <b>HEDOUIN</b>	Chimie Organique
Mme Barbara <b>LAMY-PELLETER</b>	Pharmacie Galénique

## LISTE DES RESPONSABLES DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES

Mme Cécile <b>BARBOT</b>	Chimie Générale et minérale
Mr Thierry <b>BESSON</b>	Chimie thérapeutique
Mr Roland <b>CAPRON</b>	Biophysique
Mme Marie-Catherine <b>CONCE-CHEMTOB</b>	Législation et économie de la santé
Mme Elisabeth <b>CHOSSON</b>	Botanique
Mme Isabelle <b>DUBUS</b>	Biochimie
Mr Abdelhakim <b>ELOMRI</b>	Pharmacognosie
Mr Loïc <b>FAVENNEC</b>	Parasitologie
Mr Michel <b>GUERBET</b>	Toxicologie
Mr François <b>ESTOUR</b>	Chimie organique
Mme Isabelle <b>LEROUX-NICOLLET</b>	Physiologie
Mme Martine <b>PESTEL-CARON</b>	Microbiologie
Mr Mohamed <b>SKIBA</b>	Pharmacie galénique
Mr Rémi <b>VARIN</b>	Pharmacie clinique
M. Jean-Marie <b>VAUGEOIS</b>	Pharmacologie
Mr Philippe <b>VERITE</b>	Chimie analytique

### III – MEDECINE GENERALE

#### PROFESSEUR

Mr Jean-Loup **HERMIL** (PH-PH) UFR Médecine générale

#### MAITRE DE CONFERENCE

Mr Matthieu **SCHUERS** (MCU-PH) UFR Médecine générale

#### PROFESSEURS ASSOCIES A MI-TEMPS – MEDECINS GENERALISTE

Mr Emmanuel **LEFEBVRE** UFR Médecine Générale

Mme Elisabeth **MAUVIARD** UFR Médecine générale

Mr Philippe **NGUYEN THANH** UFR Médecine générale

Mme Marie Thérèse **THUEUX** UFR Médecine générale

#### MAITRE DE CONFERENCES ASSOCIE A MI-TEMPS – MEDECINS GENERALISTES

Mr Pascal **BOULET** UFR Médecine générale

Mr Emmanuel **HAZARD** UFR Médecine Générale

Mme Marianne **LAINÉ** UFR Médecine Générale

Mme Lucile **PELLERIN** UFR Médecine générale

Mme Yveline **SEVRIN** UFR Médecine générale

## ENSEIGNANTS MONO-APPARTENANTS

### PROFESSEURS

Mr Serguei <b>FETISSOV</b> (med)	Physiologie (ADEN)
Mr Paul <b>MULDER</b> (phar)	Sciences du Médicament
Mme Su <b>RUAN</b> (med)	Génie Informatique

### MAITRES DE CONFERENCES

Mr Sahil <b>ADRIOUCH</b> (med)	Biochimie et biologie moléculaire (Unité Inserm 905)
Mme Gaëlle <b>BOUGEARD-DENOYELLE</b> (med)	Biochimie et biologie moléculaire (UMR 1079)
Mme Carine <b>CLEREN</b> (med)	Neurosciences (Néovasc)
M. Sylvain <b>FRAINEAU</b> (med)	Physiologie (Inserm U 1096)
Mme Pascaline <b>GAILDRAT</b> (med)	Génétique moléculaire humaine (UMR 1079)
Mr Nicolas <b>GUEROUT</b> (med)	Chirurgie Expérimentale
Mme Rachel <b>LETELLIER</b> (med)	Physiologie
Mme Christine <b>RONDANINO</b> (med)	Physiologie de la reproduction
Mr Antoine <b>OUVRARD-PASCAUD</b> (med)	Physiologie (Unité Inserm 1076)
Mr Frédéric <b>PASQUET</b>	Sciences du langage, orthophonie
Mme Isabelle <b>TOURNIER</b> (med)	Biochimie (UMR 1079)

### **CHEF DES SERVICES ADMINISTRATIFS : Mme Véronique DELAFONTAINE**

*HCN - Hôpital Charles Nicolle*

*CB - Centre Henri Becquerel*

*CRMPR - Centre Régional de Médecine Physique et de Réadaptation*

*HB - Hôpital de BOIS GUILLAUME*

*CHS - Centre Hospitalier Spécialisé du Rouvray*

*SJ - Saint Julien Rouen*

## Table des matières

<b>Introduction</b> .....	1
<b>Rappel historique et bibliographique</b> .....	2
1. Anémies hémolytiques auto-immunes .....	2
1.1. Classification des AHAI .....	2
1.1.1. AHAI à auto-anticorps chauds .....	3
1.1.2. AHAI à auto-anticorps froids .....	4
1.1.2.1. AHAI à auto-anticorps froids transitoires .....	5
1.1.2.2. Maladie chronique des agglutinines froides .....	5
1.1.2.3. Hémoglobinurie paroxystique <i>a frigore</i> .....	5
1.1.3. AHAI à auto-anticorps mixtes .....	6
1.1.4. AHAI associées à un traitement .....	6
1.1.4.1. AHAI médicamenteuses .....	6
1.1.4.2. AHAI post-transfusionnelles .....	7
1.2. Physiopathologie des AHAI .....	7
1.2.1. Rupture de tolérance .....	8
1.2.2. Destruction des globules rouges .....	9
1.2.3. AHAI médicamenteuses et transfusionnelles .....	11
1.2.4. Manifestations cliniques associées aux AHAI .....	12
1.3. Diagnostic biologique des AHAI .....	12
1.3.1. Le test direct à l'antiglobuline .....	12
1.3.1.1. Principe .....	12
1.3.1.2. Limites techniques .....	15
1.3.2. Le test indirect à l'antiglobuline .....	15
1.3.3. L'élution .....	16
1.3.4. Spécificités techniques de certaines AHAI .....	16
1.4. Prise en charge des AHAI .....	17
1.4.1. Prise en charge médicamenteuse .....	17
1.4.2. Prise en charge transfusionnelle .....	19
1.4.3. Pronostic de l'AHAI .....	20
2. AHAI et transfusion sanguine .....	21
2.1. AHAI et degré d'allo-immunisation .....	21
2.1.1. Pourcentage de patients allo-immunisés .....	21
2.1.2. Raisons de l'allo-immunisation .....	22
2.1.3. Caractéristiques des allo-anticorps .....	22



2.1.4. Variabilité des résultats.....	22
2.2. AHAI et sécurité transfusionnelle.....	23
2.2.1. Analyses pré-transfusionnelles.....	23
2.2.2. Difficultés analytiques au cours de l’AHAI.....	24
2.2.3. Techniques associées à l’AHAI.....	25
2.3. Auto-adsorptions.....	25
2.3.1. Principe général.....	26
2.3.2. Techniques d’amélioration.....	26
2.3.3. Limites.....	27
2.4. Allo-adsorptions.....	29
2.4.1. Principe général.....	30
2.4.2. Technique alternative.....	31
2.4.3. Limites.....	32
2.5. Options analytiques supplémentaires.....	32
2.5.1. Dilutions.....	33
2.5.2. Unités de CGR « les moins incompatibles ».....	34
2.5.3. Phénotypage / Génotypage.....	34
3. Objectifs de l’étude.....	36
3.1. Fréquence d’allo-immunisation chez les patients transfusés porteurs d’auto-anticorps.....	36
3.1.1. Objectif principal.....	36
3.1.2. Objectif secondaire.....	37
3.2. Comparaison de techniques.....	37
3.2.1. Objectif principal.....	37
3.2.2. Objectif secondaire.....	38
<b>Matériels et Méthodes.....</b>	<b>39</b>
1. Etude rétrospective de l’allo-immunisation de patients auto-immunisés.....	39
1.1. Population, recueil de données et prélèvements.....	39
1.2. Prélèvements.....	39
1.3. Données collectées.....	39
2. Techniques disponibles afin de sécuriser la transfusion de patients auto-immunisés.....	40
2.1. Techniques initiales.....	41
2.1.1. RAI.....	41
2.1.2. TDA.....	41
2.2. Allo-adsorptions.....	41

2.2.1. Papaïne.....	42
2.2.2. Allo-adsorption sans PEG.....	42
2.2.3. Allo-adsorption avec PEG .....	43
2.2.4. Allo-adsorption en présence de LISS.....	43
2.3. Elution, dilution et titrage de l’auto-anticorps .....	44
2.3.1. Elution .....	45
2.3.2. Dilutions .....	45
2.3.2.1. Dilutions plasmatiques .....	45
2.3.2.2. Dilutions de l’éluat.....	45
2.3.3. Titrage de l’auto-anticorps .....	45
<b>Résultats</b> .....	47
1. Fréquence de l’allo-immunisation de patients porteurs d’auto-anticorps .....	47
1.1. Caractéristiques de la cohorte de patients présentant un auto-anticorps .....	47
1.1.1 Caractéristiques générales des patients .....	47
1.1.2. Répartition des patients de l’étude en fonction de leur pathologie.....	47
1.1.3. Répartition des patients en fonction du TDA.....	48
1.2. Caractéristiques de l’allo-immunisation des patients auto-immunisés .....	50
1.2.1. Répartition des patients en fonction du type d’allo-immunisation .....	50
1.2.2. Caractéristiques des allo-anticorps retrouvés .....	52
1.2.2.1. Allo-anticorps majeurs .....	52
1.2.2.2. Allo-anticorps mineurs.....	52
1.2.3. Répartition des allo-anticorps en fonction du TDA .....	53
1.2.3.1. Allo-anticorps majeurs .....	53
1.2.3.2. Allo-anticorps mineurs.....	54
1.2.4. Allo-immunisations post-transfusionnelles .....	54
2. Sécurité transfusionnelle et auto-anticorps : comparaison des techniques .....	55
2.1. Caractéristiques générales de la cohorte .....	55
2.1.1 Profil des patients inclus .....	55
2.1.2. Répartition des patients en fonction du TDA .....	55
2.2. Techniques étudiées .....	56
2.2.1. Allo-adsorptions .....	56
2.2.2. Dilutions .....	59
<b>Discussion</b> .....	62
1. Fréquence d’allo-immunisation de patients porteurs d’auto-anticorps .....	62
1.1. Caractéristiques de la cohorte de patients présentant un auto-anticorps .....	62

1.1.1	Caractéristiques générales des patients .....	62
1.1.2.	Répartition des patients de l'étude en fonction de leur pathologie.....	62
1.1.3.	Répartition des patients en fonction du TDA.....	63
1.2.	Caractéristiques de l'allo-immunisation des patients auto-immunisés .....	64
1.2.1.	Répartition des patients en fonction du type d'allo-immunisation .....	64
1.2.2.	Caractéristiques des allo-anticorps retrouvés .....	65
1.2.2.1.	Allo-anticorps majeurs .....	65
1.2.2.2.	Allo-anticorps mineurs.....	65
1.2.3.	Répartition des allo-anticorps en fonction du TDA .....	65
1.2.4.	Allo-immunisations post-transfusionnelles .....	66
2.	Sécurité transfusionnelle et auto-anticorps : comparaison des techniques .....	66
2.1.	Caractéristiques générales de la cohorte .....	66
2.1.1	Profil des patients inclus .....	66
2.1.2.	Répartition des patients en fonction du TDA .....	67
2.2.	Techniques étudiées .....	67
2.2.1.	Allo-adsorptions .....	67
2.2.2.	Dilutions .....	70
	<b>Conclusion.....</b>	<b>72</b>

## Liste des tables

**Table 1.** Classification des anémies hémolytiques auto-immunes, Adapté de *Bass et Al, 2014*<sup>9</sup>.

**Table 2.** Incidence des différents types d'AHAI. D'après *Castilho, 2017*<sup>16</sup>.

**Table 3.** Médicaments associés aux différents mécanismes d'AHAI médicamenteuse. D'après *Bass et Al, 2014*<sup>9</sup>.

**Table 4.** Principales anomalies impliquées dans les mécanismes de destruction des GR lors des AHAI. Adapté de *Barcellini, 2015*<sup>44</sup>.

**Table 5.** Caractéristiques des différents types d'AHAI. D'après *Castilho, 2017*<sup>16</sup>.

**Table 6.** Options thérapeutiques de l'AHAI à auto-anticorps chauds. Adapté de *Salama, 2015*<sup>91</sup>.

**Table 7.** Allo-anticorps anti-érythrocytaires chez des patients présentant des auto-anticorps chauds.

**Table 8.** Exemple de cellules d'allo-adsorption permettant d'adsorber des auto-anticorps.

**Table 9.** Caractéristiques des participants à l'étude rétrospective sur l'allo-immunisation au cours de l'AHAI.

**Table 10.** Interprétation des résultats de la RAI sur plasma adsorbé.

**Table 11.** Titrage de l'auto-anticorps.

**Table 12.** Caractéristiques de la cohorte de patients porteurs d'auto-anticorps et non drépanocytaires.

**Table 13.** Caractéristiques des patients inclus dans la cohorte de l'étude portant sur les techniques réalisées en présence d'un auto-anticorps.

**Table 14.** Type et intensité du TDA en fonction du titre de l'auto-anticorps.

**Table 15.** Adsorption de l'auto-anticorps par différentes techniques. Nombre moyen de cycles nécessaires et durée moyenne estimée par technique.

**Table 16.** Allo-adsorptions par trois techniques différentes réalisées sur les mêmes échantillons.

**Table 17.** Corrélation entre le titre de l'auto-anticorps, l'intensité du TDA et le nombre de cycles d'allo-adsorption nécessaires pour s'affranchir de l'auto-anticorps.

**Table 18.** Résultats après dilutions au 1/2 et au 1/5 de 10 échantillons.

**Table 19.** Spécificité des allo-anticorps observés après des dilutions au 1/2 et au 1/5 chez 10 patients porteurs d'un auto-anticorps.

**Table 20.** Résultats après dilution de l'éluat au 1/2 et au 1/5.

## Liste des figures

**Figure 1.** Tolérance centrale et périphérique. D'après *Freedman et Al, 2005*<sup>34</sup>.

**Figure 2.** Rôle du complément dans l'AHAI.

**Figure 3.** Cible des auto-anticorps induits par les médicaments. Les lignes épaisses correspondent aux sites de fixations antigéniques de l'auto-anticorps. Après fixation du médicament à la membrane du GR, l'anticorps peut (a) être dirigé contre le médicament, (b) dirigé à la fois contre le médicament et la membrane du GR (complexe immun) ou (c) réagir essentiellement contre la membrane du GR, mimant un auto-anticorps. Adapté de *Garratty et Al, 2005*<sup>49</sup>.

**Figure 4.** Algorithme de réalisation d'éluions à partir d'échantillons de patients en fonction des résultats du TDA. Algorithme adapté de *Johnston et Belota*<sup>56</sup>.

**Figure 5.** Techniques utilisées pour le diagnostic biologique de l'AHAI. a) Réactions négatives et positives avec les différentes techniques de TDA (en haut, technique tube, au milieu technique micro-colonne, en bas technique plaque). b) Le TDA détecte l'antiglobuline et/ou le complément à la surface des GR, la détection de l'agglutination est visuelle. c) Différentes antiglobulines utilisables pour détecter une AHAI. Dans un premier temps, des AGH anti IgG et C3d sont utilisées. Si le TDA initial est négatif, un TDA avec AGH anti IgA, IgM et C3c peut être réalisé.

**Figure 6.** Test indirect à l'antiglobuline. Les auto-anticorps du patient vont se fixer à des GR d'un panel informatif, permettant de déterminer la spécificité de l'auto-anticorps.

**Figure 7.** Panel de 10 GR de phénotype informatif utilisé pour la détermination de la spécificité de l'allo-anticorps présent dans le sérum du patient lors des tests pré-transfusionnels. Les GR positifs en TIA vont permettre de caractériser l'allo-anticorps.

**Figure 8.** Auto-adsorption d'auto-anticorps dans le plasma/sérum de patients afin de détecter un éventuel allo-anticorps.

**Figure 9.** Auto-adsorption sur hématies autologues et risque de faux négatif en cas de transfusion récente (délai < 4 mois). D'après *T.Peyrard, 2009*<sup>135</sup>.

**Figure 10.** Allo-adsorption d'auto-anticorps dans le plasma/sérum de patients afin de détecter un éventuel allo-anticorps. Adapté de *Dara et al, 2017*<sup>143</sup>.

**Figure 11.** Titrage de l'auto-anticorps par technique de dilutions successives.

**Figure 12.** Répartition des différentes hémopathies associées à l'AHAI. Dans cette étude, 71 AHAI étaient secondaires à une hémopathie.

**Figure 13.** Répartition des TDA dans la cohorte de 319 patients.

**Figure 14.** Répartition des différentes pathologies par TDA.

**Figure 15.** Répartition des TDA dans l'AHAI.

**Figure 16.** Répartition des patients présentant une image de pan-agglutination selon leur allo-immunisation (nombre et pourcentage). Parmi les allo-immunisations, répartition des allo-anticorps selon leur importance transfusionnelle.

**Figure 17.** Répartition de l'allo-immunisation chez des patients ayant nécessité des techniques d'allo-adsorption en vue de leur prise en charge transfusionnelle.

**Figure 18.** Répartition du nombre d'allo-anticorps par patient allo-immunisé (Pourcentage %).

**Figure 19.** Répartition des allo-anticorps majeurs retrouvés chez les patients allo-immunisés.

**Figure 20.** Répartition des allo-anticorps mineurs chez les patients allo-immunisés.

**Figure 21.** Répartition des allo-anticorps par TDA.

**Figure 22.** Répartition des allo-anticorps majeurs en fonction du TDA.

**Figure 23.** Répartition des allo-anticorps mineurs en fonction du TDA.

**Figure 24.** Allo-anticorps mis en évidence suite à une dilution au 1/2 des échantillons plasmatiques.

**Figure 25.** Allo-anticorps mis en évidence suite à une dilution au 1/5 des échantillons plasmatiques.

## Liste des logigrammes

**Logigramme 1.** Prise en charge des échantillons de patients porteurs d'auto-anticorps, nécessitant une transfusion sanguine.

**Logigramme 2.** Phénotype érythrocytaire à respecter en fonction de la réactivité de l'auto-anticorps en présence d'un traitement enzymatique.

**Logigramme 3.** Allo-adsorption à réaliser en fonction de l'intensité du TDA.

## Table des abréviations

ADCC : Cytotoxicité Cellulaire Dépendant des Anticorps

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

AGH : AntiGlobulines Humaines

AHAI : Anémie Hémolitique Auto-Immune

CAM : Complexe d'Attaque Membranaire

CGR : Concentrés de Globules Rouges

CIVD : Coagulation IntraVasculaire Disséminée

CMV : CytoMégaloVirus

DTT : Dithiothreitol

EBV : Epstein-Barr Virus

EDTA : EthyleneDiamineTetraAceticacid

EFS : Etablissement Français du Sang

FcR : Recepteur Fc

GR : Globule Rouge

G6PD : Glucose 6 Phosphate Deshydrogénase

HLA : Human Leukocyte Antigen

HPF : Hémoglobinurie Paroxystique *a Frigore*

HTA : HyperTension Artérielle

Ig : Immunoglobuline

LES : Lupus Erythémateux Systémique

LDH : Lactates DésHydrogénases

LISS : Low Ionic Stength Saline

LLC : Leucémie Lymphoïde Chronique

LNH : Lymphome Non Hodgkinien

NK : Cellule Natural Killer



PEG : PolyEthylène Glycol

PTI : Purpura Thrombopénique Immunologique

RAI : Recherche d'Agglutinines Irrégulières

RH : Rhésus

SAPL : Syndrome des Anti-PhosphoLipides

SMD : Syndromes MyéloDysplasiques

TDA : Test Direct à l'Antiglobuline

TIA : Test Indirect à l'Antiglobuline

VIH : Virus de l'Immuno-déficience Humaine

VPN : Valeurs Prédictives Négatives

VPP : Valeurs Prédictives Positives

## **Introduction**

L'anémie hémolytique auto-immune (AHAI) est responsable d'une destruction accélérée des globules rouges (GR) par un mécanisme immunologique.

Dans cette pathologie, la production d'auto-anticorps dirigés contre la membrane des GR provoque leur sensibilisation et/ou l'activation du complément, ce qui va entraîner la destruction des GR dans la circulation sanguine ou leur clairance par le système réticulo-endothélial. La sensibilisation peut se faire directement par fixation de l'auto-anticorps sur les antigènes de GR ou par le biais d'un haptène comme dans l'anémie hémolytique médicamenteuse.

Chez les patients pour lesquels l'hémolyse est sévère, des transfusions sanguines sont souvent nécessaires pour compenser l'anémie.

Il y a une trentaine d'années, plusieurs études ont montré qu'entre 10 et 40% des patients transfusés porteurs d'un auto-anticorps sont allo-immunisés avec un allo-anticorps d'intérêt clinique pouvant entraîner des hémolyses post-transfusionnelles. Malgré l'apparition de techniques plus sensibles pour détecter un éventuel allo-anticorps chez ces patients et des recommandations transfusionnelles plus strictes, aucune étude actualisée n'a été réalisée. Dans ce travail, une étude rétrospective a été menée au sein d'une cohorte de patients d'Ile-de-France sur la fréquence d'allo-immunisation de patients porteurs d'un auto-anticorps.

Par ailleurs, chez les patients nécessitant une transfusion sanguine et porteurs d'un auto-anticorps, la détection d'éventuels allo-anticorps masqués par l'auto-anticorps est régulièrement un challenge technique.

Pour répondre à cette problématique, des techniques d'adsorption en présence de différents réactifs sont largement employées pour détecter d'éventuels allo-anticorps masqués par un auto-anticorps.

D'autres options, telles que les dilutions de plasma/sérum ou de l'éluat ont également été proposées afin de permettre une prise en charge plus rapide des patients en urgence transfusionnelle.

Afin de répondre aux besoins des prescripteurs, ce travail a évalué de manière prospective la rapidité et l'efficacité de différentes techniques afin de déterminer, en fonction du degré d'urgence, la meilleure conduite à tenir.

## Rappel historique et bibliographique

La durée de circulation des GR peut être raccourcie par diverses causes immunes ou non immunes entraînant des hémolyses<sup>1</sup>. Cette clairance accélérée est initialement compensée par une augmentation de l'activité médullaire, mais lorsque la production n'arrive plus à égaler les pertes, on observe l'apparition d'une anémie.

### 1. Anémies hémolytiques auto-immunes

L'AHAI est une pathologie rare, causée par des anticorps auto-réactifs envers les GR et responsables de leur destruction par un mécanisme immunologique complexe.

Cette pathologie, dont le tableau clinico-biologique est celui d'une anémie consécutive à une hémolyse, affecte à la fois les enfants<sup>2</sup> (généralement avant l'âge de 5 ans) et les adultes. L'incidence annuelle de cette pathologie est comprise entre 1 et 3 pour 100 000 individus<sup>3</sup>. Les AHAI de l'enfant se développent essentiellement suite à une infection virale chez ceux souffrant d'immunodéficience ou de syndrome lymphoprolifératif<sup>4</sup>. Chez l'adulte, les AHAI surviennent généralement après 40 ans avec un pic d'incidence après 65 ans. Cette répartition peut s'expliquer par un risque accru de développer une pathologie lymphoproliférative ou un dérèglement du système immunitaire avec l'âge<sup>5</sup>, bien que dans un certain nombre de cas, la cause de l'AHAI n'est pas connue et est considérée comme idiopathique. Dans les premières années de vie, les garçons semblent plus fréquemment touchés par cette pathologie<sup>6</sup> alors que dans la population adulte, on observe une prédominance d'AHAI chez les femmes<sup>7</sup>.

#### 1.1. Classification des AHAI

La classification des AHAI est principalement basée sur les propriétés immunochimiques de l'auto-anticorps dirigé contre les GR<sup>8</sup>. En effet, l'optimum thermique auquel l'auto-anticorps va pouvoir s'attacher à la membrane du GR va permettre de classer les AHAI en deux grandes familles qui regroupent la majorité des cas : les AHAI à auto-anticorps chauds et les AHAI à auto-anticorps froids. La distinction entre AHAI à auto-anticorps chauds et AHAI à auto-anticorps froids est primordiale car elle informe non seulement sur les caractéristiques de la maladie et les pathologies associées, mais aussi sur le traitement. Les AHAI à auto-anticorps mixtes et les AHAI médicamenteuses sont, quant à elles, moins fréquentes (**Table 1**).

Les AHAI peuvent également être subdivisées selon leur nature primaire (idiopathique) ou secondaire<sup>9</sup> (associée). De nombreuses pathologies ont été rapportées comme étant associées et potentiellement impliquées dans la physiopathologie des AHAI. En moyenne, les formes

secondaires représentent 50% des cas d’AHAI à auto-anticorps chauds<sup>7</sup> et sont majoritaires dans les AHAI à auto-anticorps froids. Malgré l’appartenance à un sous-type d’AHAI, la physiopathologie, le diagnostic, les traitements et le pronostic varient beaucoup d’une entité à une autre.

**Table 1.** Classification des anémies hémolytiques auto-immunes, Adapté de *Bass et Al*, 2014<sup>9</sup>.

<u>Classification des anémies hémolytiques auto-immunes</u>	
I. AHAI à auto-anticorps chauds: Optimum thermique de l’auto-anticorps à +37°C	
A. Primaire ou idiopathique	
B. Secondaire	
i. Associée à un syndrome lymphoprolifératif (lymphome non Hodgkinien, leucémie lymphoïde chronique (LLC), ...)	
ii. Associé à une pathologie auto-immune (lupus érythémateux systémique (LES), ...)	
iii. Associé à une pathologie maligne non lymphoïde (cancer ovarien, ...)	
iv. Associé à un syndrome inflammatoire chronique (colite ulcéreuse, ...)	
v. AHAI médicamenteuse	
II. AHAI à auto-anticorps froids: Optimum thermique de l’auto-anticorps < +37°C	
A. Maladie des agglutinines froides	
i. Primaire ou idiopathique	
ii. Secondaire	
a. Post-infectieuse (mycoplasme, mononucléose infectieuse)	
b. Associé à un syndrome lymphoprolifératif touchant les lymphocytes B	
B. Hémoglobinurie paroxystique <i>a frigore</i> (Syndrome de Donath-Landsteiner)	
III. AHAI mixte: caractérisée par la présence à la fois d’auto-anticorps chauds et d’auto-anticorps froids	
A. Primaire ou idiopathique	
B. Secondaire (souvent associé à des maladies rhumatismales)	
IV. AHAI médicamenteuse: Associé à environ 150 médicaments	
A. AHAI dépendante du médicament	
i. Haptène ou adsorption du médicament	
ii. Complexe immun	
B. AHAI indépendante du médicament	

### 1.1.1. AHAI à auto-anticorps chauds

L’AHAI à auto-anticorps chauds est la plus fréquente des AHAI (75% des cas) avec une incidence annuelle estimée de 1 sur 80 000 patients (**Table 2**). Chez les enfants dont l’âge est compris entre 2 et 12 ans<sup>3</sup>, c’est ce type d’AHAI qui est le plus fréquemment rencontré. Dans 50% des cas d’AHAI à auto-anticorps chauds, la pathologie est considérée comme étant

idiopathique<sup>10</sup>. L'autre moitié des AHAI à auto-anticorps chauds est secondaire à diverses pathologies telles que la mononucléose infectieuse, le lupus érythémateux systémique (LES), des hépatites auto-immunes, des virus immunodéficients ainsi que des pathologies lymphoprolifératives et auto-immunes<sup>11</sup>. Parmi les pathologies lymphoprolifératives associées aux AHAI, la leucémie lymphoïde chronique (LLC) est de loin la plus fréquente<sup>12</sup>. En effet, environ 11% des patients ayant une LLC développent une AHAI secondaire à leur maladie alors que seuls 2-3% des patients suivis pour un lymphome Hodgkinien ou non Hodgkinien vont être touchés.

Dans l'AHAI à auto-anticorps chauds, l'auto-anticorps est généralement une immunoglobuline (Ig) polyclonale de type G (IgG), souvent une IgG1, dont l'optimum de fixation aux GR est à +37°C (35-40°C). Ces auto-anticorps sont principalement dirigés contre des antigènes du système Rhésus (anti-RH17, anti-RH29) mais des spécificités LWa, LWab, Wrb, KEL4 (Kpb), JK :1 (Jka) et MNS5 (U) ont été rapportées<sup>13</sup>. De façon moins fréquente, des auto-anticorps de type IgM<sup>14</sup> (donnant des hémolyses souvent sévères<sup>13</sup>) ou IgA, actifs à 37°C et dirigés contre la membrane des globules rouges peuvent être observés<sup>15</sup>.

Dans l'AHAI à auto-anticorps chauds, l'hémolyse est principalement extravasculaire et a majoritairement lieu au niveau de la rate.

**Table 2.** Incidence des différents types d'AHAI. D'après *Castilho*, 2017<sup>16</sup>.

Type d'AHAI	Incidence
AHAI à auto-anticorps chauds	70-80%
AHAI à auto-anticorps froids	20-30%
Hémoglobinurie paroxystique <i>a frigore</i>	< 2% (essentiellement chez les enfants)
AHAI à auto-anticorps mixtes	7-8%
AHAI médicamenteuse	12-18%

### 1.1.2. AHAI à auto-anticorps froids

L'AHAI à auto-anticorps froids représente 20 à 30% des cas d'AHAI. Les auto-anticorps froids sont principalement des IgM, pentamériques, capables d'activer la voie classique du complément après fixation aux GR du patient à des températures inférieures à +30°C (optimum thermique de +4°C). *In vitro*, la fraction C3d du complément est le reflet de la fixation des IgM qui s'éluent rapidement de la surface des GR *in vivo*. Les AHAI à auto-anticorps froids regroupent l'AHAI à auto-anticorps froids transitoires, la maladie des agglutinines froides ainsi que l'hémoglobinurie paroxystique *a frigore* (HPF).

### **1.1.2.1. AHAI à auto-anticorps froids transitoires**

L'AHAI à auto-anticorps froids transitoire apparaît chez les enfants et les jeunes adultes à la suite d'une infection bactérienne (*Mycoplasma pneumoniae*)<sup>17</sup> ou virale (Cytomégalovirus (CMV), Epstein-Barr Virus (EBV)). Les auto-anticorps observés sont généralement de type IgM, polyclonaux et ciblent les antigènes du système I/i. Le titre de l'IgM est relativement bas, compris entre 1/64 et 1/500. Après fixation de l'IgM à basse température, l'AHAI transitoire connaît souvent un début brutal caractérisé par une hémolyse intravasculaire avec activation de la cascade du complément, de la fraction C3 jusqu'au complexe d'attaque membranaire (CAM)<sup>18</sup>.

### **1.1.2.2. Maladie chronique des agglutinines froides**

La maladie chronique des agglutinines froides touche essentiellement des personnes de plus de 50 ans (**Table 2**). Dans 90% des cas, cette pathologie est secondaire à un syndrome lymphoprolifératif produisant le plus souvent une IgM<sub>K</sub> monoclonale ayant une spécificité anti-I/i, dont le titre est généralement supérieur à 1/500. Les auto-anticorps dirigés contre les antigènes H, Pr ou P sont beaucoup moins fréquents<sup>13</sup>. De plus, des auto-anticorps de type IgA ou IgG peuvent être retrouvés de façon anecdotique. La maladie des agglutinines froides entraîne une hémolyse extravasculaire exacerbée par le froid. La phagocytose des GR ciblés par l'auto-anticorps a principalement lieu au niveau des cellules de Kupffer du foie. En plus des symptômes associés à l'anémie liée à l'hémolyse, les patients peuvent avoir des troubles circulatoires associés au froid tels que l'acrocyanose<sup>19</sup>.

### **1.1.2.3. Hémoglobinurie paroxystique a frigore**

L'HPF est retrouvée dans moins de 2% des AHAI de l'adulte et est aussi connue sous le nom de Syndrome de Donath-Landsteiner (**Table 2**)<sup>20</sup>. L'HPF représente 30% des AHAI de l'enfant. L'auto-anticorps est une IgG polyclonale (anticorps de Donath-Landsteiner) ciblant l'antigène P (GLOB1). A basse température (2-10°C)<sup>21</sup>, l'IgG va se fixer aux antigènes P à la surface des globules rouges puis va activer le complément lors du retour à des températures plus élevées (> +30°C), entraînant une hémolyse intravasculaire sévère<sup>22</sup>. L'HPF est une forme secondaire d'AHAI survenant principalement chez des enfants, dans la semaine suivant une infection respiratoire (*Mycoplasma pneumoniae*, virus)<sup>23</sup>. Jusqu'à l'utilisation des antibiothérapies, des HPF étaient retrouvées lors de cas de syphilis congénitale ou au cours des stades avancés de la maladie.

### 1.1.3. AHAI à auto-anticorps mixtes

L'AHAI à auto-anticorps mixtes est caractérisée par la présence concomitante d'auto-anticorps chauds (de type IgG principalement) et froids (essentiellement des IgM). Les AHAI à auto-anticorps mixtes représentent moins de 10% des AHAI et sont extrêmement rares chez les enfants<sup>24</sup> (**Table 2**). Cette forme d'AHAI peut être idiopathique ou secondaire à une pathologie auto-immune ou maligne telle que le LES (plus de 25% des patients lupiques développent une AHAI à auto-anticorps mixtes) ou le lymphome<sup>25</sup>. Les patients atteints présentent généralement des symptômes d'hémolyse extravasculaire liés aux auto-anticorps de type IgG ou IgM ayant un optimum thermique compris entre +4 et +37°C et dont la cible antigénique est variable<sup>21</sup>.

### 1.1.4. AHAI associées à un traitement

#### 1.1.4.1. AHAI médicamenteuses

Les AHAI médicamenteuses sont rares (incidence d'environ une personne sur un million, **Table 2**) et souvent sous-diagnostiquées. Les médicaments les plus souvent impliqués sont les antimicrobiens (42% des cas), notamment les céphalosporines de troisième génération (cefotetan et ceftriaxone)<sup>26</sup>. De nombreuses autres familles de médicaments ont été impliquées telles que les anti-inflammatoires dans 15% des cas et les antinéoplasiques, impliqués dans 11% des cas (**Table 3**).

**Table 3.** Médicaments associés aux différents mécanismes d'AHAI médicamenteuse. D'après *Bass et Al*, 2014<sup>9</sup>.

<b>I.</b>	<b>Adsorption du médicament à la surface du GR</b> Pénicilline, céphalosporines, tétracyclines, hydrocortisone, oxaliplatine et tolbutamide,...
<b>II.</b>	<b>Adsorption d'un complexe immun à la surface du GR</b> Metformine, quinine, quinidine, céphalosporines, amphotéricine B, rifampicine, thiopental, diclofenac,...
<b>III.</b>	<b>Modification de la membrane du GR par le médicament</b> Céphalosporines, carboplatine, cisplatine, oxaliplatine,...
<b>IV.</b>	<b>Mécanisme indépendant du médicament</b> Céphalosporines, méthyl dopa, levodopa, fludarabine, lenalidomide, procainamide, diclofenac,...

Les AHAI médicamenteuses sont dues à 4 mécanismes différents et sont classées en deux groupes : les AHAI à auto-anticorps dépendants du médicament (les plus fréquentes) ainsi que les AHAI à auto-anticorps indépendants du médicament.

Les mécanismes d'AHAI dépendants du médicament sont les suivants : adsorption du médicament à la surface du GR (haptène), adsorption d'un complexe immun à la surface du GR et modification de la membrane du GR par le médicament<sup>27</sup>.

L'AHAI liée à l'adsorption du médicament à la surface des GR est due à la fixation de l'auto-anticorps à l'haptène formé et est responsable d'une hémolyse extravasculaire disparaissant à l'arrêt du traitement.

Dans l'AHAI associée à l'adsorption d'un complexe immun activant le complément, l'hémolyse peut être intravasculaire et disparaît à l'arrêt du traitement.

L'AHAI secondaire à une modification de membrane du GR survient généralement après la prise de céphalotine ou de cisplatine.

Pour l'AHAI consécutive à un mécanisme auto-immun associé au médicament, elle est caractérisée par une hémolyse extravasculaire. L'hémolyse persiste après l'arrêt du traitement. La méthyl dopa (Aldomet®), historiquement utilisée dans le traitement de l'hypertension artérielle (HTA), la levodopa, employée dans le traitement de la maladie de Parkinson et le procainamide (Pronestyl®), un anti-arythmique, sont responsables de la production d'auto-anticorps anti-GR<sup>28</sup>.

#### **1.1.4.2. AHAI post-transfusionnelles**

L'AHAI secondaire à des transfusions sanguines est rare et peu reconnue comme complication transfusionnelle<sup>29</sup>. De nombreux cas d'auto-immunisations conduisant à des AHAI pouvant être sévères ont pourtant été décrits, notamment chez des patients polytransfusés<sup>30</sup>. L'auto-anticorps, dont le potentiel hémolytique est souvent faible, apparaît généralement de façon concomitante ou après une allo-immunisation<sup>31</sup>. L'incidence de ces AHAI post-transfusionnelles n'a pas été établie et la physiopathologie n'est, à ce jour, pas bien connue<sup>32</sup>.

### **1.2. Physiopathologie des AHAI**

L'AHAI est la résultante d'un processus complexe, multi-étapes, n'impliquant pas seulement l'auto-anticorps mais également divers effecteurs du système immunitaire. Ainsi, le système du complément, les macrophages et les lymphocytes (T et B) participent au développement de la pathologie. L'AHAI est la résultante d'une rupture de tolérance, aboutissant à la production d'auto-anticorps anti-érythrocytaires entraînant une destruction accélérée des GR sensibilisés. Tandis que les mécanismes menant à l'hémolyse ont été partiellement élucidés, les mécanismes menant à la rupture de tolérance comportent encore de nombreuses inconnues.



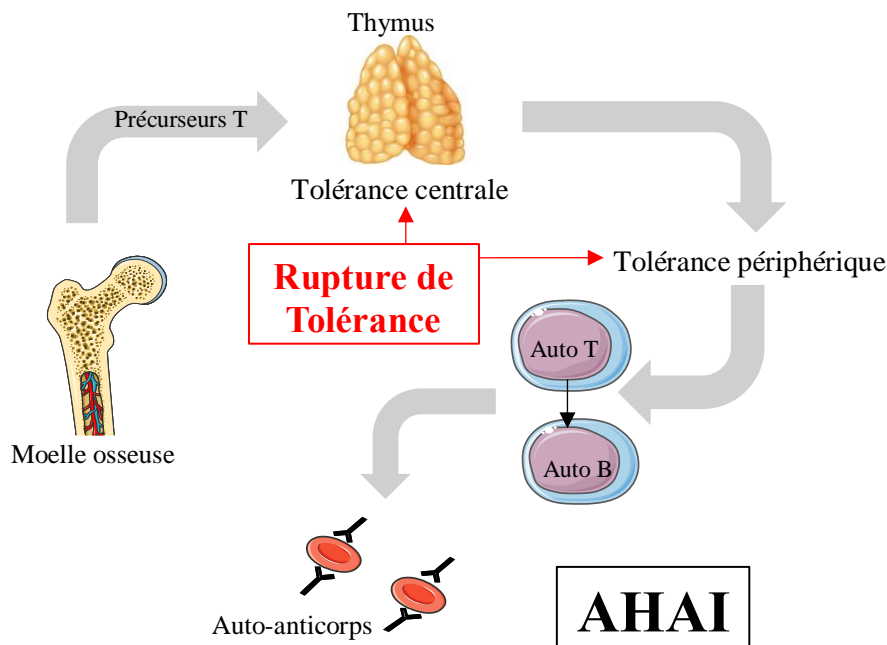
### 1.2.1. Rupture de tolérance

Des études portant sur l'AHAI chez l'homme et l'animal (les souris NZB et NZB/NZW développent un syndrome auto-immun complexe incluant une AHAI<sup>33</sup>) suggèrent que la perte de tolérance aux auto-antigènes de GR peut apparaître suite à différents mécanismes pouvant s'additionner. Ainsi, des anomalies du système immunitaire, des modifications antigéniques et des facteurs génétiques ou environnementaux concourent à la rupture de tolérance<sup>34</sup>.

Concernant les anomalies du système immunitaire, des dysfonctionnements touchant les lymphocytes B et les lymphocytes T (Th1, Th2, Th17, Treg) ont été rapportés.

Pour les lymphocytes B, des anomalies intrinsèques (défaut dans l'apoptose des lymphocytes auto-réactifs médiée par Fas/Fas-L<sup>35</sup>) peuvent être impliqués dans l'initiation de la pathologie auto-immune.

Pour les lymphocytes T, des déséquilibres de la balance Th1/Th2 (augmentation des cytokines associées aux lymphocytes Th2 (IL-4 et IL-10) et diminution des cytokines associées aux lymphocytes Th1 (IFN $\gamma$ )<sup>36,37</sup>), des défauts des lymphocytes T régulateurs (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>)<sup>38</sup> et des défauts d'élimination des lymphocytes T auto-réactifs (voie centrale ou périphérique, **Figure 1**) ont été rapportés.



**Figure 1.** Tolérance centrale et périphérique. D'après *Freedman et Al*, 2005<sup>34</sup>.

De plus, des activations polyclonales des lymphocytes T et B (initialement dirigés contre des antigènes bactériens ou viraux mais qui miment des antigènes érythrocytaires) ont également été décrites.

Les modifications antigéniques qui incluent le mimétisme moléculaire et la formation de cryptoantigènes<sup>39</sup> vont activer le système immunitaire, menant à la production d'auto-anticorps.

Par ailleurs, des facteurs génétiques tels que le phénotype HLA du patient ou l'environnement auquel il est exposé vont jouer un rôle dans l'apparition d'une AHAI. Ainsi, le HLA-DQ6 tout comme des molécules bactériennes ou virales ont été associés à l'AHAI<sup>40</sup>.

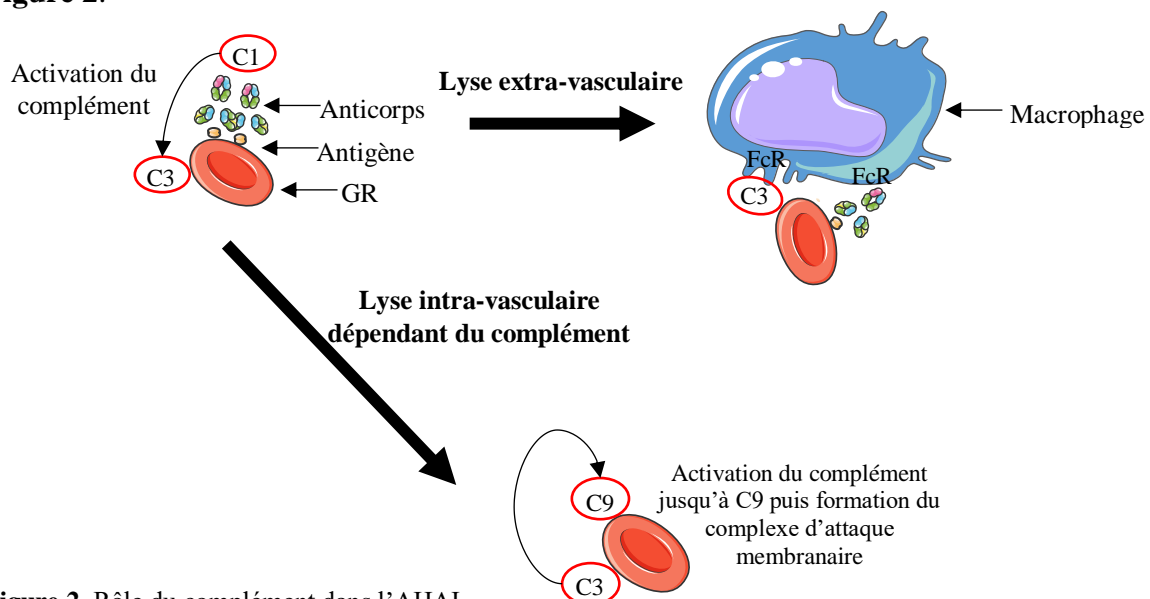
### 1.2.2. Destruction des globules rouges

Au cours de l'AHAI, on observe une destruction des GR par des auto-anticorps, avec ou sans activation du complément. Ces auto-anticorps sont produits par des lymphocytes B auto-réactifs, activés par les lymphocytes T<sup>13</sup> (**Figure 1**).

Le déterminant majeur de la sévérité clinique des AHAI est la pathogénicité de l'auto-anticorps. En effet, selon la classe (définie par sa partie Fc), la sous-classe (pour les IgG), la concentration (titre), la spécificité et l'optimum thermique de l'auto-anticorps, celui-ci n'aura pas la même affinité pour les GR, la même capacité à se fixer sur les récepteurs Fc (FcR) des cellules effectrices ni la même facilité à activer le complément.

Les auto-anticorps formés peuvent détruire les GR par un mécanisme de cytotoxicité cellulaire dépendant des anticorps (ADCC), médié par les lymphocytes cytotoxiques T CD8<sup>+</sup> et les cellules natural killer (NK)<sup>41</sup>. A travers leurs FcR, les macrophages peuvent également reconnaître et phagocyter les GR opsonisés par des auto-anticorps (érythrophagocytose)<sup>42</sup> ou par le complément (cytotoxicité médiée par le complément), **Figure 2**. Le complément est aussi capable d'induire une lyse osmotique des GR par le complexe d'attaque membranaire (CAM),

**Figure 2.**



**Figure 2.** Rôle du complément dans l'AHAI.

Les auto-anticorps anti-GR les plus fréquemment observés sont de type IgG, essentiellement dirigés contre le système Rhésus (RH), actifs à +37°C et principalement responsables d'une hémolyse extravasculaire via l'ADCC. Le titre de l'auto-anticorps va donner des indications sur le risque hémolytique associé à l'auto-anticorps. Si le titre est inférieur ou égal à 1/30, il ne sera pas nécessaire de déterminer les sous-classes de l'auto-anticorps car le risque hémolytique est faible. Par contre, si le titre est supérieur à 1/100, l'identification des sous-classes d'IgG présentes est importante car elles vont donner une indication sur le degré d'hémolyse<sup>43</sup>. En effet, les IgG1 et IgG3 sont les plus délétères pour les GR car elles se fixent mieux aux récepteurs Fc des macrophages. De plus, les IgG1 et IgG3 fixent mieux la fraction C1 du complément que les IgG2 et IgG4, permettant d'activer la voie du complément. Ainsi, le degré d'hémolyse sera plus important avec des IgG1 et IgG3 qu'avec des IgG2 et IgG4.

Les auto-anticorps de type IgM, dirigés contre le système I/i et dont l'optimum thermique est de +4°C peuvent fixer le complément et peuvent être responsables d'une hémolyse intravasculaire via le CAM ou d'une hémolyse extravasculaire par le biais de la fraction C3d (**Figure 2**).

La lyse directe par le complément a principalement lieu dans la circulation sanguine et dans le foie alors que l'ADCC et la phagocytose se passent essentiellement dans la rate (**Table 4**).

**Table 4.** Principales anomalies impliquées dans les mécanismes de destruction des GR lors des AHAI. Adapté de *Barcellini, 2015*<sup>44</sup>.

<b>Mécanisme pathogénique</b>	
<b>Auto-anticorps</b> IgG (tous les sous types) IgG1 et IgG3 IgM	Cytotoxicité cellulaire dépendant des anticorps (ADCC) Activation du complément Forte activation du complément
Système du complément	Complexe d'attaque membranaire (CAM) Phagocytose de GR opsonisés par le C3b
Immunité cellulaire	Augmentation de la cytotoxicité des NK Activation des lymphocytes T CD4 <sup>+</sup> auto-réactifs Augmentation du nombre de lymphocytes Th17 Diminution du nombre de lymphocytes T régulateurs

Tous ces mécanismes dépendent de l'auto-anticorps mais également de l'état d'activation des cellules effectrices. Ainsi, les infections ou vaccinations pourraient favoriser la destruction des GR par activation des cellules effectrices.

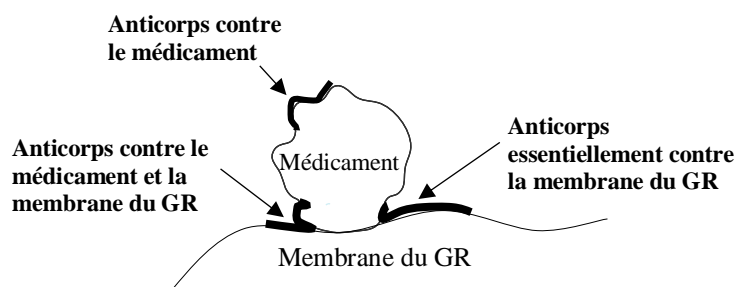
Par ailleurs, d'autres facteurs vont jouer sur le tableau clinique de l'AHAI tels que l'efficacité avec laquelle la moelle osseuse va réussir à produire des précurseurs erythroïdes<sup>45</sup>.

### 1.2.3. AHAI médicamenteuses et transfusionnelles

Plusieurs mécanismes peuvent conduire à des AHAI causées par les médicaments. Les auto-anticorps impliqués dans l'AHAI médicamenteuse peuvent être divisés en deux groupes : les auto-anticorps indépendants du médicament et les auto-anticorps dépendants du médicament<sup>46</sup>.

Les auto-anticorps indépendants du médicament regroupent d'une part les « vrais » auto-anticorps, apparaissant suite à la prise de médicaments affectant le système immunitaire<sup>47,48</sup> et d'autre part les auto-anticorps qui « miment » les « vrais » auto-anticorps, dirigés contre des antigènes de la membrane des GR (**Figure 3**).

Concernant les auto-anticorps dépendants du médicament, certains vont réagir contre le médicament fixé au GR et d'autres qui vont agir lorsqu'un complexe « médicament/anticorps/GR » va se former (**Figure 3**).



**Figure 3.** Cible des auto-anticorps induits par les médicaments. Les lignes épaisses correspondent aux sites de fixations antigéniques de l'auto-anticorps. Après fixation du médicament à la membrane du GR, l'anticorps peut (a) être dirigé contre le médicament, (b) dirigé à la fois contre le médicament et la membrane du GR (complexe immun) ou (c) réagir essentiellement contre la membrane du GR, mimant un auto-anticorps. Adapté de *Garratty et Al*, 2005<sup>49</sup>.

Par ailleurs, la formation d'auto-anticorps suite à une transfusion sanguine est désormais largement décrite. Plusieurs hypothèses concernant les mécanismes physiopathologiques ont été avancées<sup>50</sup>. Ainsi, les auto-anticorps post-transfusionnels ayant souvent été retrouvés en association avec des allo-immunisations, les allo-anticorps pourraient se fixer aux GR et entraîner une AHAI par cross-réactivité<sup>51</sup>. Dans le cas des patients polytransfusés, certains auraient une prédisposition à l'auto-immunisation, avec un dérèglement de leur système immunitaire lié à leur pathologie (patients drépanocytaires, porteurs d'un syndrome inflammatoire chronique). Enfin, l'AHAI pourrait survenir suite à la présence de lymphocytes exogènes, issus de transfusions sanguines antérieures, entraînant une réaction du greffon contre hôte.

#### **1.2.4. Manifestations cliniques associées aux AHAI**

Le diagnostic clinique de l'AHAI se base sur l'observation d'une asthénie, d'une pâleur, d'un ictère, ainsi que d'une splénomégalie. Les symptômes inauguraux sont généralement dus à l'anémie elle-même, bien qu'un ictère puisse être la première manifestation de la maladie. L'apparition des symptômes est généralement lente (sur plusieurs mois) et insidieuse. En effet, seul 60% des patients développent des symptômes associés à l'hémolyse : ictère, hémoglobinurie,... Certains patients développent une AHAI aigüe caractérisée par l'installation plus ou moins rapide de fièvre, pâleur, ictère, hépatosplénomégalie, dyspnée à l'effort, tachycardie et défaillance cardiaque. Enfin, dans l'AHAI secondaire, les symptômes de la pathologie sous-jacente peuvent masquer ceux de l'AHAI.

#### **1.3. Diagnostic biologique des AHAI**

L'AHAI se caractérise par une anémie normo ou macrocytaire régénérative (augmentation du taux de réticulocytes) et présente un tableau d'hémolyse avec augmentation du taux de bilirubine libre, augmentation des lactates déshydrogénases (LDH) et diminution de l'haptoglobine. Au frottis sanguin, des schizocytes sont visibles. Dans la moelle, une hyperplasie de la lignée rouge est classiquement retrouvée. Lorsque l'AHAI est suspectée, il est important d'éliminer les autres étiologies responsables d'hémolyse (immunes ou non immunes) telles que certaines maladies héréditaires (sphérocytose, déficit en G6PD, drépanocytose,...) ou acquises (parasitose,...).

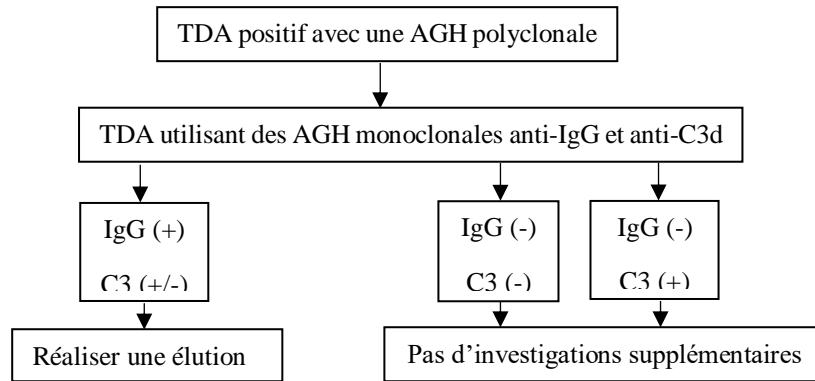
##### **1.3.1. Le test direct à l'antiglobuline**

###### **1.3.1.1. Principe**

Le diagnostic immuno-hématologique de l'AHAI repose sur le test direct à l'antiglobuline, TDA (anciennement appelé Test de Coombs Direct) qui est hautement sensible (sensibilité de 95%) et relativement spécifique (spécificité de 80%). Les valeurs prédictives positives (VPP) et négatives (VPN) du TDA dans la détection d'hémolyses immunologiques sont respectivement de 83% et 99%<sup>52,53</sup>.

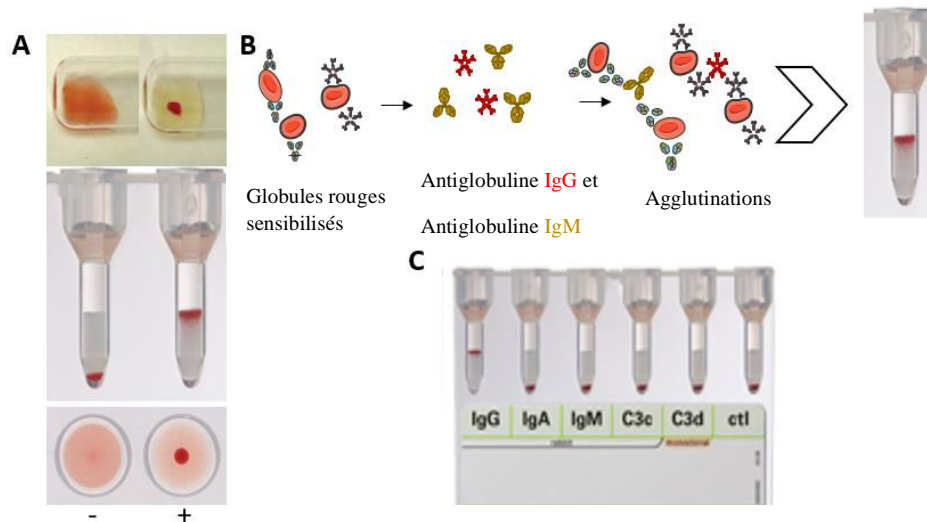
L'AHAI se définit biologiquement par un TDA positif sachant que des cas d'AHAI à TDA négatif ont été décrits. Pour positiver un TDA, le nombre d'Ig nécessaires à la surface des GR est compris entre 200 et 500<sup>54</sup>. Chez les patients atteints d'AHAI, le nombre moyen d'Ig par GR est de 3435 (206-20 000)<sup>55</sup>. Le TDA permet de détecter des immunoglobulines ou des fractions du complément fixées à la surface des GR en utilisant des antiglobulines humaines (AGH) anti-IgG et anti-C3d afin de classer l'hémolyse comme immune ou non immune.

Le TDA est initialement réalisé avec une AGH polyclonale fixant les GR sensibilisés par des Ig ou du complément. Si le TDA polyclonal est positif, un TDA utilisant des AGH monoclonales anti-IgG et anti-C3d va permettre de déterminer le type de l'auto-anticorps causal (**Figure 4**).



**Figure 4.** Algorithme de réalisation d'élutions à partir d'échantillons de patients en fonction des résultats du TDA. Algorithme adapté de *Johnston et Belota*<sup>56</sup>.

Le TDA peut être réalisé en tube, en micro-colonne ou en plaque et est positif dans 90% des cas d'AHAI<sup>57</sup> (**Figure 5a**). En technique micro-colonne (méthode la plus sensible), les GR sont filtrés à travers une matrice gélatineuse contenant de l'AGH. Le gel fixe en surface les GR du patient sensibilisés par des auto-anticorps et/ou du complément alors que les GR libres passent à travers la membrane et tombent au fond du gel (**Figure 5b**). L'utilisation d'anti-IgA<sup>58</sup>, d'anti-IgM ou de sous-types d'IgG<sup>59</sup> est indiquée chez des patients à la clinique évocatrice d'une AHAI mais présentant un TDA IgG et C3d négatif (**Figure 5c**).



**Figure 5.** Techniques utilisées pour le diagnostic biologique de l'AHAI. a) Réactions négatives et positives avec les différentes techniques de TDA (en haut, technique tube, au milieu technique micro-colonne, en bas technique plaque). b) Le TDA détecte l'antiglobuline et/ou le complément à la surface des GR, la détection de l'agglutination est visuelle. c) Différentes antiglobulines utilisables pour détecter une AHAI. Dans un premier temps, des AGH anti IgG et C3d sont utilisées. Si le TDA initial est négatif, un TDA avec AGH anti IgA, IgM et C3c peut être réalisé.

D'autres techniques, moins fréquemment utilisées peuvent être employées telles que le marquage à l'enzyme ou à un composé radioactif afin de détecter la présence d'Ig à la surface des GR<sup>59,60</sup>. Enfin, la cytométrie en flux est une bonne alternative au TDA car elle présente une bonne sensibilité dans la détection des immunoglobulines fixées aux GR<sup>61-64</sup>.

Bien que discutée<sup>65</sup>, l'intensité de l'agglutination lors du TDA (notée de 1+ à 4+) pourrait être en relation avec le degré d'hémolyse<sup>66</sup>. Néanmoins, un TDA positif peut persister chez des patients en rémission d'une AHAI<sup>67</sup>. Ainsi, le monitoring de patients atteints d'une AHAI sur l'intensité de leur TDA est controversé<sup>68</sup>.

Le TDA doit être interprété en parallèle avec le tableau clinique et les données de laboratoire<sup>69</sup> car il va être hautement indicatif dans la catégorisation des AHAI. En effet, chaque type d'AHAI possède une réactivité au TDA qui lui est propre, permettant, avec le tableau clinique de classer l'AHAI, ce qui va conditionner la prise en charge de la pathologie<sup>53</sup> (**Table 5**).

**Table 5.** Caractéristiques des différents types d'AHAI. D'après *Castilho*, 2017<sup>16</sup>.

Type d'AHAI	TDA		Plasma/Sérum	Eluat
	IgG	C3d		
<u>AHAI à auto-anticorps chauds</u>				
• Dans 50% des cas	+	+	Auto-anticorps de type IgG présents	L'IgG réagit avec des GR normaux
• Dans 33% des cas	+	0		
• Dans 10% des cas	0	+		
<u>Maladie des agglutinines froides</u>	0	+	Auto-anticorps de type IgM	Non réactif, le complément ne peut être élué
<u>AHAI à auto-anticorps mixtes</u>	+	+	Auto-anticorps IgG et IgM	L'IgG réagit avec des GR normaux
<u>HPF</u>	0	+	Hémolysine biphasique	Non réactif
<u>AHAI médicamenteuse</u>				
• Adsorption du médicament	+	0	IgG active avec les GR sensibilisés	IgG réactive avec des GR sensibilisés au médicament
• Complexe immun	0	+	IgG réagissant en présence du médicament	Non réactif
• Modification de membrane	+	+	Non réactif	Non réactif
• AHAI induite par le médicament	+	0	Auto-anticorps IgG	L'IgG réagit avec des GR normaux

### 1.3.1.2. Limites techniques

L'obtention d'un TDA positif sans aucune conséquence clinique n'est pas rare dans la population générale<sup>70</sup> (2-10%), il est retrouvé chez 1/1000 – 1/18000 donneurs de sang (7%)<sup>71</sup>. De plus, l'incidence d'un TDA positif chez des patients hospitalisés sans signe d'hémolyse est de 1-15%<sup>72</sup>.

Bien que des auto-anticorps peuvent être observés chez des patients sains de tous âges, leur incidence augmente avec l'âge et peuvent révéler une pathologie sous-jacente (auto-immune ou cancer<sup>71,73</sup>).

Par ailleurs, un TDA peut être faussement positif suite à des interférences techniques, à la prise de médicaments, à une fixation non spécifique d'Ig du patient sur ses GR ou suite à une allo-immunisation anti-GR.

A l'inverse, une AHAI à TDA négatif est retrouvée dans 5 à 10% des cas, généralement dû à un manque de sensibilité de la technique<sup>74</sup>. En effet, l'auto-anticorps peut être présent en quantité insuffisante pour être détecté par le TDA (moins de 150 auto-anticorps fixés par GR) ou avoir une faible affinité avec les GR du patient. L'utilisation de la cytométrie en flux permettrait de passer outre ce manque de sensibilité<sup>62</sup>.

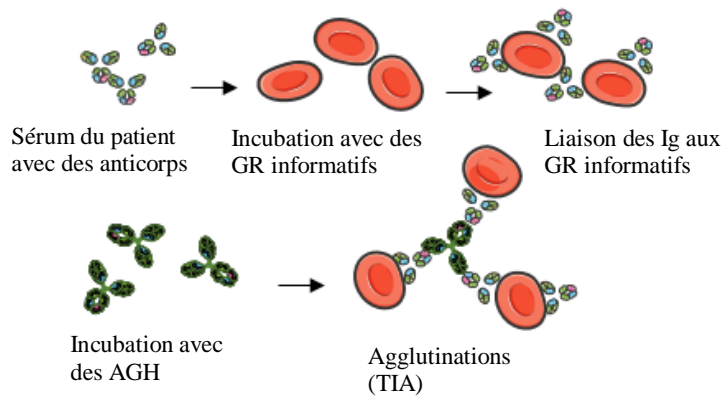
De plus, dans certains cas d'AHAI, l'antigène cible peut être affaibli de telle sorte que le TDA apparait négatif. Les antigènes AnWj, Co3, Ena, Ge3, JMH, JK1 (Jka), JK2 (Jkb), KEL4 (Kpb), LW, RH, Sc1, Sc3, MNS5 (U) et Vel ont par exemple été impliqués dans ce phénomène. Toutefois, l'AHAI à TDA négatif présente un tableau clinique souvent similaire aux AHAI à TDA positif<sup>75</sup>.

### 1.3.2. Le test indirect à l'antiglobuline

Dans 80% des cas d'AHAI, les auto-anticorps sont à la fois présents dans le sérum et fixés sur les GR<sup>76</sup>. Etant donné que le TDA fournit des informations sur la fixation de l'auto-anticorps aux GR, le test indirect à l'antiglobuline (TIA), employé au cours de la recherche d'agglutinines irrégulières (RAI) utilise des GR informatifs de dépistage et d'identification pour obtenir des indications sur la cible de l'auto-anticorps présent dans le plasma (**Figure 6**).

Au cours de l'AHAI, l'auto-anticorps peut positiver l'ensemble des GR informatifs de la RAI et donner une image de pan-agglutination.





**Figure 6.** Test indirect à l'antiglobuline. Les auto-anticorps du patient vont se fixer à des GR d'un panel informatif, permettant de déterminer la spécificité de l'auto-anticorps.

Dans l'AHAI à auto-anticorps chauds, l'auto-anticorps réagit généralement avec des antigènes présents sur les protéines Rh à la surface des GR et montre le plus souvent une image de pan-agglutination, excepté avec les GR Rh-null.

Dans l'AHAI à auto-anticorps froids, la spécificité de l'auto-anticorps pourra être déterminée avec des techniques complémentaires<sup>77</sup>. Par ailleurs, le titre de l'auto-anticorps n'est généralement pas informatif pour la prise en charge clinique.

### 1.3.3. L'éluion

En cas de TDA IgG positif, une éluion<sup>78</sup> des auto-anticorps fixés à la surface des GR sera réalisée afin de déterminer la spécificité de l'auto-anticorps par TIA<sup>11,79,80</sup>. L'éluion peut être réalisée par différentes méthodes comprenant le xylène, la glycine-HCl/ethylenediaminetetraaceticacid (EDTA), acide/glycine, la chaleur, le ZZAP (un mélange de dithiothreitol (DTT) et d'une enzyme : la papaïne activée par la cystéine) ou la chloroquine diphosphate. L'éluion à la glycine-HCl/EDTA semble être la façon la plus efficace pour retirer l'auto-anticorps de la surface des GR et permettre sa caractérisation.

Dans l'éluat, on ne retrouve la spécificité de l'auto-anticorps que dans 10 % des cas. Toutefois, l'identification de la spécificité de l'auto-anticorps est rarement utile car il ne semble pas exister de corrélation entre la spécificité de l'auto-anticorps et son potentiel hémolytique<sup>81</sup>.

### 1.3.4. Spécificités techniques de certaines AHAI

Pour l'HPF, un test de Donath-Landsteiner va être nécessaire afin de poser le diagnostic de la maladie. Il consiste en une mise en contact à froid, pendant 30 minutes, du sérum du patient supposé contenir une hémolysine biphasique IgG avec des hématies O porteuses de l'antigène P (GLOB1) en présence de complément. L'auto-anti-P va se lier aux GR et fixer le complément.

L'échantillon est ensuite réchauffé à +37°C, le complément fixé aux GR va entraîner leur hémolyse visualisable par une coloration rosée du plasma<sup>20</sup>.

Concernant l'AHAI médicamenteuse, la pathologie est généralement détectable biologiquement dans les deux semaines après le début de la prise du traitement incriminé. Le profil du TDA va permettre d'orienter vers le mécanisme de l'AHAI médicamenteuse (**Table 5**).

#### **1.4. Prise en charge des AHAI**

L'AHAI étant une pathologie rare, la plupart des options thérapeutiques sont issues de petites études rétrospectives, d'études de cas, de recommandations ou d'expériences empiriques.

Ainsi, le traitement de l'AHAI est principalement basé sur l'immunosuppression bien que de nombreux patients ne répondent pas à cette prise en charge et risquent de développer des effets indésirables dus à l'immunosuppression au long court<sup>9</sup>.

Par ailleurs, comme aucun traitement médicamenteux ne peut compenser une hémolyse d'installation rapide, la transfusion sanguine reste la mesure corrective la plus efficace chez les patients développant une anémie hypoxique symptomatique.

##### **1.4.1. Prise en charge médicamenteuse**

La prise en charge médicamenteuse des AHAI va dépendre à la fois du type d'AHAI et de son origine idiopathique ou secondaire.

Lorsque l'AHAI est secondaire, il faudra traiter la pathologie sous-jacente. Par exemple, en cas de pathologie lymphoproliférative, il conviendra d'avoir recours à la chimiothérapie. S'il s'agit d'une infection à *Mycoplasma pneumoniae*, une antibiothérapie sera nécessaire. Enfin, chez des patients atteints d'un LES, des corticostéroïdes seront administrés.

Lorsque l'AHAI est idiopathique, les corticostéroïdes constituent généralement la première ligne de traitement des AHAI à auto-anticorps chauds même si leur efficacité au long court n'est retrouvée que dans 15 à 20% des cas<sup>82</sup>. Le suivi du taux d'hémoglobine et de réticulocytes donne des indications sur l'efficacité du traitement. Néanmoins, dans un certain nombre de pathologies (psychiatriques, infectieuses, cardiovasculaires, diabète, glaucome, ostéoporose,...), le traitement par corticoïdes n'est pas recommandé. Ainsi, chez ces patients, des immunosuppresseurs tels que l'Azathioprine ou le Mycophenolate mofetil peuvent être une

alternative thérapeutique<sup>83</sup>. Le Cyclophosphamide peut également être utilisé chez des patients ne répondant pas bien ou ne tolérant pas le traitement par corticostéroïdes<sup>84</sup>.

Depuis le début des années 2000, un anticorps monoclonal anti-CD20, le Rituximab<sup>85</sup>, est utilisé en deuxième ou troisième ligne de traitement au cours de l’AHAI et semble initialement donner de bons résultats chez 60-70% des patients. Il est cependant responsable de nombreux effets indésirables<sup>86,87</sup>.

Par ailleurs, malgré de nombreuses publications sur la splénectomie<sup>88</sup> dans la prise en charge de l’AHAI à auto-anticorps chauds, les résultats obtenus ne sont pas concluants (**Table 6**).

Enfin, de nombreux autres traitements ont été utilisés au cours de l’AHAI à auto-anticorps chauds sans toutefois avoir démontré de preuve d’efficacité (Danazol, Ig intraveineuses)<sup>89,90</sup>.

**Table 6.** Options thérapeutiques de l’AHAI à auto-anticorps chauds. Adapté de *Salama*, 2015<sup>91</sup>.

Médicament	Posologie	Réponse au traitement (%)		
		Délai	Réponse initiale (%)	Réponse à long terme (%)
Prednisolone/Prednisone	1-2 mg/kg	1-3 semaines	70-80	<20
Dexamethasone	4x40 mg/jour	Quelques jours	70-80	<20
Azathioprine	2-4 mg/kg	1-3 mois	60-70	60-70
Mycophenolate mofetil	1-2 g/jour	4-6 semaines	60-70	60-70
Cyclophosphamide	1-2 mg/kg	2-4 semaines	80-90	80-90
Rituximab	4x375mg/m2/semaine	1-8 semaines	60-70	<20
Splénectomie	-	Quelques jours	<50	<50

Lors d’AHAI à auto-anticorps froids transitoires, généralement secondaires à une infection, le traitement de première ligne est l’antibiothérapie. Dans le cadre de l’AHAI à auto-anticorps froids sévère, un traitement par corticoïdes permettrait de réduire la durée de l’anémie.

Pour la maladie des agglutinines froides, il conviendra d’éviter le froid qui exacerbe l’hémolyse. En effet, chez ces patients, le froid va activer l’auto-anticorps responsable de thromboses intravasculaires, notamment au niveau des doigts, des oreilles et du nez. La splénectomie doit être évitée car l’AHAI à auto-anticorps froids est dépendante du complément, l’hémolyse a donc principalement lieu au niveau du foie. Le Rituximab<sup>92</sup> ainsi que le Chlorambucil et le Cyclophosphamide semblent efficaces. Compte tenu du lien entre la maladie des agglutinines froides et le complément, l’Eculizumab, un anticorps monoclonal anti-C5 est une piste thérapeutique. Les corticoïdes montrent quant à eux une efficacité limitée dans la prise en

charge de ces patients. Dans les formes les plus graves, la plasmaphérèse peut être une option thérapeutique.

Au cours de l'AHAI à auto-anticorps mixtes, l'efficacité du traitement par des corticoïdes peut s'avérer spectaculaire.

Concernant l'HPF, l'anémie est généralement spontanément résolutive en quelques semaines. Dans les cas d'HPF sévères, malgré de rares données soutenant leur efficacité, des glucocorticoïdes peuvent être utilisés afin de diminuer la production d'auto-anticorps et l'activation du complément responsables de la destruction des GR<sup>93</sup>. Dans les formes les plus graves, la plasmaphérèse peut être indiquée.

Enfin, dans la majorité des cas d'AHAI médicamenteuses, l'arrêt du traitement suffit à stopper les symptômes.

#### **1.4.2. Prise en charge transfusionnelle**

Bien que l'utilisation d'érythropoïétine recombinante permette de stimuler l'érythropoïèse et ainsi de diminuer l'anémie chronique des patients atteints d'AHAI, aucun traitement médicamenteux ne permet de compenser immédiatement l'hémolyse responsable de l'anémie hypoxique de ces patients.

La transfusion sanguine est donc souvent nécessaire chez des patients symptomatiques<sup>91</sup>, principalement ceux qui subissent une chute brutale du taux d'hémoglobine ou ceux qui ont des comorbidités (patients âgés, patients atteints de cardiopathies ou d'atteintes respiratoires). L'AHAI étant responsable de perturbations des tests pré-transfusionnels, des examens complémentaires vont être nécessaires afin de garantir la sécurité transfusionnelle des patients. L'efficacité de la transfusion sanguine chez ces patients va dépendre de la capacité des auto-anticorps, souvent pan-réactifs, à se fixer aux GR transfusés et à activer le complément.

Malgré les premières craintes<sup>94</sup>, il est admis qu'au cours de l'AHAI, la transfusion de concentrés de globules rouges (CGR) n'intensifie pas l'hémolyse<sup>65</sup>, hormis chez certains patients dont l'hémolyse est active avec un risque augmenté de coagulation intravasculaire disséminée (CIVD). Il est toutefois recommandé que le volume transfusé n'excède pas 1 mL/kg/heure<sup>95</sup>.

Il est admis qu'il n'est pas utile de respecter la spécificité d'un auto-anticorps, mis à part chez des patients porteurs d'un auto-anticorps de spécificité allotypique identifiée et pour qui la transfusion s'avère inefficace<sup>96</sup>.

Enfin, transfuser des patients porteurs d'un auto-anticorps n'apporte généralement pas de bénéfice à long terme étant donné que la survie des GR transfusés est équivalente aux GR du patient<sup>95</sup>.

Si le patient a développé un (ou plusieurs) allo-anticorps en plus des auto-anticorps, il semblerait que les CGR transfusés risquent d'être plus rapidement détruits. En effet, malgré l'hypothèse qu'au cours de l'AHAI, le système immunitaire de l'individu serait concentré sur la destruction des GR opsonisés par l'auto-anticorps<sup>97</sup>, il est certain que le système immunitaire de ces individus est hyperactif. Ainsi, transfuser des CGR incompatibles à ces patients risquerait de réactiver un allo-anticorps, amplifierait son titre, le rendrait plus avide et pourrait entraîner des hémolyses très sévères.

Dans le cas des AHAI à auto-anticorps froids de titre élevé, l'anémie est souvent d'installation rapide et nécessite une prise en charge transfusionnelle avec des CGR réchauffés à +37°C.

Dans les cas d'HPF sévères, les patients présentant une anémie mal tolérée d'installation rapide peuvent bénéficier de transfusions de CGR. En cas de transfusion sanguine, il n'est généralement pas nécessaire d'avoir recours à des CGR P-négatifs, ce phénotype étant rare. De plus, malgré l'absence de données consensuelles, plusieurs études suggèrent de transfuser les patients atteints d'HPF avec des CGR réchauffés<sup>76,98,99</sup>.

### **1.4.3. Pronostic de l'AHAI**

Le pronostic de l'AHAI est associé à la capacité de traiter la pathologie sous-jacente.

Chez les patients bon répondeurs au traitement de l'étiologie ayant entraîné l'AHAI, l'auto-anticorps n'a généralement pas de conséquence clinique au long cours.

Chez les patients présentant des AHAI idiopathiques et dont le traitement de première intention est un échec, des traitements de deuxième ligne peuvent être proposés avec une efficacité variable.

D'une manière générale, la mortalité de l'AHAI, bien que difficile à évaluer, reste élevée<sup>100</sup>. Elle est en partie liée à l'absence de traitements spécifiques du fait d'une méconnaissance des mécanismes physiopathologiques sous-jacents.

## 2. AHAI et transfusion sanguine

Selon le degré et la tolérance clinique de l'anémie, la transfusion de CGR est souvent nécessaire, parfois vitale, au cours de la prise en charge de l'AHAI. Le plasma/sérum de ces patients contient des auto-anticorps pouvant donner une image de pan-agglutination correspondant à l'agglutination de l'ensemble des hématies du panel. Cette pan-agglutination risque de masquer des allo-anticorps qui se seraient développés au décours d'une grossesse, d'une greffe ou d'une précédente transfusion. Etant donné que des allo-anticorps capables d'entraîner des hémolyses post-transfusionnelles sont retrouvés chez 10 à 40% des patients atteints d'AHAI<sup>101</sup>, les analyses pré-transfusionnelles ont un rôle primordial pour assurer la sécurité transfusionnelle des patients.

### 2.1. AHAI et degré d'allo-immunisation

Les études sur le degré d'allo-immunisation au cours de l'AHAI sont souvent contradictoires<sup>101,102</sup> mais il semblerait qu'il soit au moins équivalent aux pathologies nécessitant des transfusions itératives telles que la drépanocytose<sup>103,104</sup> (fréquence d'allo-immunisation comprise entre 20 et 50%<sup>105</sup>) ou la thalassémie. Des études de cohortes de patients suivis pour des AHAI sont venues étayer ce postulat.

#### 2.1.1. Pourcentage de patients allo-immunisés

Depuis une trentaine d'années, plusieurs études se sont intéressées à l'allo-immunisation des patients atteints d'AHAI. La majorité des études se sont concentrées sur les AHAI à auto-anticorps chauds et ont retrouvé des pourcentages d'allo-anticorps d'intérêt clinique compris entre 10 et 40% (**Table 7**).

**Table 7.** Allo-anticorps anti-érythrocytaires chez des patients présentant des auto-anticorps chauds.

Référence	Nombre d'allo-anticorps / Nombre de sérums	Pourcentage de sérums avec allo-anticorps
Salama et al. <sup>91</sup>	23/79	29
Morel et al. <sup>106</sup>	8/20	40
Branch et Petz <sup>107</sup>	5/14	36
Wallhermfechtel <sup>108</sup>	19/125	15
Laine et Beattie <sup>109</sup>	41/109	38
James et al. <sup>110</sup>	13/41	32
Issitt et al. <sup>111</sup>	13/34	38
Issitt et al. <sup>111</sup>	5/41	12
Leger et Garratty <sup>112</sup>	105/263	40
So et al. <sup>113</sup>	8/67	12
Yurek et al. <sup>114</sup>	3/36	8
Maley et al. <sup>115</sup>	39/126	31
Total	279/955	29

Par ailleurs, une étude réalisée sur 8 ans chez des patients présentant des auto-anticorps froids ou chauds a retrouvé un taux d'allo-anticorps de 13.7% (294/2149 patients présentant des auto-anticorps)<sup>116</sup>. Cette étude ne peut être comparée à celles précédemment citées car les auteurs n'ont pas séparé les auto-anticorps chauds des froids, mais elle suggère un taux d'allo-immunisation plus faible que dans les autres études.

### **2.1.2. Raisons de l'allo-immunisation**

L'étude de So et al<sup>113</sup> a montré que chez des patients hospitalisés nécessitant une transfusion sanguine, le taux d'allo-immunisation est bien plus élevé chez des patients atteints d'AHAI (11.9%) que dans la population générale (3.7% sur 27952 échantillons testés en 1 an). Les caractéristiques de l'AHAI peuvent expliquer ces variations. En effet, l'AHAI est une pathologie à prédominance féminine et d'apparition tardive, or le risque d'allo-immunisation augmente avec le nombre de grossesses. De plus, les patients atteints d'AHAI ont généralement recours à des transfusions sanguines chroniques et les fréquences d'allo-immunisation de ces patients concordent avec d'autres catégories de patients nécessitant des transfusions sanguines répétées tels que les drépanocytaires<sup>105</sup>. Enfin, ces taux d'allo-immunisation peuvent également refléter les perturbations du système immunitaire engendrées par l'AHAI.

### **2.1.3. Caractéristiques des allo-anticorps**

Dans les études précédemment citées, les auteurs ne se sont intéressés qu'aux allo-anticorps d'intérêt transfusionnel. Ainsi, seuls les allo-anticorps de phénotype RH (RH1 : D, RH2 : C, RH3 : E, RH4 : c, RH5 : e), Kell (KEL1), les allo-anticorps du système Kidd (JK1 (Jka), JK2 (Jkb)), MNS (MNS3 (S), MNS4 (s)) et Duffy (FY1 (Fya), FY2 (Fyb)) ont été comptabilisés. Plusieurs études ont mis en évidence que les allo-anticorps anti-RH (anti-RH3 (E) majoritairement, anti-RH2 (C)) et anti-KEL1 sont les plus fréquemment observés<sup>108,109,116</sup>. Les allo-anticorps présents mais sans incidence clinique tels que les anti-HI, les anti-A<sub>1</sub>, P<sub>1</sub>, Bg, Lea, Leb, Lua, CH/RG, Wra,...ont généralement été exclus des pourcentages d'allo-immunisation par les auteurs.

### **2.1.4. Variabilité des résultats**

La politique transfusionnelle du laboratoire peut expliquer les variations des taux d'allo-anticorps observés dans ces études. En effet, les laboratoires transfusant les patients atteints d'AHAI en phénotypé RH-KEL1 ont des taux d'allo-immunisation plus faibles car on n'apporte plus au patient les antigènes RH et KEL1 immunogènes<sup>108,109,116</sup>. De plus, si les examens

permettant de s'affranchir de l'auto-anticorps ne sont pas complets, l'auto-anticorps pourrait mimer un allo-anticorps et ainsi, le pourcentage d'allo-anticorps serait surestimé.

## **2.2. AHAI et sécurité transfusionnelle**

La présence d'auto-anticorps est généralement associée à l'AHAI mais ils peuvent également être retrouvés dans la population générale sans engendrer de signes cliniques d'hémolyse<sup>117,118</sup>. Néanmoins, les patients sains porteurs d'auto-anticorps ne vont pas nécessiter de transfusion sanguine. Seule la prise en charge immuno-hématologique des patients porteurs d'auto-anticorps associés à l'AHAI sera détaillée.

La sélection de sang compatible avec des patients atteints d'AHAI a toujours été un challenge puisque dans les techniques usuelles, les auto-anticorps plasmatiques/sériques risquent de masquer d'éventuel(s) allo-anticorps pouvant entraîner des hémolyses post-transfusionnelles<sup>95</sup>. Ainsi, la recherche et l'identification d'allo-anticorps représente une étape importante de la sécurité transfusionnelle, notamment lorsqu'il existe des antécédents de grossesse(s) et/ou de transfusions multiples.

### **2.2.1. Analyses pré-transfusionnelles**

Chez des patients allo-immunisés, la transfusion de CGR peut entraîner des complications à titre d'hémolyses post transfusionnelles. Dans le cadre de l'AHAI, entre 10 et 40% des patients sont allo-immunisés<sup>107-112,116</sup>. Ainsi au laboratoire, différentes techniques permettent de détecter une éventuelle allo-immunisation dans le but de prévenir des hémolyses post-transfusionnelles.

D'une manière générale, avant toute transfusion, la réalisation de tests pré-transfusionnels est règlementaire<sup>119</sup>. Ainsi, pour garantir la sécurité transfusionnelle d'un patient non connu, deux déterminations de groupe sanguin ABO associées à deux phénotypes RH-KEL1 ainsi qu'au dépistage d'anticorps dans le plasma/sérum du patient (RAI) par la technique TIA sont réalisés. La RAI a une validité règlementaire de 72 heures. Les anticorps, qu'il s'agisse d'auto ou d'allo-anticorps, sont détectés par screening du sérum du patient sur un panel de 3 GR informatifs puis leur spécificité est déterminée sur un panel d'au moins 10 GR de phénotypes variés (**Figure 7**). De plus, au cours de l'AHAI, l'auto-anticorps positive le témoin autologue réalisé au décours de la RAI, c'est-à-dire que lorsque le plasma du patient est mis en contact avec ses propres GR, on observe une agglutination. La positivité du témoin autologue dans la RAI oriente sur le caractère auto-immun de la réaction.



Antigènes de groupe sanguin les plus immunogènes

N° GR	RH								KEL				FY		JK		LE		MNS				P		LU		
	D	C	E	c	e	Gw	K	k	kpa	kpb	Fya	Fyb	Jka	Jkb	Laa	Lab	M	N	S	s	Pl	Lua	Lub	ϕ			
	1	2	3	4	5	8	1	2	3	4	1	2	1	2	1	2	1	2	3	4	1	1	2	ϕ			
1	0	+	0	+	+	0	0	+	0	+	0	+	0	+	+	0	+	+	+	0	+	0	+				
2	0	0	+	+	+	0	0	+	0	+	+	+	+	0	0	+	0	+	0	+	+	0	+				
3	0	0	0	+	+	0	+	+	0	+	+	0	+	0	0	0	0	+	0	+	+	0	+				
4	0	0	0	+	+	0	0	+	0	+	+	+	+	+	+	0	+	+	+	+	+	0	W				
5	0	0	0	+	+	0	0	+	+	+	+	+	+	+	0	0	+	0	0	+	+	0	+				
6	+	0	0	+	+	0	0	+	0	+	0	+	0	+	0	+	0	+	0	+	+	0	+				
7	+	0	+	+	0	0	0	+	0	+	+	+	0	+	0	+	+	+	+	+	0	+	+				
8	+	+	0	0	+	+	0	+	0	+	+	0	0	+	0	+	+	+	+	+	+	0	+				
9	+	+	0	0	+	0	+	+	0	+	0	+	0	+	0	0	+	+	+	0	0	0	+				
10	+	+	0	0	+	0	0	+	0	+	+	0	0	+	0	+	0	+	0	+	+	0	+				

**Figure 7.** Panel de 10 GR de phénotype informatif utilisé pour la détermination de la spécificité de l’allo-anticorps présent dans le sérum du patient lors des tests pré-transfusionnels. Les GR positifs en TIA vont permettre de caractériser l’allo-anticorps.

### 2.2.2. Difficultés analytiques au cours de l’AHAI

Lorsque des auto-anticorps chauds sont présents, ceux-ci réagissent généralement avec l’ensemble des GR du panel, y compris le témoin autologue, donnant une image de pan-agglutination en présence d’AGH à +37°C et vont potentiellement masquer la présence d’allo-anticorps sous-jacents<sup>13</sup>. Dans ce cadre, des techniques complémentaires vont devoir être mises en place afin de garantir la sécurité transfusionnelle des patients, car l’absence d’identification d’un allo-anticorps peut être responsable d’une augmentation de l’hémolyse pouvant être attribué à tort à une augmentation de la sévérité de l’AHAI<sup>120</sup>. Ainsi, un certain nombre de techniques ont été décrites afin de détecter un éventuel allo-anticorps initialement masqué par un auto-anticorps.

Dans l’AHAI à auto-anticorps froids, le témoin autologue, ainsi que les GR du panel utilisés pour la RAI en présence du plasma du patient, vont agglutiner à +4°C et à température ambiante. L’agglutination s’effectue généralement sans addition d’AGH compte tenu de la taille de l’IgM qui va mettre en contact les GR et donner l’image d’agglutination. Les auto-anticorps froids ne masquent habituellement pas d’éventuels allo-anticorps car la RAI est réalisée à +37°C, température à laquelle les IgM ne sont pas actives. Si l’auto-anticorps froid est actif à température d’ambiante, celui-ci pourra masquer la détection d’un allo-anticorps. A distance de toute transfusion, un traitement par DTT, inactivant les IgM en cassant les ponts disulfures nécessaires à la structure pentamérique de l’IgM pourra être réalisé. Ainsi, les auto-anticorps de type IgM seront détruits, laissant place à la détection d’un allo-anticorps de type IgG d’intérêt clinique. Cette technique présente toutefois l’inconvénient de diluer le sérum au demi, d’où un

risque de faux négatif pour des allo-anticorps de type IgG de faible titre. En contexte transfusionnel récent, les techniques permettant de s'affranchir de l'auto-anticorps froid sont les mêmes que celles utilisées pour les auto-anticorps chauds.

Un auto-anticorps froid pourra par ailleurs interférer avec le groupage ABO, réalisé à température ambiante, sans AGH. Un lavage des GR du patient en solution saline à chaud permet généralement de s'affranchir des problèmes d'auto-agglutination. Dans de rares cas, le groupage ABO devra être effectué après traitement des GR du patient avec de faibles concentrations de DTT.

### **2.2.3. Techniques associées à l'AHAI**

En cas d'AHAI, les techniques à réaliser afin de s'affranchir de l'auto-anticorps sont souvent lourdes, longues, chères et consomment beaucoup d'échantillon alors même que le besoin transfusionnel peut être urgent. Compte-tenu de l'urgence potentielle, réaliser les techniques les plus rapides pour mettre en évidence un allo-anticorps est un challenge<sup>121</sup>.

Une étroite communication entre le prescripteur et le laboratoire d'immuno-hématologie est indispensable afin, d'une part, de confirmer l'indication transfusionnelle et d'évaluer son rapport bénéfice/risque et, d'autre part, de définir si le délai d'exécution des investigations est compatible avec l'urgence clinique. Ainsi, en fonction du degré d'urgence transfusionnelle évalué par le clinicien, les techniques permettant de sécuriser la transfusion dans le temps imparti vont être mises en place.

Différentes approches, telles que les techniques de dilution de sérum, les caractérisations phénotypiques ou génotypiques ainsi que les méthodes d'adsorptions vont permettre de sécuriser la transfusion sanguine. Les techniques d'adsorption sur hématies autologues (patient) ou homologues (donneurs) apportent plus d'assurance quant à la présence d'allo-anticorps<sup>112</sup>.

### **2.3. Auto-adsorptions**

Différentes techniques peuvent être utilisées pour séquestrer l'auto-anticorps et ainsi permettre de démasquer un allo-anticorps sous-jacent.

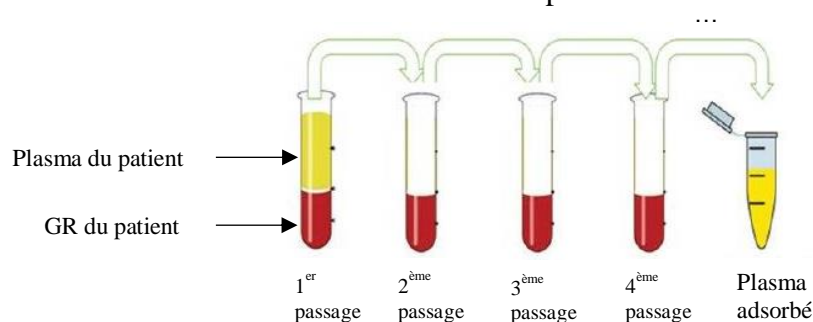
La technique la plus efficace pour retirer l'auto-anticorps est l'adsorption. Parmi les techniques d'adsorption, hormis les cas de transfusion récente ou d'auto-anticorps saturants, l'auto-adsorption est la méthode idéale pour la détection d'allo-anticorps d'intérêt clinique.

### 2.3.1. Principe général

L'auto-adsorption consiste en l'incubation des GR du patient avec son propre plasma/sérum afin de retirer l'auto-anticorps et permettre la détection d'allo-anticorps d'intérêt clinique (**Figure 8**). En cas d'AHAI à auto-anticorps chauds, l'auto-adsorption est réalisée à +37°C. Pour l'AHAI à auto-anticorps froids, l'auto-adsorption est réalisée à +4°C. Dans les cas d'AHAI à auto-anticorps mixtes, l'auto-adsorption du sérum pourra être effectuée en associant de manière séquentielle une série d'auto-adsorptions à +37°C et une série à +22°C (voire +4°C).

En fonction de l'intensité de l'auto-anticorps plasmatique/sérique (TIA compris entre 1+ et 4+), le plasma/sérum est auto-adsorbé sur un nombre plus ou moins important d'aliquotes de GR autologues afin de retirer l'intégralité des auto-anticorps (TIA 1+ → 1 adsorption, TIA 2+ → 2 adsorptions, ...). Un nombre d'adsorptions supérieur à quatre devrait être évité car chaque auto-adsorption entraîne une dilution du plasma/sérum et les allo-anticorps de faible intensité risquent de ne pas être mis en évidence (**Figure 8**).

Afin de s'assurer du degré de dilution au cours de l'auto-adsorption, la mesure de la concentration des protéines plasmatiques/sériques peut être réalisée en parallèle. Le plasma/sérum auto-adsorbé est ensuite mis en contact avec les GR du panel permettant l'identification d'un éventuel allo-anticorps.



**Figure 8.** Auto-adsorption d'auto-anticorps dans le plasma/sérum de patients afin de détecter un éventuel allo-anticorps.

### 2.3.2. Techniques d'amélioration

La capacité d'auto-adsorption des hématies autologues est limitée. Ceci est particulièrement vrai lorsque le titre de l'auto-anticorps est important, induisant une saturation des sites antigéniques érythrocytaires *in vivo*, alors peu accessibles pour la fixation d'auto-anticorps supplémentaires *in vitro*. Quand les auto-anticorps du patient sont fortement fixés sur ses GR (TDA fortement positif), différentes méthodes peuvent être employées pour dissocier l'auto-anticorps de la surface des GR avant de démarrer les techniques d'auto-adsorption<sup>122</sup>. Les

traitements pouvant être utilisés pour retirer l'auto-anticorps tout en maintenant intacts les GR comprennent la chloroquine diphosphate<sup>123</sup> (dissociation en deux heures), le ZZAP<sup>107</sup> (dissociation en une à deux heures), l'EDTA glycine acide (dissociation en 2 minutes), un gradient de centrifugation comprenant le pH et la densité<sup>124</sup> ou un bref passage des GR à +56°C<sup>102</sup>. Ces traitements vont éluer les auto-anticorps fixés à la surface des GR du patient, rendant les sites antigéniques disponibles pour une auto-adsorption des auto-anticorps plasmatiques *in vitro*. Une fois les auto-anticorps adsorbés du plasma/sérum, les allo-anticorps vont pouvoir être identifiés par RAI.

Par ailleurs, les auto-anticorps élués de la surface des GR vont pouvoir être identifiés sur le panel de GR informatifs et les GR libérés de l'auto-anticorps vont pouvoir être phénotypés.

Ces traitements peuvent être utilisés afin d'augmenter l'efficacité de l'auto-adsorption mais sont chronophages et présentent quelques inconvénients. Ils risquent en effet de détruire des antigènes cibles d'auto-anticorps. Si l'antigène cible est détruit par le traitement, les GR autologues ne pourront plus adsorber l'auto-anticorps. C'est par exemple le cas pour l'antigène KEL4 (Kpb), détruit par le DTT présent dans le ZZAP. Une alternative plus rapide (pas d'étape de pré-traitement des GR du patient) et moins chère consiste en une auto-adsorption en présence de polyéthylène glycol (PEG)<sup>125-127</sup> ou de solution de basse force ionique (LISS)<sup>128</sup> qui va permettre de s'affranchir de l'étape enzymatique en minimisant l'impact sur la sensibilité de détection d'un allo-anticorps sous-jacent<sup>102</sup>. En effet, le PEG est un polymère linéaire, neutre et hydrophile qui améliore l'avidité et l'affinité des anticorps pour les GR. Néanmoins, certaines équipes<sup>129,130</sup> ont retrouvé une moins bonne sensibilité de détection d'allo-anticorps avec le PEG (allo-anti-KEL1 et allo-anti-Jkb de faible intensité non retrouvés avec le PEG mais détectés par auto-adsorption en présence d'enzyme). La disparition ou la diminution de l'intensité de l'allo-anticorps en présence de PEG pourrait être dû à une précipitation des immunoglobulines par le PEG<sup>131,132</sup>. Le LISS va quant à lui accélérer l'interaction antigènes-anticorps en diminuant les forces ioniques qui s'opposent.

### 2.3.3. Limites

En cas de transfusion récente, l'auto-adsorption n'est pas recommandée.

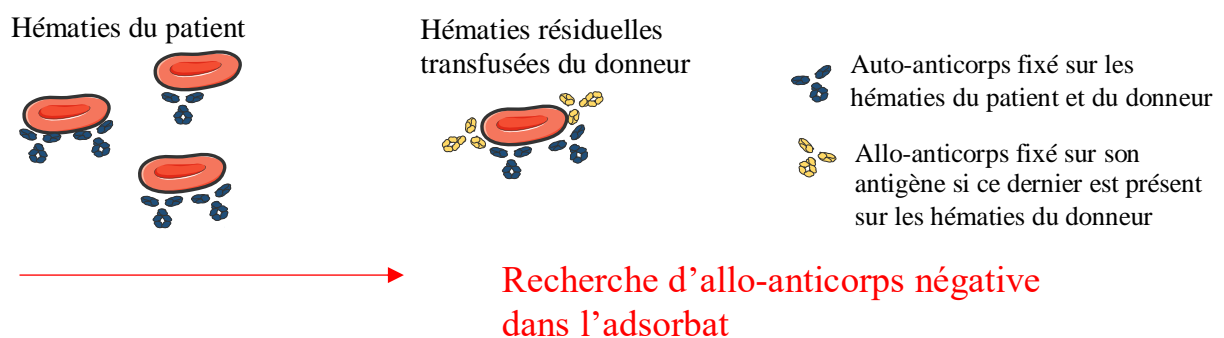
En effet, en cas de transfusion, des GR homologues vont être présents dans la circulation sanguine du patient et pourront adsorber un éventuel allo-anticorps si ces derniers présentent l'antigène correspondant<sup>133</sup>. Ceci pourrait conduire à un faux négatif lors de la recherche d'allo-anticorps anti-érythrocytaires sur l'adsorbat (**Figure 9**).

L'étude de Laine et al<sup>133</sup> a démontré que seuls 2 à 6% de GR d'un CGR transfusé étaient suffisants pour adsorber un allo-anticorps lors de l'épreuve d'auto-adsorption. D'une manière générale, lorsqu'une transfusion a eu lieu au cours des 4 derniers mois, 13% des GR circulants d'un receveur sont allogéniques (issus du donneur). Toutefois, la capacité des GR allogéniques à l'adsorption d'un allo-anticorps va varier en fonction du titre et de l'affinité de l'allo-anticorps ainsi que du nombre de sites antigéniques présents sur les GR transfusés.

Les GR ont une durée de vie comprise entre 110 et 120 jours et ont une demi-vie moyenne de 31 jours dans la circulation sanguine. Chez des patients porteurs d'un auto-anticorps sans AHAI, les GR autologues et homologues ont une survie normale. Il conviendra donc d'attendre 3-4 mois après la dernière transfusion avant d'effectuer une auto-adsorption.

Chez les patients présentant une AHAI, les GR transfusés (homologues), tout comme les GR du patient (autologues) auront une demi-vie raccourcie<sup>134</sup>. L'étude de Pirofsky<sup>118</sup> a montré que la demi-vie des GR de patients atteints d'AHAI à auto-anticorps chauds était comprise entre 2 et 25 jours. Ainsi chez des patients présentant une hémolyse sévère et nécessitant des transfusions répétées, une auto-adsorption pourrait être réalisée dans un délai bien plus court que trois mois. Néanmoins, étant donné que ces patients nécessitent des transfusions rapprochées, il conviendra, dans un souci de sécurité, de respecter un délai de 3 mois entre la dernière transfusion et une auto-adsorption.

De même, lors d'une grossesse récente, du fait du passage de GR du fœtus dans le sang maternel, il conviendra également d'attendre 3 mois avant toute auto-adsorption.



**Figure 9.** Auto-adsorption sur hématies autologues et risque de faux négatif en cas de transfusion récente (délai < 4 mois). D'après T.Peyrard, 2009<sup>135</sup>.

Ensuite, l'auto-adsorption nécessite de grands volumes de GR autologues et ne pourra être réalisée chez des patients atteints d'anémie sévère, avec un hématokrite trop bas.

Enfin, si l'auto-adsorption n'est pas complète, des auto-anticorps dont la spécificité mime des allo-anticorps peuvent interférer avec la détection de réels allo-anticorps<sup>136</sup>. En effet, l'équipe d'Issitt<sup>136</sup> a montré que 70% des auto-anti-Hr<sub>o</sub> et auto-anti-Hr partiellement adsorbés ressemblaient à des allo-anticorps anti RH5 (e), RH2 (C) ou RH3 (E). Par ailleurs, d'autres équipes ont montré que des auto-anticorps peuvent également mimer des spécificités autres que le système RH<sup>137-141</sup>. Ces observations sont directement liées à la sélection de CGR compatibles avec le receveur. Par exemple, dans l'étude d'Issitt<sup>111</sup>, un patient présentait après auto-adsorption des allo-anticorps anti-RH4 (c), RH3 (E) et JK1 (Jka). Il s'est avéré après allo-adsorptions supplémentaires sur des hématies RH-4 (c-), RH-3 (E-), JK-1 (Jka-) que le patient ne présentait qu'un allo-anticorps anti-RH3 (E) ; les anti-RH4 (c) et anti-JK1 (Jka) étaient en réalité des auto-anticorps mimant des allo-anticorps. Si le sérum du patient contient un allo-anticorps d'intérêt clinique, des CGR compatibles devront être sélectionnés (CGR sans l'antigène contre lequel le patient est immunisé). Si l'on est en présence d'un auto-anticorps mimant un allo-anticorps, ces précautions ne seront pas nécessaires et la transfusion pourra être plus rapide. Dans notre exemple, il était ainsi beaucoup plus facile, rapide et moins cher de trouver des CGR RH-3 (E-) que des CGR RH-4 (c-), RH-3 (E-), JK-1 (Jka-) pour transfuser le patient.

Néanmoins, si l'auto-anticorps mimant un allo-anticorps a tendance à se fixer sur l'antigène d'intérêt, il sera plus prudent de transfuser le patient avec des CGR « antigène négatif »<sup>136</sup>. Si l'auto-adsorption n'est pas suffisante pour retirer l'auto-anticorps et permettre la détection d'un allo-anticorps sous-jacent, une allo-adsorption peut être réalisée. Cependant, l'auto-adsorption est préférée à l'allo-adsorption car il y a risque d'adsorber des allo-anticorps dirigés contre des antigènes de haute fréquence (tels que des anti-Ge, anti-Vel) ou contre des antigènes variants.

Enfin, l'auto-adsorption ne requiert que les hématies du patient (GR autologue) contrairement à l'allo-adsorption qui utilise plusieurs hématies homologues de phénotypes érythrocytaires différents. Ainsi, l'auto-adsorption s'effectue plus facilement et permet de disposer d'un plus grand volume d'adsorbat pour effectuer des identifications d'allo-anticorps sous-jacents ou réaliser les tests de compatibilité des CGR.

#### **2.4. Allo-adsorptions**

L'allo-adsorption avec des GR de profil antigénique connu présente de nombreux avantages. Elle est utilisée pour adsorber l'auto-anticorps et détecter un éventuel allo-anticorps chez des patients anémiés ayant été récemment transfusés avec des CGR allogéniques. Par ailleurs, cette

technique ne nécessite pas de GR du patient, difficilement disponibles en cas d'anémie sévère. De plus, les hématies utilisées n'ont pas été sensibilisées *in vivo* par l'auto-anticorps et présentent donc une capacité d'adsorption plus importante que les hématies autologues.

### 2.4.1. Principe général

L'allo-adsorption consiste à mettre en présence *in vitro* le plasma/sérum du patient avec des hématies de donneurs de phénotype connu, judicieusement sélectionnées. L'allo-adsorption sur hématies homologues est rendue possible par le fait que les auto-anticorps reconnaissent classiquement un antigène érythrocytaire de fréquence élevée.

Si le phénotype érythrocytaire du patient n'est pas connu, l'allo-adsorption doit être réalisée en utilisant trois hématies de donneurs de groupe O qui couvrent le système RH (R1R1 : l'anti-RH3 (E) et l'anti-RH4 (c) restent dans l'adsorbat, R2R2 : l'anti-RH2 (C) et l'anti-RH5 (e) restent dans l'adsorbat, rr : l'anti-RH2 (C) et l'anti-RH3 (E) restent dans l'adsorbat), le système KEL, le système FY, le système JK et le système MNS. Ces trois cellules sont choisies de telle sorte qu'au moins l'une d'entre elles ne possède pas l'un des antigènes d'intérêt clinique : KEL1, FY1 (Fya), FY2 (Fyb), JK1 (Jka), JK2 (Jkb), MNS1 (M), MNS2 (N), MNS3 (S) et MSN4 (s) (**Table 8**).

**Table 8.** Exemple de cellules d'allo-adsorption permettant d'adsorber des auto-anticorps.

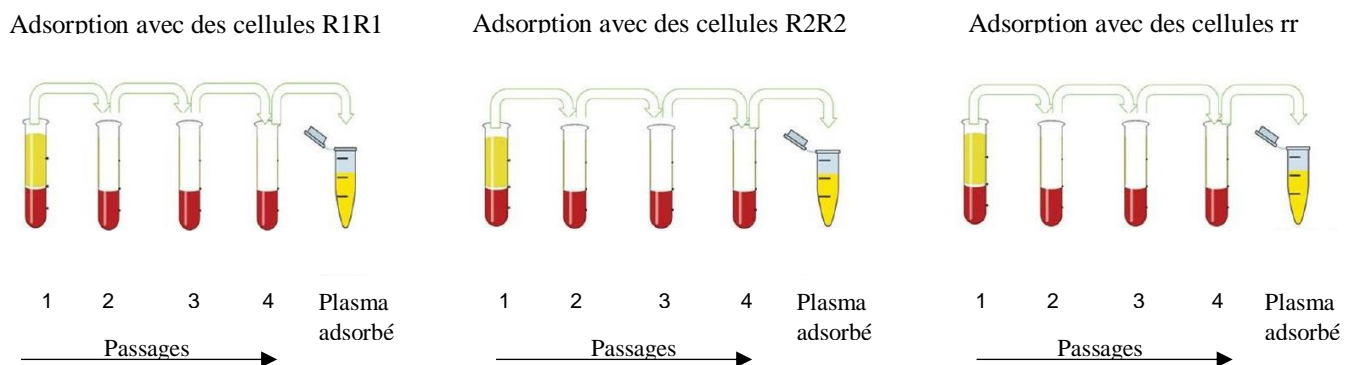
Cellule	Rhésus	RH					Kell		Duffy		Kidd		MNS			
		D	C	E	c	e	K	k	Fya	Fyb	Jka	Jkb	S	s	M	N
1	R1R1	+	+	0	0	+	0	+	+	0	0	+	0	+	0	+
2	R2R2	+	0	+	+	0	0	+	+	0	+	+	+	+	+	+
3	rr	0	0	0	+	+	+	+	0	+	+	0	0	+	+	0

Les traitements enzymatiques tels que la ficine, la papaine ou le ZZAP sont utilisés pour augmenter l'efficacité de l'allo-adsorption de l'auto-anticorps. Ces traitements protéolytiques vont également être utilisés pour leur pouvoir dénaturant envers certains antigènes de groupe sanguin. Ainsi, si l'allo-adsorption se fait sur des cellules traitées par du ZZAP, les antigènes KEL1, FY1 (Fya), FY2 (Fyb) et MSN vont être détruits, permettant la détection d'allo-anticorps dans ces systèmes de groupe sanguin. Il suffira alors de s'assurer de la présence d'une cellule JK-1 (Jka-) et d'une cellule JK-2 (Jkb-). Si l'adsorption se fait sur des cellules traitées par des enzymes, les antigènes FY1 (Fya), FY2 (Fyb) et MSN vont être détruits, il conviendra alors d'avoir au moins une cellule JK-1 (Jka-), une cellule JK-2 (Jkb-) et une cellule KEL-1.

De plus, tout comme pour l'auto-adsorption, un traitement par PEG ou LISS va augmenter l'affinité de l'auto-anticorps pour l'antigène et va ainsi raccourcir le délai de réalisation technique, permettant une prise en charge transfusionnelle plus rapide.

Le plasma/sérum du patient, divisé en trois aliquotes, va être mis en contact avec ces trois cellules à +37°C. La durée d'incubation dépend des traitements enzymatiques employés. Ainsi, pour l'allo-adsorption en présence de papaine ou de ZZAP, chaque passage dure 30 minutes<sup>112,142</sup> alors qu'en présence de LISS ou de PEG, l'incubation est de 15 minutes<sup>112,126,128,142</sup>. Plusieurs passages d'allo-adsorptions vont être réalisés jusqu'à disparition de l'auto-anticorps dans l'adsorbat (**Figure 10**).

Une RAI est ensuite réalisée sur l'adsorbat. Les images obtenues sur le panel d'identification après allo-adsorption sur les trois cellules vont être comparées entre elles afin de mettre en évidence un éventuel allo-anticorps sous-jacent. L'objectif étant qu'au moins une des cellules d'allo-adsorption n'adsorbe pas un allo-anticorps sous-jacent. Une des limites de cette technique consiste à obtenir des quantités suffisantes de ces trois cellules.



**Figure 10.** Allo-adsorption d'auto-anticorps dans le plasma/sérum de patients afin de détecter un éventuel allo-anticorps. Adapté de Dara et al, 2017<sup>143</sup>.

#### 2.4.2. Technique alternative

Lorsque le phénotype du patient est connu ou peut être déterminé, des cellules d'allo-adsorption phénotypiquement compatibles avec le patient pourront être utilisées.

La détermination du phénotype RH, KEL, JK, FY et MNS chez des patients ayant un TDA IgG positif peut être perturbée par la présence d'auto-anticorps car le phénotype érythrocytaire est généralement réalisé avec des anticorps monoclonaux de type IgG.

Hormis pour les antigènes des systèmes RH, KEL, JK ainsi que l'antigène MSN3 (S) qui peuvent être déterminés avec des anticorps monoclonaux de type IgM à température ambiante,



le phénotype FY et MNS ne pourra pas être déterminé. Néanmoins, en connaissant une grande partie du phénotype érythrocytaire du patient, l'allo-adsorption pourra être réalisée sur une, voire deux cellule(s), de phénotype semblable au patient<sup>125</sup>, ce qui raccourcit les techniques en terme de durée de réalisation tout en utilisant moins de plasma/sérum de patient.

Chez les patients de phénotype inconnu et dont l'anémie hémolytique est très sévère, il n'est pas possible de réaliser des techniques d'allo-adsorption sur plusieurs cellules. Pour ces patients, le génotypage érythrocytaire en urgence est désormais une alternative possible.

Par ailleurs, si l'allo-adsorption est réalisée en présence d'enzymes, une seule cellule respectant le phénotype JK sera nécessaire puisque les antigènes FY et MNS seront détruits par l'enzyme.

L'allo-adsorption peut également être utilisée pour séparer des anticorps ou les purifier. En effet, au sein d'un mélange complexe d'allo-anticorps, une ou plusieurs spécificités peuvent être retirées du plasma/sérum par allo-adsorption sur des cellules possédant l'antigène. Ainsi, des allo-anticorps initialement masqués vont pouvoir être identifiés.

### **2.4.3. Limites**

L'un des inconvénients majeurs de l'allo-adsorption est l'adsorption d'un allo-anticorps dirigé contre un antigène de fréquence élevée (allo-anticorps anti-public). Cet allo-anticorps sera adsorbé car toutes les cellules d'allo-adsorptions sont porteuses d'antigènes publics, présents chez 99% de la population.

Néanmoins, si l'antigène de fréquence élevée est détruit par un traitement enzymatique, l'allo-anticorps pourra être mis en évidence.

Un autre inconvénient réside dans le fait que certains allo-anticorps ne pourront pas être discriminés par la RAI classique car seuls les allo-anticorps courants peuvent être mis en évidence dans l'adsorbat.

Hormis le risque d'adsorber un allo-anticorps dirigé contre un antigène de fréquence élevée, l'allo-adsorption est la meilleure alternative à l'auto-adsorption chez des patients atteints d'anémie sévère et multi-transfusés.

## **2.5. Options analytiques supplémentaires**

Dans le cadre de l'urgence, afin de ne pas se trouver dans une situation de retard à la transfusion pouvant être préjudiciable chez certains patients dont l'AHAI est sévère, d'autres techniques

permettant de sécuriser la transfusion sanguine sont venues s'ajouter aux techniques d'adsorption afin de répondre aux besoins dans les meilleurs délais<sup>114</sup>.

### **2.5.1. Dilutions**

La technique de la dilution au cinquième, proposée par Oyen et Angeles<sup>144</sup> est une technique simple et rapide basée sur le postulat qu'à cette dilution, la majorité des auto-anticorps n'interféreront pas avec des allo-anticorps qui resteront bien visibles. Cette dilution a été choisie par titrage de l'auto-anticorps dans le plasma de patients.

Cette technique n'est valide que si le titre de l'allo-anticorps est supérieur à celui de l'auto-anticorps.

Bien que l'équipe d'Oyen retrouve des résultats comparables entre la dilution au cinquième et l'adsorption (119 échantillons testés), d'autres équipes sont moins convaincues par cette technique<sup>145</sup>. En effet, la dilution au cinquième semble être moins sensible que l'adsorption car des allo-anticorps d'intensité réactionnelle inférieure à l'auto-anticorps ne peuvent être mis en évidence. Néanmoins, il s'agit d'une technique plus adaptée aux situations d'urgence que l'adsorption.

Ainsi, compte tenu de l'absence de consensus sur cette technique, l'équipe de Leger<sup>112</sup> a proposé que la dilution au cinquième soit réalisée en cas de nécessité, si l'urgence transfusionnelle des patients ne laisse pas le temps de réaliser une technique d'adsorption. L'adsorption sera alors réalisée de façon rétrospective sur un prélèvement pré-transfusionnel.

Des dilutions au tiers ont également été suggérées afin de mettre en évidence un allo-anticorps de faible titre, qui ne serait pas visible lors des techniques de dilution au cinquième.

La technique de dilution, combinée au phénotypage du patient, a par ailleurs été proposée pour mettre en évidence un auto-anticorps mimant un allo-anticorps<sup>144</sup>.

Des équipes se sont également intéressées à la présence d'allo-anticorps dans l'éluat. Ainsi, chez des patients récemment transfusés présentant une image de pan-agglutination à la RAI, la technique de dilution a été appliquée à l'éluat. Cette technique permettrait de mettre en évidence un allo-anticorps nouvellement formé qui ne serait pas encore détectable dans le plasma/sérum<sup>146</sup>.

De la même façon, des dilutions de l'éluat permettraient de détecter des allo-anticorps de faible titre, fixés à la surface des GR transfusés qui ne seraient pas vus dans des dilutions du plasma/sérum<sup>112</sup>.

### **2.5.2. Unités de CGR « les moins incompatibles »**

Toutes les AHAI ne donnent pas une image de pan-agglutination homogène à la RAI. Dans certains cas, des différences de réactivité allant du négatif au 2+ peuvent être observées sur les hématies du panel d'identification avec un témoin autologue d'intensité supérieure à l'ensemble des réactivités du panel. Le recours aux CGR « les moins incompatibles » consiste à délivrer les CGR ABO les moins réactifs avec le plasma/sérum du patient contenant des auto-anticorps<sup>65</sup>. Les unités présentant les agglutinations les moins intenses sont supposées être les moins réactives vis-à-vis de l'auto-anticorps et ne pas être reconnues par un éventuel allo-anticorps non dépisté.

Toutefois, cette technique ne permet pas d'avoir la certitude que les CGR transfusés sont réellement compatibles avec le patient car l'auto-anticorps, risquant de masquer un allo-anticorps n'a pas été éliminé.

Ainsi, la transfusion d'unités de CGR « les moins incompatibles » devrait être réservée aux situations d'extrême urgence.

### **2.5.3. Phénotypage / Génotypage**

Le phénotypage des patients va permettre de confirmer la spécificité d'un allo-anticorps, suspecter des allo-anticorps supplémentaires en fonction du phénotype, déterminer des CGR phénocompatibles ou aider dans la sélection de cellules d'allo-adsorption.

Les patients atteints d'AHAI nécessitant une transfusion rapide pourront recevoir une prise en charge relativement sûre<sup>147</sup>, en amont des techniques d'adsorption, avec des CGR phénocompatibles<sup>148</sup>. Néanmoins, un allo-anticorps autre que les allo-anticorps de spécificité courante (RH, KEL1, FY, JK, MNS), pourrait être responsable d'une hémolyse post-transfusionnelle.

Chez ces patients, connaître leur phénotype étendu (systèmes JK, FY et MNS) en plus de leur phénotype ABO, RH et KEL1 permettrait de sélectionner des GR allogéniques compatibles pour les techniques d'allo-adsorptions. Ainsi, le nombre de cellules d'allo-adsorption pourrait être réduit.

Comme décrit plus haut, le phénotypage, basé sur l'hémagglutination, peut être compliqué par la présence d'Ig à la surface des GR du patient ou lorsque celui-ci est régulièrement transfusé. En cas d'IgG fixées à la surface des GR du patient, un traitement chimique (chloroquine diphosphate, ZZAP, EDTA glycine acide...) <sup>149</sup> peut être réalisé afin de décaper les GR, permettant ainsi le phénotypage. Néanmoins, le traitement chimique risque de dénaturer certains antigènes de groupe sanguin, ce qui limite la détermination du phénotype érythrocytaire. Une autre possibilité, consiste en l'utilisation d'anticorps monoclonaux de type IgM permettant de déterminer une grande partie du phénotype du patient. Cependant, les anticorps monoclonaux de type IgM ne sont pas disponibles pour tous les antigènes érythrocytaires du phénotype étendu.

Lorsque le patient a récemment été transfusé, les GR autologues vont être mélangés aux GR allogéniques. Le phénotypage pourra être réalisé sur des réticulocytes autologues obtenus par centrifugation. La cytométrie en flux permet également de phénotyper les GR d'un patient récemment transfusé <sup>150</sup>.

Le génotypage est une alternative aux limites pouvant être rencontrées au cours du phénotypage (TDA positif, transfusion récente inférieure à 4 mois) <sup>151</sup>. Il consiste à étudier l'expression des gènes de groupes sanguins au niveau de l'ADN (Acide DésoxyriboNucléique) génomique leucocytaire du patient. Chez des patients récemment transfusés ou porteurs d'Ig à la surface de leurs GR, le génotypage va permettre de déduire leur phénotype érythrocytaire. Certaines équipes recommandent désormais la transfusion de CGR génocompatibles chez des patients atteints d'AHAI.

La transfusion de CGR génocompatibles permettrait de s'affranchir des techniques d'adsorptions qui permettent de mettre en évidence un allo-anticorps déjà présent tout en limitant le risque d'allo-immunisations futures <sup>152</sup>. De plus, obtenir des CGR génocompatibles pourrait être plus rapide et moins cher que de réaliser des techniques d'adsorptions.

Néanmoins, si le patient présente un phénotype/génotype érythrocytaire rare, transfuser en phéno/géno compatible deviendrait vite un défi. Chez ces patients, les techniques d'adsorptions resteraient nécessaires.

Enfin, certains variants phénotypiques ne sont pas mis en évidence au niveau génotypique, il conviendra donc d'être vigilant. C'est par exemple le cas du phénotype Rh-null dont l'expression génotypique RHD/RHCE est normale mais le gène RHAG qui leur est associé n'est pas fonctionnel. Ainsi, le génotype de ces patients est différent de leur phénotype.

### **3. Objectifs de l'étude**

Compte-tenu de la variabilité des résultats des études<sup>107-112</sup> portant sur les fréquences d'allo-immunisation et de l'absence de consensus<sup>121</sup> sur la prise en charge biologique d'échantillons de patients présentant des auto-anticorps, une étude actualisée est justifiée.

Ainsi, cette étude se divise en 2 parties :

- Une analyse rétrospective de la fréquence d'allo-immunisation anti-érythrocytaire chez 319 patients porteurs d'auto-anticorps, analysés au laboratoire d'immuno-hématologie de l'EFS (Etablissement Français du Sang) site H. Mondor, Créteil, entre janvier 2010 et octobre 2017.
- Un travail prospectif portant sur les techniques de mise en évidence d'éventuels allo-anticorps masqués par des auto-anticorps

#### **3.1. Fréquence d'allo-immunisation chez les patients transfusés porteurs d'auto-anticorps**

Il y a une trentaine d'années, plusieurs études réalisées sur des cohortes de taille variable se sont intéressées à la fréquence d'allo-immunisation de patients auto-immunisés. Ces études ont donné des résultats très variables allant de 10 à 40%.

##### **3.1.1. Objectif principal**

L'objectif principal de ce travail est la réalisation d'une étude actualisée de la prévalence de l'allo-immunisation chez des patients transfusés auto-immunisés.

La plupart des études ayant été réalisées dans les années 1990, il est intéressant de voir si l'évolution des techniques permettant de s'affranchir des auto-anticorps a modifié la prévalence de l'allo-immunisation estimée chez ces patients. En effet, bien que l'auto-adsorption reste la technique de première intention pour 75% des laboratoires<sup>121</sup>, il est désormais admis qu'après une auto-adsorption, des auto-anticorps mimant des allo-anticorps peuvent persister<sup>111</sup>. Ainsi, les résultats des études portant sur la prévalence de l'allo-immunisation, réalisées à partir d'échantillons auto-adsorbés sont surestimés.

Les recommandations sur l'étendue de la phéno-compatibilité au cours de la prise en charge des patients porteurs d'auto-anticorps varient selon les pays. Comme aucune étude n'a été réalisée sur une cohorte de patients français, il est intéressant de regarder la prévalence de l'allo-immunisation chez des patients auto-immunisés, suivis à l'EFS site Mondor (Créteil). Etant donné que le risque d'immunisation au cours de l'AHAI est au moins équivalent à celui des patients drépanocytaires<sup>103,104</sup>, certains pays, tels que la France<sup>147</sup>, transfusent

systématiquement ces patients avec des CGR phénocompatibles RH-KEL1. Cette prise en charge permet d'éviter toute allo-immunisation dans ces deux systèmes très immunogènes. D'autres préfèrent utiliser les CGR phénocompatibles en curatif pour les patients déjà allo-immunisés plutôt qu'en préventif<sup>145</sup>.

### **3.1.2. Objectif secondaire**

Les études réalisées sur la prévalence de l'allo-immunisation à un temps T englobent les différentes sources d'allo-immunisation que sont la grossesse, la transfusion et la transplantation. La part imputable à la transfusion dans le risque d'allo-immunisation au cours de la prise en charge des patients auto-immunisés n'a pour l'instant pas été étudiée. Ce point a donc été analysé dans ce travail. L'étude de l'incidence de l'allo-immunisation transfusionnelle permettrait de déterminer si le terrain auto-immun est un facteur de risque d'allo-immunisation anti-érythrocytaire.

## **3.2. Comparaison de techniques**

Afin de sécuriser la prise en charge transfusionnelle des patients présentant des auto-anticorps, différentes techniques ont été proposées<sup>121</sup>.

Comme les AHAI à auto-anticorps froids n'interfèrent que très rarement avec les analyses immuno-hématologiques, l'étude prospective s'est concentrée sur les auto-anticorps chauds.

De plus, l'étude de la cohorte de patients analysés à l'EFS site Mondor (Créteil) a montré que le profil de ces patients ne se prête généralement pas à la mise en œuvre de techniques d'auto-adsorptions. En effet, les patients nécessitant une prise en charge transfusionnelle pour une AHAI sont généralement très anémiés du fait de leur taux élevé en auto-anticorps et sont régulièrement transfusés. Ainsi, l'étude s'est basée sur la comparaison des techniques d'allo-adsorption.

### **3.2.1. Objectif principal**

L'objectif de cette étude consiste à déterminer la technique la plus efficace pour mettre en évidence un allo-anticorps lorsque des auto-anticorps forment une image de pan-agglutination ce qui peut masquer un éventuel allo-anticorps. Pour cela, les techniques proposées dans la littérature ont été reprises et comparées<sup>121</sup>.

Quelle que soit la technique, la première étape consiste à étudier la réactivité de l'auto-anticorps vis-à-vis de GR traités par une enzyme protéolytique. Les auto-anticorps chauds reconnaissant généralement des antigènes du système RH, leur réactivité apparaît augmentée vis-à-vis de GR

traités par des enzymes (papaine). Pour les auto-anticorps dirigés contre d'autres antigènes érythrocytaires<sup>13</sup>, leur réactivité peut être diminuée en présence d'un traitement enzymatique des GR<sup>153</sup>. Cette première étape permet donc de déterminer si les GR d'allo-adsorption devront être traités par une enzyme. Au laboratoire, la papaine est utilisée.

La seconde étape de l'étude est la comparaison des techniques d'allo-adsorption avec et sans PEG ainsi que les techniques d'allo-adsorption en présence de LISS. L'allo-adsorption en présence de PEG ou de LISS peut entraîner une disparition par dilution des allo-anticorps de faible réactivité<sup>129,130</sup>. L'impact de ces techniques sur la détection d'allo-anticorps pouvant être impliqués dans des réactions transfusionnelles doit donc être évalué notamment s'il y a un risque de restimulation antigénique.

Par ailleurs, les techniques de dilution de plasma permettent une prise en charge rapide des patients en urgence transfusionnelle. Il est intéressant de comparer les résultats obtenus entre la technique de dilution au cinquième décrite dans la littérature, une technique de dilution au demi, parfois utilisée au laboratoire et les techniques d'allo-adsorption afin de déterminer la sécurité des dilutions pour leur utilisation dans un contexte d'urgence.

De plus, chez les patients transfusés, les résultats de dilution du plasma ont été comparés avec des dilutions de l'éluat. Le but étant de déterminer l'intérêt des dilutions de l'éluat pour mettre en évidence des éventuels allo-anticorps de faible intensité<sup>146</sup>.

### **3.2.2. Objectif secondaire**

En parallèle de la comparaison des techniques qui permettraient de déterminer laquelle est la plus discriminante dans la détection d'un allo-anticorps masqué par un auto-anticorps, il est intéressant de savoir laquelle est la plus rapide. En effet, ces deux critères ont toute leur importance dans le cadre d'une transfusion urgente chez des patients présentant un tableau d'hémolyse sévère. Il est donc important, pour ces patients, de pouvoir mettre en place les techniques permettant de sécuriser leur transfusion dans un délai le plus court possible.

De plus, le titrage plasmatique de l'auto-anticorps a été entrepris afin de corréler ce titre à l'intensité du TDA, supposée associée au degré d'hémolyse.

Enfin, une corrélation entre le titre de l'auto-anticorps au nombre de cycles d'allo-adsorption nécessaires a été réalisée.

## Matériels et méthodes

Ce travail comprend deux parties :

- Une étude rétrospective sur la fréquence d'allo-immunisation de patients porteurs d'auto-anticorps

- Une comparaison des techniques disponibles afin d'assurer la sécurité transfusionnelle de ce type de patients

### 1. Etude rétrospective de l'allo-immunisation de patients auto-immunisés

L'étude rétrospective a été réalisée à partir de prélèvements sanguins de patients analysés à l'EFS site Mondor (Créteil) entre 2010 et 2017.

#### 1.1. Population, recueil de données et prélèvements

Cette étude rétrospective inclut 350 patients dont 192 femmes et 158 hommes avec un âge médian de 70.5 ans au moment du prélèvement. Ces patients sont porteurs d'un auto-anticorps donnant une image de pan-agglutination à +37°C avec un témoin autologue et un TDA positif et ont bénéficié de techniques d'adsorption pré-transfusionnelles, toutes réalisées à l'EFS site Mondor (**Table 9**). Les patients dont la pathologie était renseignée dans le dossier transfusionnel étaient pour la plupart connus avec une AHAI primaire ou secondaire.

**Table 9.** Caractéristiques des participants à l'étude rétrospective sur l'allo-immunisation au cours de l'AHAI.

	Patients porteurs d'auto-anticorps	
Sexe (H/F)	158 H	192 F
Age (Années)	70 [2-95]	73 [1-100]
Pathologie	AHAI idiopathique ou secondaire (78.40% des patients renseignés)	

#### 1.2. Prélèvements

Avant toute transfusion sanguine, un tube EDTA (Tube BD Vacutainer® EDTA K3E) est prélevé afin de réaliser une RAI pré-transfusionnelle. En présence d'une pan-agglutination à la RAI, des techniques d'allo-adsorptions sont réalisées afin de mettre en évidence une éventuelle allo-immunisation masquée par l'auto-anticorps. La RAI réalisée à partir de l'adsorbat assure la sécurité transfusionnelle pour une durée de 72 heures. Au cours de cette étude, 853 échantillons provenant des 350 patients ont été collectés. Parmi les 350 patients, 150 ont été prélevés au moins 2 fois au cours de l'étude.

#### 1.3. Données collectées

Pour chaque patient, des données démographiques et clinico-biologiques ont été recueillies : âge du patient, sexe, pathologie, résultats de TDA, délai entre les techniques d'allo-adsorption et la transfusion sanguine ainsi que la présence d'éventuels allo-anticorps mis en évidence par

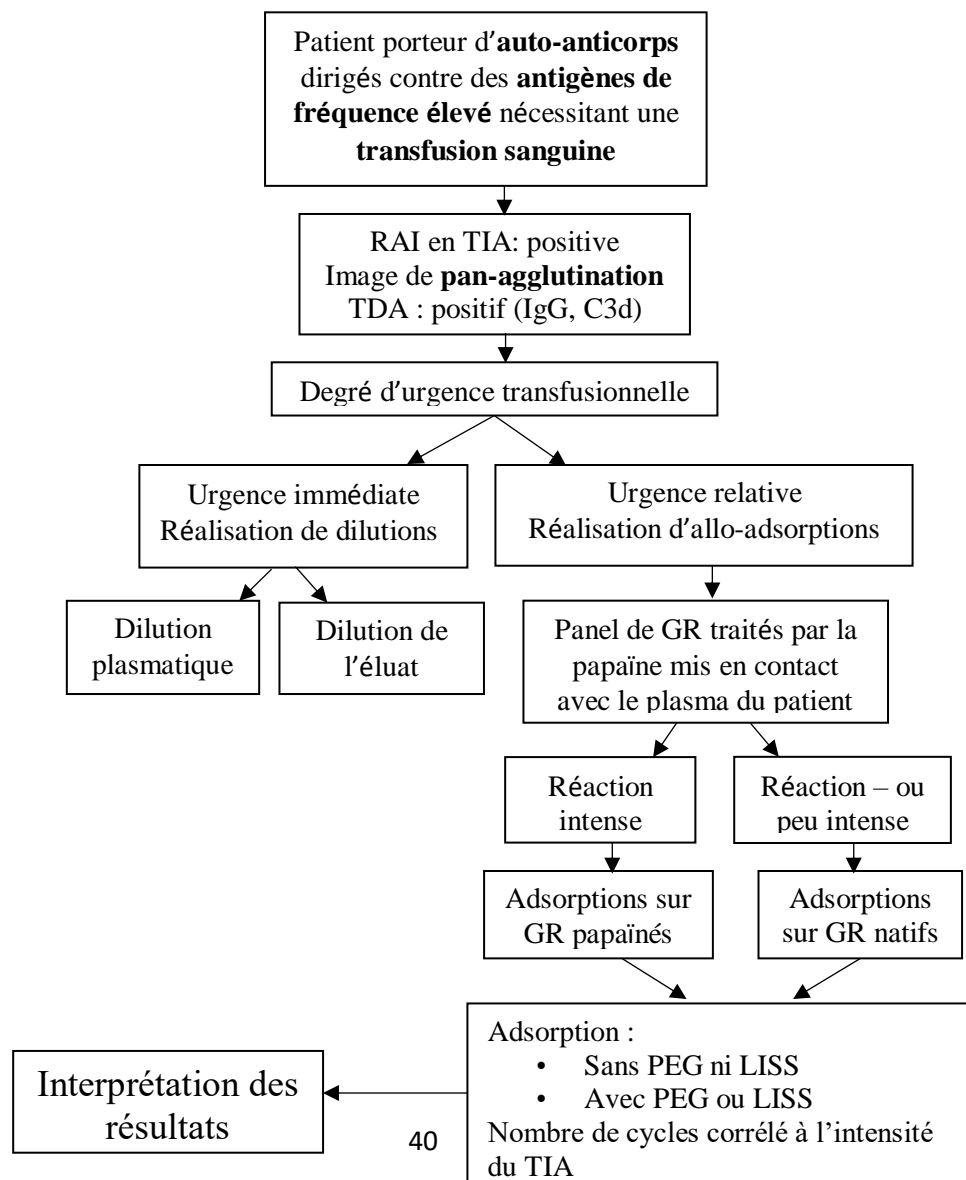


les techniques d'allo-adsorption. Au cours des 7 années de recueil, plusieurs épisodes d'allo-adsorptions ont parfois été réalisés pour chaque patient. A chaque allo-adsorption, les nouvelles données clinico-biologiques (TDA, délai entre l'allo-adsorption et la transfusion et modifications de l'allo-immunisation mis en évidence par les techniques d'allo-adsorption) ont été implémentées aux données du patient. Ce suivi a, entre autre permis d'analyser l'évolution de l'allo-immunisation.

## 2. Techniques disponibles afin de sécuriser la transfusion de patients auto-immunisés

L'étude prospective a été réalisée à partir d'une cohorte de 11 patients porteurs d'un auto-anticorps actif à +37°C et pris en charge par le laboratoire d'immuno-hématologie de l'EFS site Mondor (Créteil). Toutes les techniques ont été réalisées en suivant le **logigramme 1**, à partir d'échantillons plasmatiques prélevés sur des tubes BD Vacutainer® EDTA K3E (Becton Dickinson (BD), Franklin Lakes, NJ).

**Logigramme 1.** Prise en charge des échantillons de patients porteurs d'auto-anticorps, nécessitant une transfusion sanguine.



## **2.1. Techniques initiales**

### **2.1.1. RAI**

Avant toute transfusion, une RAI de dépistage sur un panel de 3 hématies de composition antigénique définie réglementairement (Serascan Diana 3, Grifols) est réalisée afin de s'assurer de l'absence d'allo-anticorps d'intérêt transfusionnel.

Si le dépistage est positif, une RAI d'identification est réalisée sur un panel de 11 hématies (Identisera Diana, Grifols) afin de confirmer la présence et la spécificité de l'allo-anticorps.

La technique repose sur un procédé de microfiltration sur carte-gel (carte-gel DG Gel Coombs, Grifols) associé au TIA. Brièvement, 50µL de GR du panel sont déposés dans les puits de la carte-gel, puis 25µL de plasma du patient sont ensuite ajoutés dans chaque puits. En parallèle, un témoin autologue est réalisé afin de mettre en évidence la présence d'auto-anticorps. Pour ce faire, 50µL de GR autologues dilués à 1% sont déposés dans un puits de la carte-gel puis 25µL de plasma autologue sont additionnés.

Après une étape d'incubation de 15 minutes à +37°C, la centrifugation à 128g des cartes-gels permet de mettre en évidence une agglutination. Des auto-anticorps sont considérés comme étant présents dans le cas d'une image de pan-agglutination à +37°C associée à un témoin autologue positif. Un TDA est réalisé pour rechercher le type d'Ig impliqué.

### **2.1.2. TDA**

Afin de mettre en évidence des anticorps de type IgG ou des complexes immuns à la surface des GR, 50µL de GR du patient sont mis dans les puits de la carte-gel contenant de l'AGH monospécifique anti-IgG et anti-C3d, ainsi qu'un contrôle négatif (carte-gel DG Screening II, BioRad). Après une étape de centrifugation à 85g, la présence d'auto-anticorps est révélée. Un TDA élargi peut également être réalisé de la même façon qu'un TDA classique. Les cartes gel comprennent alors de l'AGH anti-IgG, anti-IgA, anti-IgM, anti-C3c, anti-C3d, ainsi qu'un contrôle négatif (carte-gel DG Screening I, BioRad).

## **2.2. Allo-adsorptions**

Les techniques d'allo-adsorption sont effectuées sur des hématies homologues, sélectionnées en fonction de leur phénotype étendu. Les techniques d'allo-adsorption sont réalisées avec des hématies de groupe O et dont le phénotype RH-KEL1 est compatible, dans la mesure du possible, avec celui du patient. Le nombre de cycles d'allo-adsorption réalisé en première intention au laboratoire a fait l'objet d'une validation de méthode.

### 2.2.1. Papaïne

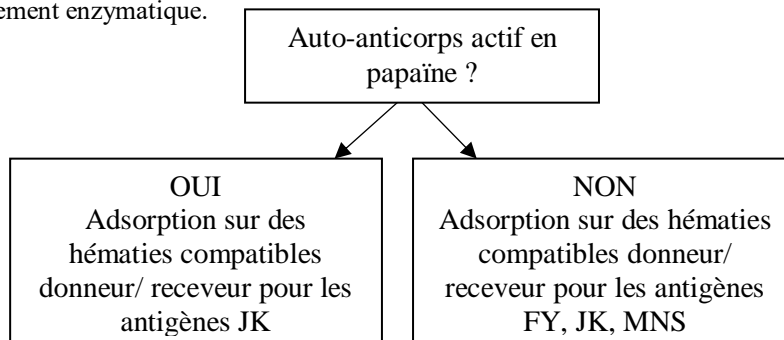
En fonction des caractéristiques de l'auto-anticorps, l'allo-adsorption est réalisée avec des GR traités ou non par la papaïne (**logigramme 2**).

Afin de déterminer si l'auto-anticorps est actif en papaïne, le plasma du patient est mis en contact avec des GR papainés. Le plus souvent, les auto-anticorps sont réactifs en papaïne.

Etant donné que la papaïne détruit les antigènes des systèmes FY et MNS, il convient de respecter uniquement les antigènes négatifs du système JK. Si le phénotype étendu du patient n'est pas connu, l'adsorption est réalisée en parallèle sur des hématies de phénotype JK-1 (Jka-) et JK-2 (Jkb-).

En présence d'un auto-anticorps réactif en TIA mais non réactif en papaïne, l'allo-adsorption est effectuée sur des hématies natives. Dans ce cas, l'allo-adsorption est réalisée sur 2 (ou 3) GR de donneurs présentant des phénotypes étendus différents ce qui permet d'avoir au moins une hématie négative pour les antigènes FY1 (Fya), FY2 (Fyb), JK1 (Jka), JK2 (Jkb), MSN3 (S) et MNS4 (s).

**Logigramme 2.** Phénotype érythrocytaire à respecter en fonction de la réactivité de l'auto-anticorps en présence d'un traitement enzymatique.



Brièvement, un volume d'hématies homologues est traité avec un volume de papaïne Palerm (Diagast, Loos, France) puis incubé 15 minutes à +37°C au bain-marie à sec. Les hématies sont ensuite lavées 3 fois en solution saline 0.15M puis le culot d'hématies papainées est obtenu par centrifugation à 2500g et décantation soigneuse du surnageant afin d'éviter toute dilution.

### 2.2.2. Allo-adsorption sans PEG

L'allo-adsorption sans PEG est réalisée de façon systématique afin de s'assurer qu'un éventuel allo-anticorps n'est pas dilué par l'ajout de PEG ou de LISS. Si l'intensité des réactions en TIA est inférieure à 2+, l'allo-adsorption est uniquement réalisée sur des hématies traitées ou non par la papaïne sans addition de PEG (**logigramme 3**).

Dans autant de tubes d'hématies homologues de phénotypes différents, 500µL de plasma à adsorber sont déposés sur 500µL de culot d'hématies homologues traitées ou non par la papaine. Les tubes, une fois agités, sont incubés 30 min à +37°C puis centrifugés 5 minutes à 2500g. Le surnageant (plasma adsorbé) est ensuite décanté et déposé sur de nouvelles hématies homologues (selon le nombre d'allo-adsorptions nécessaires).

### 2.2.3. Allo-adsorption avec PEG

Si l'auto-anticorps est d'intensité supérieure ou égale à 2+ en TIA (**logigramme 3**) ou si les allo-adsorptions sans addition de PEG ne permettent pas d'éliminer les auto-anticorps du plasma, les allo-adsorptions sont alors réalisées en présence de PEG, sur des hématies traitées ou non par la papaine. Le PEG est préparé en solution 20% à partir de 20g de PEG (Sigma Aldrich, New Delhi, Inde) dans 100mL de tampon salin phosphaté afin de maintenir la solution à pH 7.3.

Dans autant de tubes d'hématies homologues de phénotypes différents, 500µL de plasma à adsorber sont déposés sur 500µL de culot d'hématies homologues traitées ou non par la papaine en présence de 500µL de solution PEG.

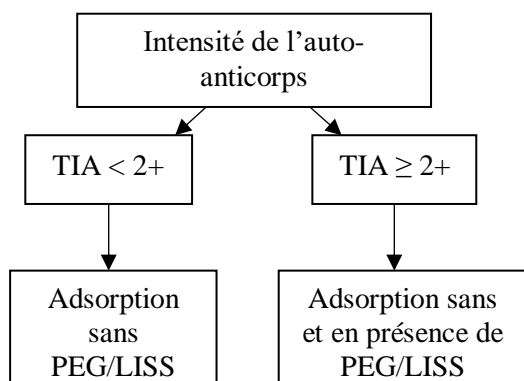
Un témoin de dilution composé de 200µL de solution PEG et 200 µL de plasma est réalisé en parallèle. Ce témoin subit les mêmes incubations et centrifugations-décantations que l'adsorbat.

Les tubes sont incubés 15 minutes à +37°C au bain-marie à sec puis centrifugés à 2500g et décantés. En fonction du nombre d'allo-adsorption nécessaire, l'adsorbat est déposé ou non sur de nouvelles hématies homologues.

### 2.2.4. Allo-adsorption en présence de LISS

En présence d'un auto-anticorps d'intensité supérieure ou égale à 2+ en TIA (**logigramme 3**), les adsorptions peuvent être réalisées en présence de LISS, sur des hématies traitées ou non par la papaine.

**Logigramme 3.** Allo-adsorption à réaliser en fonction de l'intensité du TIA.



500µL de plasma à adsorber sont déposés sur 500µL d'hématies traitées ou non par la papaïne en présence de 500µL de solution LISS (DG Cell Media, Grifols).

Un témoin de dilution composé de 200µL de solution LISS et 200 µL de plasma est réalisé en parallèle. Ce témoin subit les mêmes incubations et centrifugations-décantations que l'adsorbat.

Les tubes sont incubés 15 minutes à +37°C au bain-marie puis centrifugés à 2500g et décantés. En fonction de l'intensité de l'auto-anticorps, le plasma adsorbé est déposé ou non sur de nouvelles hématies homologues.

Quelle que soit la technique d'allo-adsorption, le plasma adsorbé est étudié en technique TIA. Dans un premier temps, un dépistage du plasma adsorbé et du témoin de dilution est réalisé sur un panel de 3 hématies-tests. Si le dépistage est positif sur l'ensemble des hématies du panel sans différence d'intensité, des cycles d'adsorption supplémentaires sont réalisés. Si le dépistage est positif mais laisse au moins une hématie négative ou si les hématies présentent des différences d'intensité, une identification est effectuée. Si le dépistage est négatif, l'identification est réalisée afin de confirmer l'absence d'allo-anticorps (**Table 10**).

Afin de valider l'allo-adsorption, le taux de dilution du plasma est vérifié. Pour les techniques utilisant le PEG et le LISS, la persistance de la positivité du tube témoin est contrôlée. L'interprétation des résultats de la RAI sur plasma adsorbé est décrite dans la **table 10**.

**Table 10.** Interprétation des résultats de la RAI sur plasma adsorbé.

Résultat de la RAI sur plasma adsorbé	Interprétation
RAI dépistage négative Identification négative	Absence d'allo-anticorps
RAI dépistage positive avec des intensités différentes sur chaque hématie Identification d'un allo-anticorps lors de la RAI identification	Allo-anticorps présent
RAI dépistage positive avec des intensités identiques sur chaque hématie	Présence d'un auto-anticorps Eventuel allo-anticorps associé non éliminé Continuer les cycles d'adsorption

### 2.3. Elution, dilution et titrage de l'auto-anticorps

L'éluion permet de détacher les anticorps de classe IgG fixés sur les hématies et d'en déterminer la spécificité en réalisant une RAI sur l'éluat obtenu. Dans l'AHAI, il est classique d'observer à la RAI une agglutination de l'ensemble des hématies du panel, pour le plasma

comme pour l'éluat. De ce fait, les techniques de dilutions peuvent aider à l'identification d'allo-anticorps masqués par un auto-anticorps.

Par ailleurs, le titrage de l'auto-anticorps est réalisé systématiquement chez les patients présentant une image de pan-agglutination à la RAI. Il permet d'adapter les techniques à réaliser en fonction de l'intensité de l'auto-anticorps.

### **2.3.1. Elution**

La technique d'éluat à l'acide (Diacidel, BioRad) est utilisée comme décrit par le fournisseur. Brièvement, après lavage des hématies (Diacidel Wash solution), les anticorps sont détachés grâce à l'action d'un tampon glycine à pH acide (Diacidel Elution Solution). L'éluat obtenu est ensuite neutralisé par une solution tampon TRIS alcaline (Diacidel Buffer Solution).

Une fois neutralisé, l'éluat est testé sur un panel de 11 hématies (Identisera, Grifols) afin de caractériser l'auto-anticorps et/ou mettre en évidence un éventuel allo-anticorps.

### **2.3.2. Dilutions**

Les techniques de dilutions de l'auto-anticorps peuvent être réalisées à la fois dans le plasma et dans l'éluat.

#### **2.3.2.1. Dilutions plasmatiques**

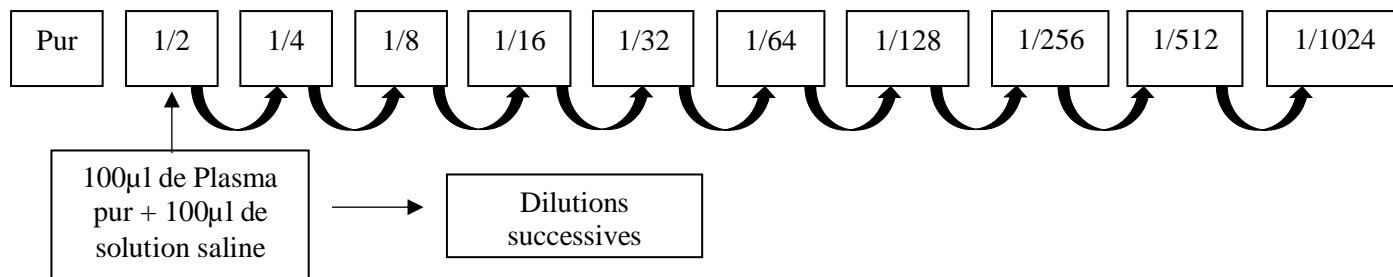
Le plasma du patient contenant les auto-anticorps est dilué au 1/5 et au 1/2 dans une solution saline (NaCl 0,9%, B.Braun). Le plasma, une fois dilué, est testé en technique TIA (RAI) avec le panel d'identification Identisera (Grifols).

#### **2.3.2.2. Dilutions de l'éluat**

L'éluat contenant les auto-anticorps est dilué au 1/5 et au 1/2 dans une solution saline (NaCl 0,9%, B.Braun). L'éluat, une fois dilué, est testé en technique TIA (RAI) avec le panel d'identification Identisera (Grifols).

### **2.3.3. Titrage de l'auto-anticorps**

Le plasma du patient est dilué de 2 en 2, du pur au 1/1024 dans une solution saline (NaCl 0,9%, B.Braun) (**Figure 11**).



**Figure 11.** Titrage de l'auto-anticorps par technique de dilutions successives.

Le titrage est réalisé sur le panel de dépistage Serascan Diana 3 (Grifols) afin de déterminer le titre à partir duquel l'auto-anticorps n'est plus réactif. Le mode opératoire est décrit dans la **table 11**.

**Table 11.** Titrage de l'auto-anticorps.

Résultat du dépistage (à chaque dilution)	Conduite à tenir
RAI dépistage positive	Poursuivre les dilutions, titre de l'auto-anticorps supérieur à la dilution réalisée
RAI dépistage négative	Titre de l'auto-anticorps = dernière dilution positive

## Résultats

### 1. Fréquence de l'allo-immunisation de patients porteurs d'auto-anticorps

#### 1.1. Caractéristiques de la cohorte de patients présentant un auto-anticorps

##### 1.1.1 Caractéristiques générales des patients

Lorsque l'on observe à la RAI à +37°C une image de pan-agglutination due à la présence d'un auto-anticorps, un témoin autologue positif ainsi qu'un TDA positif, des techniques d'adsorption sont nécessaires afin de mettre en évidence la présence potentielle d'un allo-anticorps masqué par l'auto-anticorps. Les 853 échantillons issus des 350 patients de l'étude ayant bénéficié de techniques d'allo-adsorption en vue de sécuriser la transfusion sanguine ont tous été transfusés dans le délai de validité de la RAI sur l'adsorbat, soit dans les 72 heures.

Parmi les 350 patients, 31 sont connus drépanocytaires ou thalassémiques. Ces 31 patients (8,85%) ont été exclus de l'étude puisqu'ils sont transfusés de manière itérative avec un risque majoré d'allo-immunisation par rapport à la population générale. Ce risque d'immunisation est sans doute lié à leur état inflammatoire chronique.

Ainsi, 319 patients ont été intégrés à cette étude dont 171 femmes et 148 hommes, soit un sex ratio (H/F) de 0,86. L'âge médian de cette cohorte au moment de l'inclusion des patients est de 73 ans (âge médian de 74 ans chez les femmes et 71 ans chez les hommes). Pour les patients ayant été prélevés à plusieurs reprises au cours de l'étude, l'âge pris en compte est celui du dernier prélèvement inclus (**Table 12**).

**Table 12.** Caractéristiques de la cohorte de patients porteurs d'auto-anticorps et non drépanocytaires.

	Patients porteurs d'auto-anticorps	
Sexe (H/F)	148 H	171 F
Age (Années)	71 [2-95]	74 [1-100]

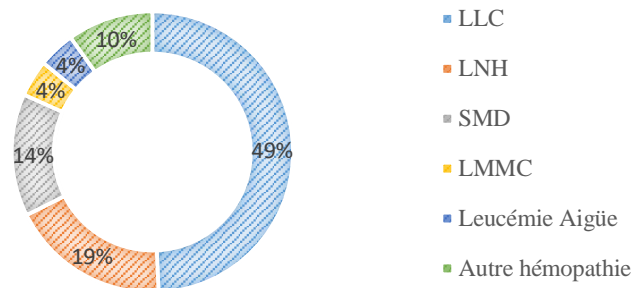
##### 1.1.2. Répartition des patients de l'étude en fonction de leur pathologie

La pathologie est renseignée dans le dossier transfusionnel de 145 patients. Pour les 174 patients restants, la pathologie n'est pas indiquée dans le dossier transfusionnel.

Parmi ces 145 patients, 138 ont une AHAI, soit 95,17% des patients renseignés. L'âge médian des 138 patients porteurs d'une AHAI est de 73 ans. Cette cohorte comporte 62 femmes et 76 hommes soit un sex ratio (H/F) de 1,22.



L'origine idiopathique ou secondaire de l'AHAI n'est pas étiquetée chez 51 patients porteurs d'une AHAI soit chez 36,95% d'entre eux. Chez les 87 patients restants, l'AHAI est secondaire. Concernant les AHAI secondaires renseignées, la grande majorité (71 patients, soit 81,6%) est survenue suite à une hémopathie (LLC chez 35 patients soit 40,22% des patients porteurs d'une AHAI secondaire, lymphome non hodgkinien (LNH) chez 13 patients soit 14,94% des AHAI secondaires et autre hémopathie chez 23 patients soit 26,43% des AHAI secondaires). Dans cette étude, la LLC est l'hémopathie ayant induit le plus d'AHAI (49%), suivie par les LNH et les syndromes myélodysplasiques (SMD) (**Figure 12**).

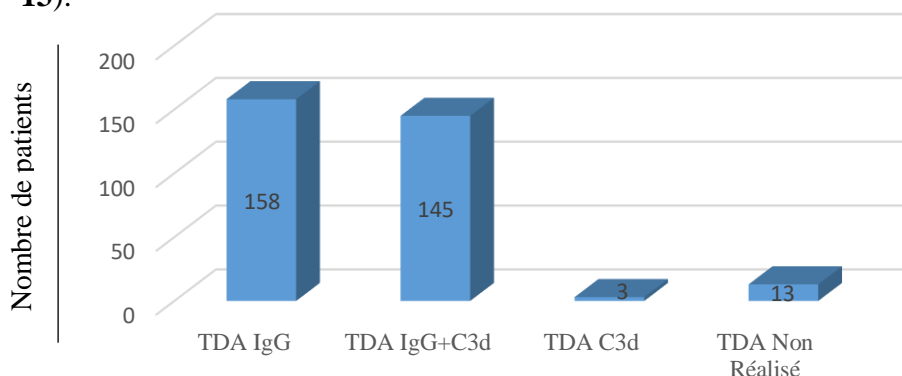


**Figure 12.** Répartition des différentes hémopathies associées à l'AHAI. Dans cette étude, 71 AHAI étaient secondaires à une hémopathie.

De plus, 11 patients ont développé une AHAI secondaire à une pathologie auto-immune (LES, PTI (purpura thrombopénique immunologique), SAPL (syndrome des anti-phospholipides), maladie de Crohn) soit 12,64% des patients porteurs d'une AHAI secondaire. Aussi, 3 patients ont développé une AHAI secondaire à une hépatite auto-immune, soit 3,44% des AHAI secondaires. Enfin, 2 patients ont développé une AHAI secondaire à un virus immunodéficient (Virus de l'Immuno-déficience Humaine, VIH) soit 2,29% des AHAI secondaires.

### 1.1.3. Répartition des patients en fonction du TDA

Parmi les 319 patients inclus dans la cohorte, 158 d'entre eux présentent un TDA IgG soit 49,52% des patients, 145 un TDA IgG+C3d soit 45,45% des patients, 3 patients un TDA C3d et pour 13 patients, le TDA n'a pas été réalisé au moment de l'épisode transfusionnel (**Figure 13**).



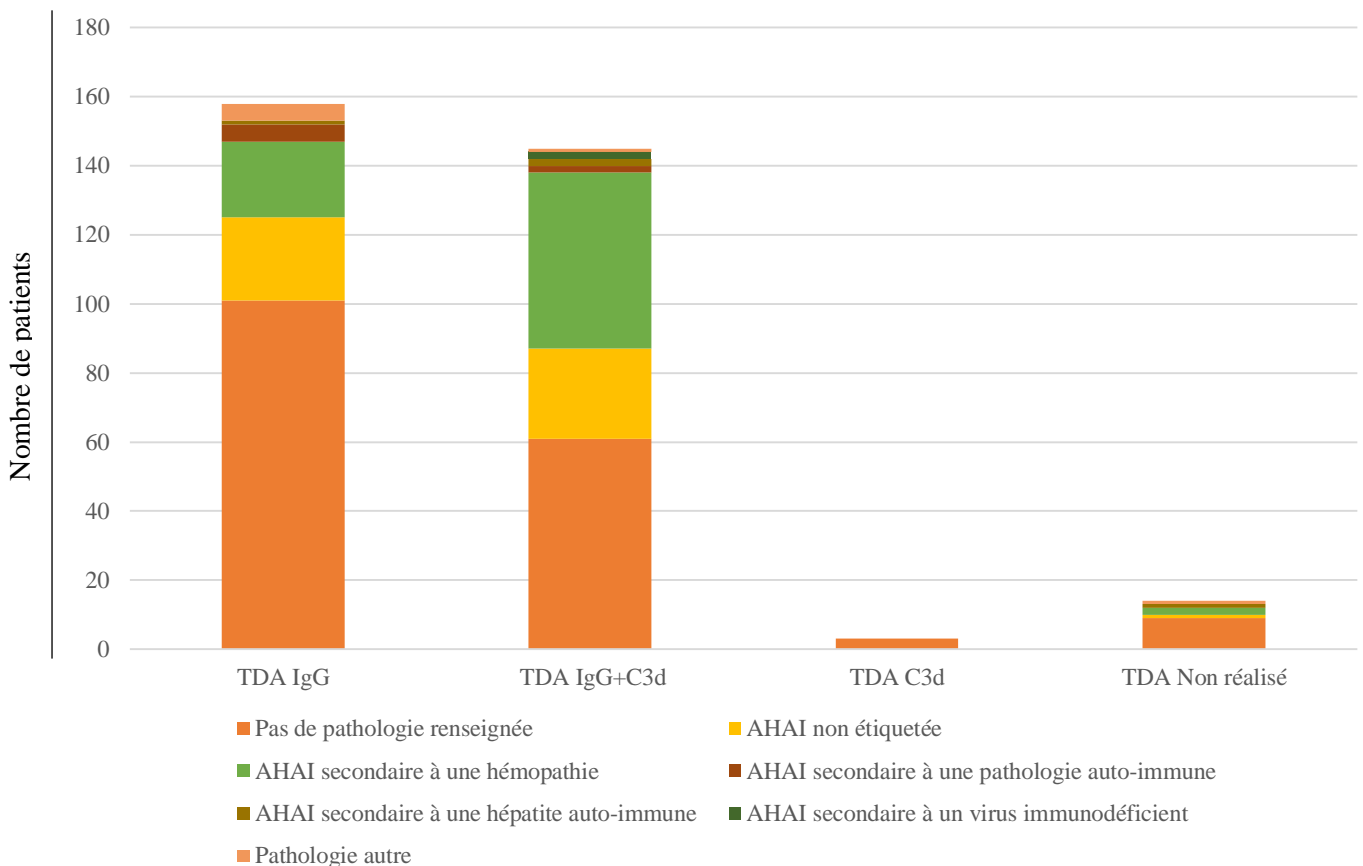
**Figure 13.** Répartition des TDA dans la cohorte de 319 patients.

Dans la cohorte de patients ayant un TDA IgG, 101 n'ont pas de pathologie renseignée, 24 présentent une AHAI non étiquetée, 22 ont une AHAI secondaire à une hémopathie, 5 ont une AHAI secondaire à une pathologie auto-immune, 1 patient présente une AHAI secondaire à une hépatite auto-immune et 5 ont une autre pathologie que l'AHAI (**Figure 12**).

Parmi les patients présentant un TDA IgG+C3d, 61 n'ont pas de pathologie renseignée, 26 présentent une AHAI non étiquetée, 47 ont une AHAI secondaire à une hémopathie, 6 présentent une AHAI secondaire à une pathologie auto-immune, 2 patients ont une AHAI secondaire à une hépatite auto-immune, 2 patients présentent une AHAI secondaire à un virus immunodéficient et 1 patient a une pathologie autre que l'AHAI (**Figure 14**).

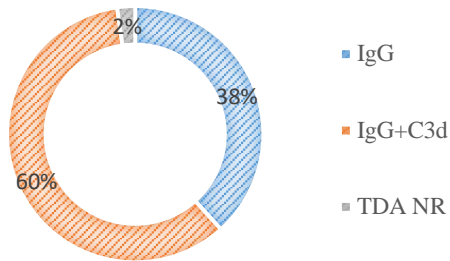
Pour les 3 patients ayant un TDA C3d, la pathologie n'est pas connue (**Figure 14**).

Concernant les 13 patients pour lesquels le TDA n'a pas été réalisé au moment de l'épisode transfusionnel, les pathologies sont variées (9 patients dont la pathologie n'est pas connue, 2 hémopathies, une AHAI non étiquetée et une pathologie sans lien avec l'AHAI) (**Figure 14**).



**Figure 14.** Répartition des différentes pathologies par TDA.

Chez le groupe de patients étiquetés « AHAI », la répartition des patients en fonction du TDA est la suivante : sur les 138 patients, 52 ont un TDA IgG, 83 un TDA IgG+C3d et pour 3 patients, le TDA n'a pas été réalisé (**Figure 15**).

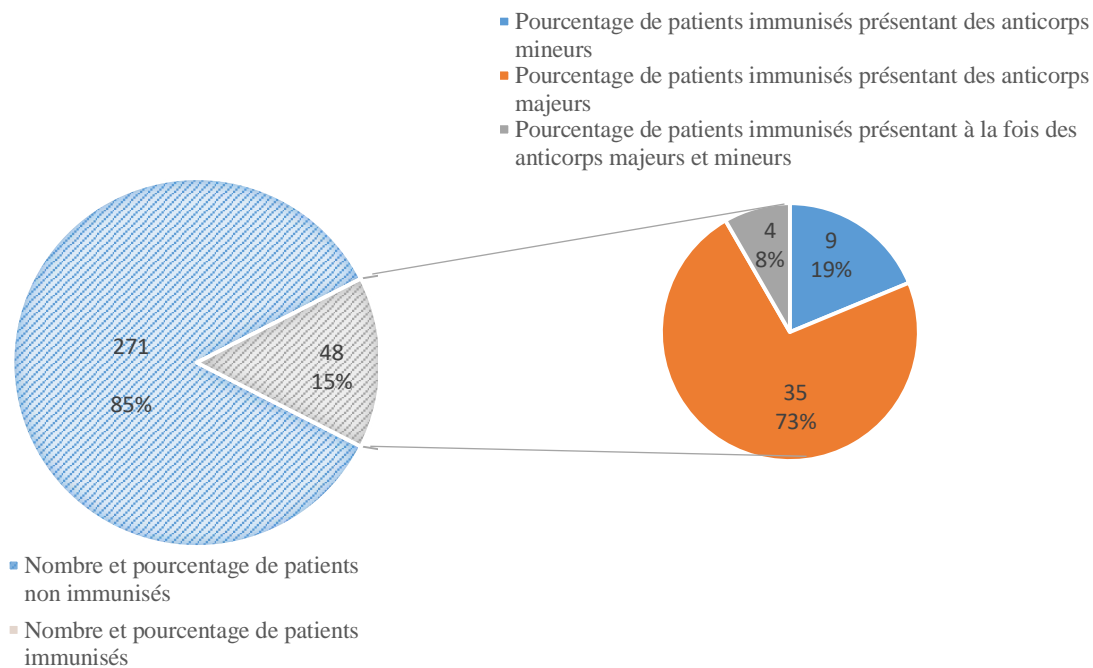


**Figure 15.** Répartition des TDA dans l’AHAI.

## 1.2. Caractéristiques de l’allo-immunisation des patients auto-immunisés

### 1.2.1. Répartition des patients en fonction du type d’allo-immunisation

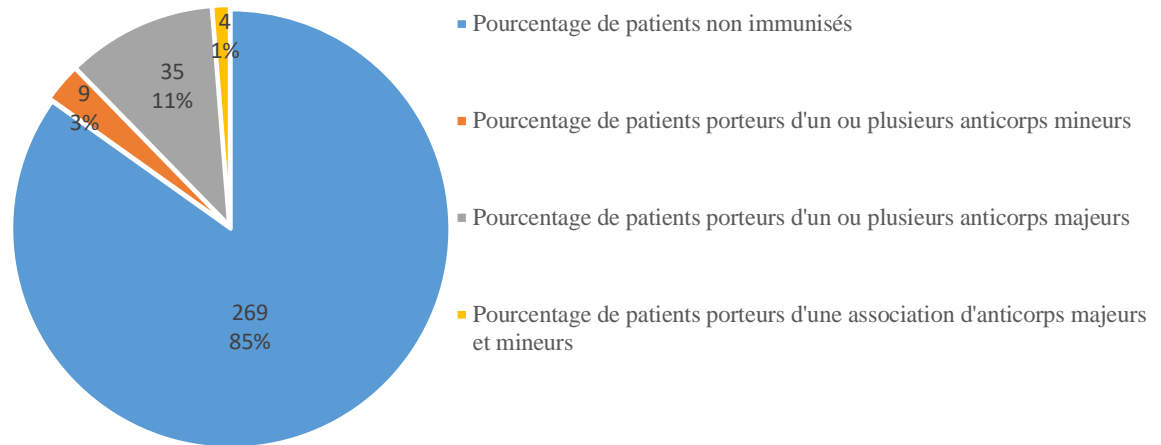
Sur les 319 patients inclus au cours des 7 années de l’étude, un ou plusieurs allo-anticorps a été mis en évidence par les techniques d’allo-adsorptions chez 48 d’entre eux (**Figure 16**).



**Figure 16.** Répartition des patients présentant une image de pan-agglutination selon leur allo-immunisation (nombre et pourcentage). Parmi les allo-immunisations, répartition des allo-anticorps selon leur importance transfusionnelle.

Ces 48 patients (15,04%) sont immunisés contre un (ou plusieurs) antigène(s), qu’il soit majeur (anticorps dirigés contre les systèmes de groupes sanguins RH, KEL, FY, JK, MNS, pouvant entraîner des hémolyses post transfusionnelles) ou mineur (sans incidence transfusionnelle).

Ainsi, 10,97% des patients (35 patients) présentent une allo-immunisation dirigée contre un ou plusieurs antigènes majeurs, 9 patients se sont allo-immunisés contre un ou plusieurs antigènes mineurs, soit 2,82% des patients étudiés et 1,25% des patients (4 patients) se sont allo-immunisés à la fois contre un ou plusieurs antigènes majeurs ou mineurs (**Figure 17**).

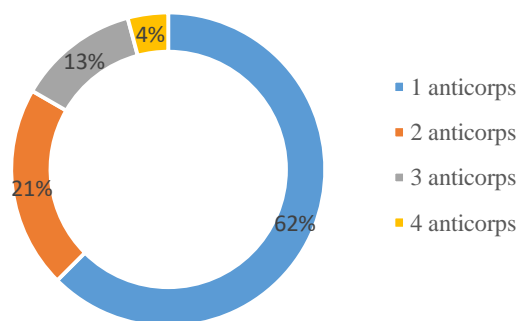


**Figure 17.** Répartition de l'allo-immunisation chez des patients ayant nécessité des techniques d'allo-adsorption en vue de leur prise en charge transfusionnelle.

Dans le groupe de 48 patients allo-immunisés, 72,91% des patients le sont envers des antigènes majeurs, 18,75% des patients présentent un ou plusieurs allo-anticorps mineurs et 8,33% d'entre eux présentent un mélange d'allo-anticorps majeurs et mineurs (**Figure 16**).

De plus, 61 allo-anticorps majeurs ont été retrouvés et 15 allo-anticorps mineurs, soit un total de 76 allo-anticorps.

Chacun des 48 patients allo-immunisés présente un nombre d'allo-anticorps compris entre 1 et 4. Au sein de cette cohorte de patients, 18 d'entre eux sont porteurs de plus d'un allo-anticorps, soit 37,50% des patients. En effet, 10 patients se sont allo-immunisés contre deux antigènes, 6 patients contre 3 antigènes et 2 patients contre 4 antigènes (**Figure 18**).



**Figure 18.** Répartition du nombre d'allo-anticorps par patient allo-immunisé (pourcentage %).

## 1.2.2. Caractéristiques des allo-anticorps retrouvés

### 1.2.2.1. Allo-anticorps majeurs

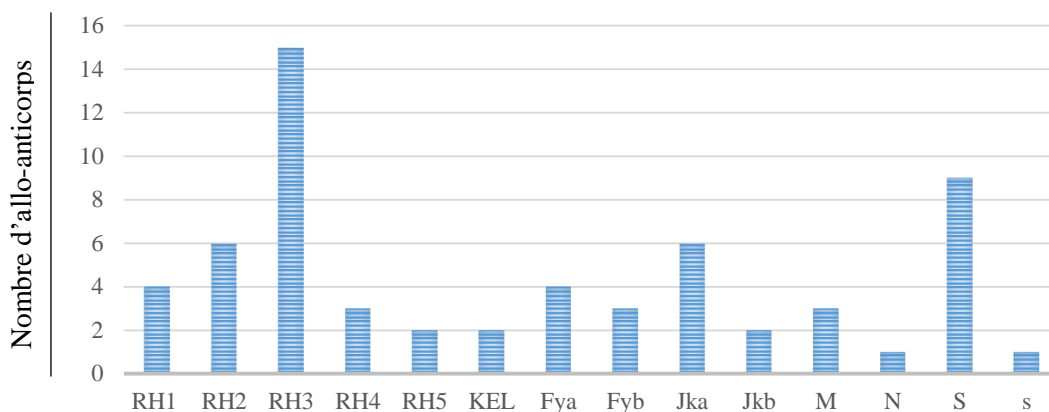
Parmi les 61 allo-anticorps majeurs retrouvés, on retrouve 30 allo-anticorps dans le système RH, ce qui correspond à 49,18% des allo-anticorps majeurs et 39,47% des allo-anticorps totaux. Il y a en effet 4 anti-RH1 (D), 6 anti-RH2 (C), 15 anti-RH3 (E), 3 anti-RH4 (c) et 2 anti-RH5 (e).

Dans le système KEL, 2 anti-KEL1 sont retrouvés, ce qui équivaut à 3,27% des allo-anticorps majeurs et 2,63% des allo-anticorps totaux.

Dans le système FY, 4 anti-FY1 (Fya) et 3 anti-FY2 (Fyb) sont retrouvés ce qui correspond à 11,47% des allo-anticorps majeurs et 9,21% des allo-anticorps totaux.

Dans le système JK, 6 anti-JK1 (Jka) et 2 anti-JK2 (Jkb) sont présents, ce qui représente 13,11% des allo-anticorps majeurs et 10,52% des allo-anticorps totaux.

Enfin, on retrouve 22,95% d'allo-anticorps majeurs et 18,42% d'allo-anticorps totaux dans le système MNS. Il y a en effet 3 anti-MNS1 (M), 1 anti-MSN2 (N), 9 anti-MSN3 (S) et 1 anti-MSN4 (s) (**Figure 19**).



**Figure 19.** Répartition des allo-anticorps majeurs retrouvés chez les patients allo-immunisés.

### 1.2.2.2. Allo-anticorps mineurs

Chez les 48 patients allo-immunisés, 15 allo-anticorps mineurs sont retrouvés. Il s'agit de 8 anti-KEL3 (Kpa) ce qui correspond à 53,33% des allo-anticorps mineurs et 10,52% des allo-anticorps totaux, 5 anti-RH8 (Cw) représentant 33,33% des allo-anticorps mineurs et 6,58% des allo-anticorps totaux, 1 anti-LU2 (Lub) et 1 anti-Ge2, correspondant chacun à 6,66% des allo-anticorps mineurs et 1,31% des allo-anticorps totaux (**Figure 20**).



**Figure 20.** Répartition des allo-anticorps mineurs chez les patients allo-immunisés.

### 1.2.3. Répartition des allo-anticorps en fonction du TDA

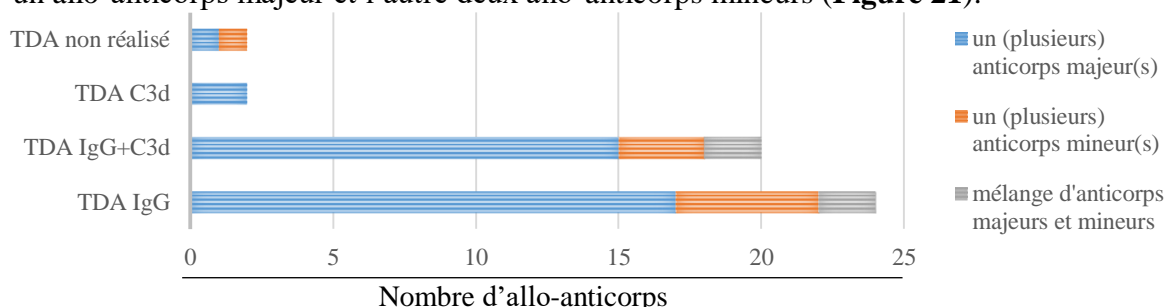
Au sein de la cohorte de patients allo-immunisés, 24 d’entre eux ont un TDA IgG soit 15,18% des patients présentant un TDA IgG et 20 ont un TDA IgG+C3d, soit 13,79% des patients présentant un TDA IgG+C3d. Deux patients ont un TDA C3d, soit 66,66% des patients présentant un TDA C3d et pour 2 patients, le TDA n’a pas été réalisé (soit pour 15,38% des patients).

Parmi les 24 patients présentant un TDA IgG, 17 patients sont porteurs d’un ou plusieurs allo-anticorps majeurs, 5 patients ont un ou plusieurs allo-anticorps mineurs et 2 patients sont à la fois immunisés contre un ou plusieurs antigènes mineurs et un ou plusieurs antigènes majeurs (**Figure 21**).

Parmi les 20 patients présentant un TDA IgG+C3d, 15 patients sont porteurs d’un ou plusieurs allo-anticorps majeurs, 3 patients présentent un ou plusieurs allo-anticorps mineurs et 2 patients sont à la fois immunisés contre un ou plusieurs antigènes mineurs et un ou plusieurs antigènes majeurs (**Figure 21**).

Pour les 2 patients présentant un TDA C3d, ils sont porteurs d’un ou plusieurs allo-anticorps majeurs (**Figure 21**).

Enfin, concernant les 2 patients pour lequel le TDA n’a pas été réalisé, l’un d’entre eux présente un allo-anticorps majeur et l’autre deux allo-anticorps mineurs (**Figure 21**).

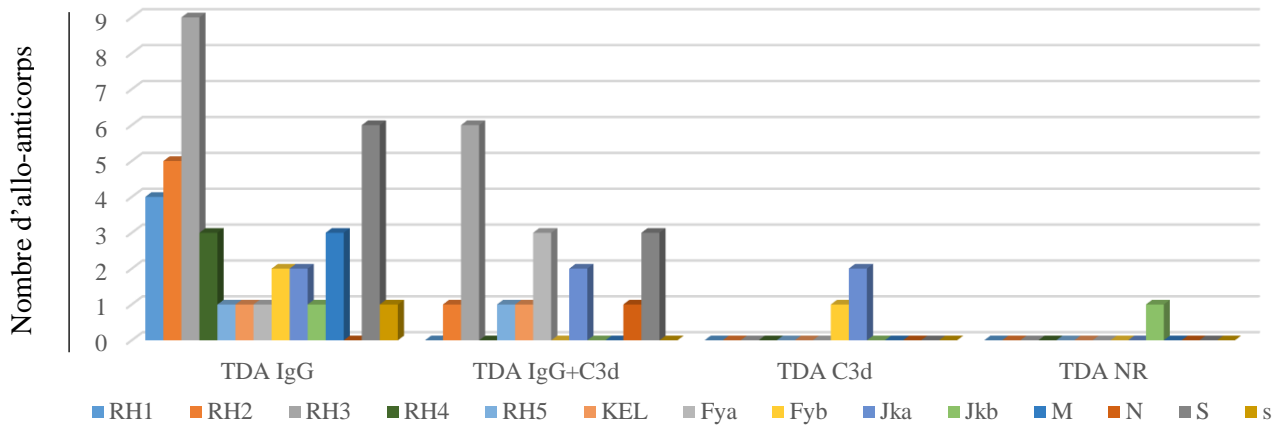


**Figure 21.** Répartition des allo-anticorps par TDA.

#### 1.2.3.1. Allo-anticorps majeurs

Dans les deux groupes de patients ayant un TDA positif « IgG » et « IgG+C3d », les allo-anticorps les plus fréquemment retrouvés sont les allo-anticorps du système RH, suivis par les

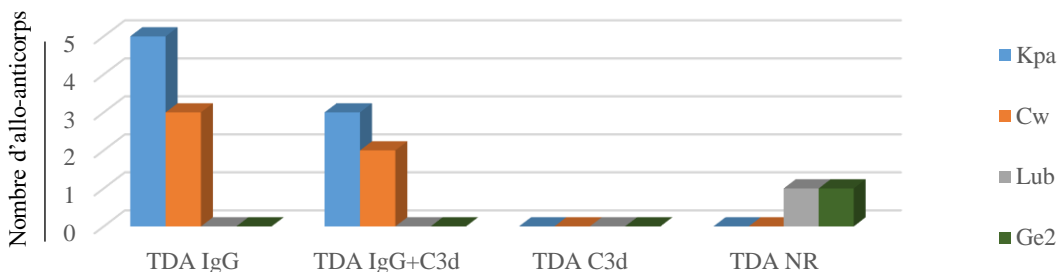
allo-anticorps dirigés contre les antigènes MNS3 (S) et FY1 (Fya). Parmi les allo-anticorps du système RH, c'est l'allo-anticorps anti-RH3 (E) qui est le plus représenté (retrouvé chez 15 patients), **Figure 22**.



**Figure 22.** Répartition des allo-anticorps majeurs en fonction du TDA.

### 1.2.3.2. Allo-anticorps mineurs

Concernant les allo-anticorps mineurs, la tendance est la même quelle que soit le type IgG ou IgG+C3d du TDA. En effet, dans les deux groupes de patients, l'allo-anticorps anti-KEL3 (Kpa) est majoritaire (respectivement retrouvé chez 5 et 3 patients), suivi par l'allo-anticorps anti-RH8 (Cw) (respectivement chez 3 et 2 patients) (**Figure 23**).



**Figure 23.** Répartition des allo-anticorps mineurs en fonction du TDA.

### 1.2.4. Allo-immunisations post-transfusionnelles

Cette étude a révélé 10 allo-immunisations liées à des transfusions sanguines. En effet, chez 3,13% des patients intégrés à l'étude, un nouvel allo-anticorps est apparu au décours d'une transfusion sanguine. Ces allo-immunisations sont toutes survenues chez des patients préalablement allo-immunisés. Ainsi, 20,83% des patients allo-immunisés ont acquis un nouvel allo-anticorps au cours de leur prise en charge transfusionnelle. De plus, au cours des sept années de l'étude, aucun allo-anticorps n'a été mis en évidence chez les patients auto-immunisés, non allo-immunisés au préalable.

## 2. Sécurité transfusionnelle et auto-anticorps : comparaison des techniques

### 2.1. Caractéristiques générales de la cohorte

#### 2.1.1. Profil des patients inclus

L'étude prospective a été menée sur une cohorte de 11 patients porteurs d'un auto-anticorps responsable d'une image de pan-agglutination à la RAI à +37°C et pris en charge par le laboratoire d'immuno-hématologie de l'EFS site Mondor (Créteil).

L'âge médian de cette cohorte est de 70 ans avec un sex ratio (H/F) de 0,37.

Les patients inclus présentent différentes pathologies ayant conduit à leur auto-immunisation. Ainsi, deux patients drépanocytaires, sept patients ayant développé une AHAI secondaire et 2 patients dont la pathologie n'est pas renseignée dans leur dossier transfusionnel ont été sélectionnés pour participer à l'étude (**Table 13**).

**Table 13.** Caractéristiques des patients inclus dans la cohorte de l'étude portant sur les techniques réalisées en présence d'un auto-anticorps.

	3 Hommes	8 Femmes
Age	45 (36 - 79)	71.5 (9 - 87)
Pathologie	Drépanocytose (n=1) AHAI liée à un virus immunodéficient (n=1) AHAI secondaire à une pneumopathie (n=1)	Drépanocytose (n=1) AHAI liée à une hémopathie (n=3) AHAI liée à un virus immunodéficient (n=1) AHAI liée à une maladie auto-immune (n=1) Pathologie non connue (n=2)

#### 2.1.2. Répartition des patients en fonction du TDA

Chez les patients présentant une image de pan-agglutination à la RAI avec un témoin autologue positif, un TDA a été réalisé. Parmi ces patients, 54,55% sont porteurs d'une IgG à la surface de leurs GR et 45,45% portent à la fois des IgG et des fractions du complément (C3d). Ces patients ont tous un TDA au moins supérieur à 3+ en IgG.

En parallèle au TDA, le titrage de l'auto-anticorps a été réalisé afin d'évaluer sa corrélation avec l'intensité du TDA (**Table 14**). Aucune concordance n'a été établie entre le titre de l'auto-anticorps et l'intensité du TDA.



**Table 14.** T et intensité du TDA en fonction du titre de l'auto-anticorps.

<b>Titre</b> <b>TDA</b>	<b>Pur</b>	<b>1/2</b>	<b>1/4</b>	<b>1/16</b>	<b>1/32</b>	<b>1/64</b>	<b>1/128</b>
<b>IgG</b>	IgG4+ (n=1)	IgG3+ (n=1)	IgG4+ (n=2)	IgG3+ (n=1)		IgG3+ (n=1)	
<b>IgG+C3d</b>			IgG3+C3d2+ (n=1)	IgG4+C3d2+ (n=1)	IgG4+C3d3+ (n=1)		IgG4+C3d2+ (n=1)
					IgG4+C3d1+ (n=1)		

## 2.2. Techniques étudiées

### 2.2.1. Allo-adsorptions

Afin de sécuriser la prise en charge transfusionnelle de ces patients, différents moyens ont été mis en œuvre, dont des allo-adsorptions, décrites comme étant les plus efficaces pour retirer l'auto-anticorps.

En théorie, un nombre de cycles d'allo-adsorption correspondant à l'intensité de la réaction en TIA devrait être réalisé, supposé en lien avec la force de l'auto-anticorps. En pratique, lorsque le TIA est d'intensité supérieure à 2+, quatre cycles d'allo-adsorption sont réalisés en première intention (nombre de cycles déterminé au cours de la validation de méthode du laboratoire). Afin de revoir les modes opératoires du laboratoire, le nombre de cycles d'allo-adsorption réalisé en première intention a été diminué en technique LISS afin d'éviter tout retard dans le rendu des résultats.

Dans cette cohorte, tous les auto-anticorps sont actifs en papaine, ainsi, les techniques d'allo-adsorption ont toutes été réalisées sur des hématies papainées.

Trois techniques d'allo-adsorptions ont été comparées. La **table 15** représente le nombre de cycles d'allo-adsorption nécessaires et la durée requise en fonction des différentes techniques.

Le nombre moyen de cycles d'allo-adsorption en l'absence de PEG ou de LISS est de 3,70 cycles avec un délai de réalisation de 129,50 minutes environ. En effet, chaque cycle d'allo-adsorption par la technique sans PEG/LISS dure 35 minutes.

En présence de LISS, le nombre de cycles moyen est de 2,78 cycles avec un temps technique estimé à 55,60 minutes (chaque cycle dure 20 minutes).

Enfin, en présence de PEG, 4 cycles sont généralement nécessaires et requièrent 80 minutes de technique étant donné que chaque cycle dure 20 minutes. Notons cependant que le nombre de cycles d'allo-adsorption réalisés en premier lieu en technique PEG correspond au mode opératoire du laboratoire, issu d'une validation de méthode préalable. Un nombre plus réduit de cycles aurait peut-être suffi dans ce travail.

**Table 15.** Adsorption de l'auto-anticorps par différentes techniques. Nombre moyen de cycles nécessaires et durée moyenne estimée par technique.

Procédure	Nombre d'échantillons étudiés	Nombre moyen de cycles d'adsorption	Temps moyen par adsorption (min)
Allo-adsorption sans LISS/PEG	10	3,70 [2-7]	129,50
Allo-adsorption en présence de LISS	9	2,78 [2-6]	55,60
Allo-adsorption en présence de PEG	11	4 [2-6]	80

Ensuite, si l'on compare la technique **avec** PEG ou LISS à celle **sans** PEG ou LISS, aucun allo-anticorps n'a été dilué par le PEG ni le LISS. Tous les allo-anticorps mis en évidence en l'absence de PEG ou de LISS ont été retrouvés en présence de PEG ou de LISS avec une intensité similaire. Par ailleurs, si la technique est réalisée en l'absence de PEG ou de LISS, elle nécessite davantage de cycles d'allo-adsorption. En moyenne, en l'absence de PEG ou de LISS, un cycle d'allo-adsorption supplémentaire [1 – 2] a été nécessaire pour s'affranchir de l'auto-anticorps (**Table 16**).

En comparant la technique **PEG** avec la technique **LISS**, aucune différence n'a été observée dans la détection d'un allo-anticorps. Tous les allo-anticorps mis en évidence par la technique d'allo-adsorption en présence de PEG ont été retrouvés avec la technique LISS. De plus, à nombre de cycles d'allo-adsorption égal, l'intensité des allo-anticorps mise en évidence par la technique PEG est comparable à l'intensité en présence de LISS.

Si l'on s'intéresse à l'efficacité des techniques PEG et LISS dans l'adsorption de l'auto-anticorps, le nombre de cycles d'allo-adsorption en LISS a toujours été inférieur ou égal au nombre de cycles en PEG hormis pour un patient. En effet, un échantillon a nécessité un cycle d'allo-adsorption supplémentaire en présence de LISS par rapport au PEG pour éliminer l'auto-anticorps (**Table 16**).

**Table 16.** Allo-adsorptions par trois techniques différentes réalisées sur les mêmes échantillons

Echantillon	Allo-adsorption sans		Allo-adsorption avec		Allo-adsorption avec		Allo-anticorps
	PEG/LISS		PEG		LISS		
	Nb d'adsorptions	Temps (min)	Nb d'adsorptions	Temps (min)	Nb d'adsorptions	Temps (min)	
1	7	245	6	120	6	120	<b>Fya + Kpa</b>
2	3	105	4	80	2	40	Négatif
3	3	105	4	80	2	40	Négatif
4	3	105	4	80	2	40	Négatif
5	NR†	NR†	4	80	2	40	Négatif
6	2	70	2	40	NR†	NR†	Négatif
7	4	140	4	80	NR†	NR†	<b>E + Kpa</b>
8	3	105	4	80	2	40	<b>C‡</b>
9	3	105	2	40	2	40	<b>Jkb + Kpa</b>
10	7	245	4	80	5	100	Négatif
11	4	140	6	120	2	40	Négatif
Moyenne	3.70	129.50	4	80	2.78	55.60	

† : Quantité insuffisante pour réaliser l'analyse, ‡ : RH2 (C) adsorbé par la cellule d'allo-adsorption RH2

Dans ce travail, 36,36% des patients présentent un allo-anticorps, préalablement masqué par l'auto-anticorps. Parmi ces patients, les 4 présentent un allo-anticorps majeur et pour 3 d'entre eux, un allo-anticorps mineur est également retrouvé. Concernant les allo-anticorps majeurs retrouvés, la moitié proviennent du système RH, un quart du système FY et un quart du système JK. Chez l'ensemble des patients porteurs d'un allo-anticorps mineur, un anti-KEL3 (Kpa) a été retrouvé.

Par ailleurs, afin de ne pas risquer de diluer un allo-anticorps de faible titre, le nombre de cycles d'allo-adsorption probabiliste a été réévalué avec la technique LISS. Pour rappel, le nombre de cycles nécessaire n'a pas été réévalué en technique PEG.

Ce travail a montré que le nombre de cycles d'allo-adsorption nécessaire est généralement inférieur à 4 cycles en technique LISS. En effet, chez les neuf patients dont l'intensité de réaction au TDA et en TIA est compris entre 3 et 4+, un nombre moyen de 2,78 [2-6] cycles d'allo-adsorption en LISS a permis de s'affranchir de l'auto-anticorps (**Table 17**).

Aussi, lorsque le titre de l'auto-anticorps est inférieur ou égal à 1/16 (66,67% des cas), 2 cycles d'allo-adsorption permettent d'éliminer l'auto-anticorps. Au-delà de ce titre, le nombre de cycles nécessaires n'est pas associé de façon linéaire au titre de l'auto-anticorps (**Table 17**).

**Table 17.** Corrélation entre le titre de l'auto-anticorps, l'intensité du TIA, l'intensité du TDA et le nombre de cycles d'allo-adsorption nécessaires pour s'affranchir de l'auto-anticorps.

Echantillon	Titre de l'anticorps	Intensité TIA	Intensité TDA	Nb cycles en LISS
1	1/128	4+	IgG4+C3d2+	4
2	Pur	4+	IgG4+	2
3	1/32	4+	IgG4+C3d3+	6
4	1/16	3+	IgG4+C3d2+	2
5	1/32	3+	IgG4+C3d1+	4
6	1/16	3+	IgG3+	2
7	1/2	3+	IgG3+	2
8	1/4	4+	IgG3+C3d2+	2
9	1/4	3+	IgG4+	2

Ce travail n'a permis d'établir aucune concordance entre le titre de l'auto-anticorps et l'intensité du TIA corrélé à l'intensité du TDA. Les discordances entre intensité du TIA, TDA et titre de l'auto-anticorps pourraient être attribuées à un phénomène de zone lors de la réalisation du TDA (**Table 17**).

### 2.2.2. Dilutions

En parallèle des techniques d'allo-adsorption, des dilutions de plasma et d'éluat ont été réalisées. L'objectif étant de déterminer la dilution optimale et si cette technique est une aide à l'identification d'allo-anticorps masqués par un auto-anticorps. Au cours de ce travail, des dilutions au 1/2 et au 1/5 ont été réalisées sur des échantillons plasmatiques de 11 patients.

Chez un patient, l'auto-anticorps s'est négativé, quelle que soit la dilution.

Au 1/2, 7 échantillons contiennent un auto-anticorps réactif, un échantillon contient un mélange d'auto-anticorps et d'allo-anticorps, visualisable par des différences d'intensité et dans deux échantillons, l'allo-anticorps est clairement identifiable.

Au 1/5, 5 échantillons contiennent toujours un auto-anticorps et un échantillon a vu son auto-anticorps dilué. Un mélange d'auto et d'allo-anticorps est suggéré dans 2 échantillons et dans deux échantillons, l'allo-anticorps est nettement visible.

En diluant les échantillons au 1/2, aucun allo-anticorps connu ne disparaît. Au 1/5, un allo-anticorps de faible intensité, issu d'un mélange d'allo-anticorps n'est plus visible (**Table 18**).

**Table 18.** Résultats après dilutions au 1/2 et au 1/5 de 11 échantillons.

	Dilution 1/2			Dilution 1/5		
	Non réactif	Réactif	Anticorps identifié(s)	Non réactif	Réactif	Anticorps identifié(s)
Auto-anticorps	1* (10%)	7* (60%)		2* (10%)	5* (50%)	
Auto-anticorps + allo-anticorps	0	1* (10%)	2* (20%)	0	2* (20%)	2* (20%)

\*Nombre d'échantillons contenant des auto-anticorps et/ou des allo-anticorps.

Parmi les onze échantillons plasmatiques, 4 échantillons contiennent un ou plusieurs allo-anticorps, préalablement mis en évidence par des techniques d'allo-adsorption.

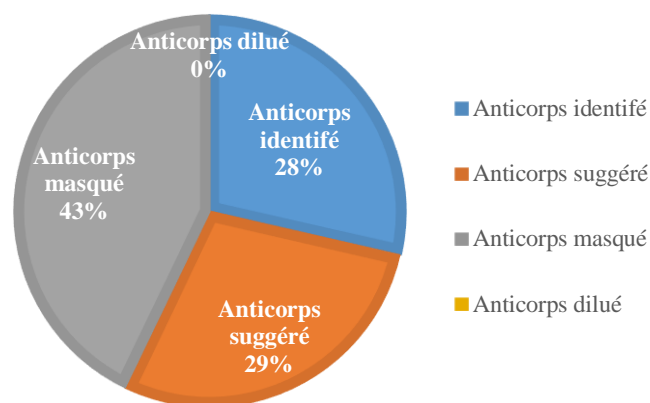
La dilution au 1/2 a permis d'identifier l'allo-immunisation d'un patient (RH3 (E) + KEL3 (Kpa)) et suggéré l'allo-immunisation d'un autre patient (JK2 (Jkb) + KEL3 (Kpa)). La dilution au 1/2 n'a pas permis de démasquer deux allo-immunisations (RH2 (C) et FY1 (Fya) + KEL3 (Kpa)) mais a permis de suggérer la spécificité de deux auto-anticorps (auto-RH2 (C) + auto-RH5 (e) et auto-RH7 (Ce)).

Concernant la dilution au 1/5, celle-ci a permis d'identifier une allo-immunisation (JK2 (Jkb) + KEL3 (Kpa)) chez un patient, ainsi qu'une partie de l'allo-immunisation d'un autre patient (KEL3 : Kpa). Chez ce même patient, l'allo-anticorps anti-RH3 (E), visible au 1/2, ne l'est plus au 1/5. Par ailleurs, la dilution au 1/5 a permis de suggérer la présence de deux allo-immunisations (FY1 (Fya) + KEL3 (Kpa) et RH2 (C)). De plus, les deux auto-anticorps visibles au 1/2 sont également observables au 1/5 (**Table 19**).

**Table 19.** Spécificité des allo-anticorps observés après des dilutions au 1/2 et au 1/5 chez 11 patients porteurs d'un auto-anticorps.

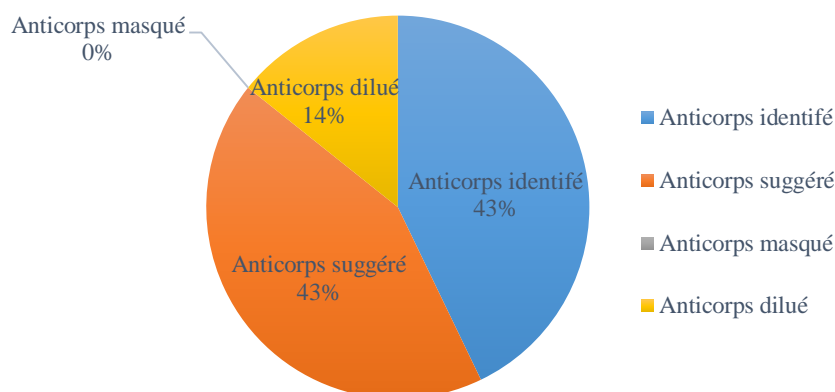
		Allo-anticorps			
Masqué		Identifié		Suggéré	
Dilution 1/2	Dilution 1/5	Dilution 1/2	Dilution 1/5	Dilution 1/2	Dilution 1/5
FY1 (Fya)		RH3 (E)	Kpa (2)	JK2 (Jkb)	FY1 (Fya)
KEL3 (Kpa)		KEL3 (Kpa)	JK2 (Jkb)	KEL3 (Kpa)	KEL3 (Kpa)
RH2 (C)					RH2 (C)

Parmi les 11 échantillons étudiés, 7 allo-anticorps sont présents dans 4 échantillons. Ces 7 allo-anticorps ont tous été révélés par les techniques de dilution. Pour la dilution au 1/2, 28% des allo-anticorps ont été identifiés, 29% ont été suggérés, 43% étaient masqués et aucun allo-anticorps n'a été dilué par cette technique (**Figure 24**).



**Figure 24.** Allo-anticorps mis en évidence suite à une dilution au 1/2 des échantillons plasmatiques.

Concernant la dilution au 1/5, 43% des allo-anticorps ont été identifiés, 43% des allo-anticorps ont été suggérés et 14% des allo-anticorps n'ont pas été mis en évidence du fait de la dilution. Par ailleurs, la dilution au 1/5 a permis de révéler les allo-anticorps préalablement masqués par l'auto-anticorps lors de la dilution au 1/2 (**Figure 25**).



**Figure 25.** Allo-anticorps mis en évidence suite à une dilution au 1/5 des échantillons plasmatiques.

Ensuite, le mélange d'auto/allo-anticorps fixé à la surface des GR de 10 patients a été élué puis étudié après des dilutions de l'éluat au 1/2 et au 1/5.

Chez 9 patients, la recherche d'allo-anticorps sur l'éluat pur, traité au 1/2 et au 1/5 n'a pas été concluante. Seule une image de pan-agglutination liée à l'auto-anticorps était visible. Néanmoins, chez l'un des patients, un anti-JK1 (Jka) a pu être suspecté sur l'éluat pur (**Table 20**).

**Table 20.** Résultats après dilution de l'éluat au 1/2 et au 1/5.

	Eluat		
	Pur	1/2	1/5
Auto-anticorps	9	10	10
Allo-anticorps	1	0	0

## **DISCUSSION**

### **1. Fréquence d'allo-immunisation de patients porteurs d'auto-anticorps**

#### **1.1. Caractéristiques de la cohorte de patients présentant un auto-anticorps**

##### **1.1.1 Caractéristiques générales des patients**

Chez des patients nécessitant une prise en charge transfusionnelle, porteurs d'un auto-anticorps responsable d'une image de pan-agglutination à la RAI, des techniques d'allo-adsorption sont réalisées à l'EFS site Mondor (Créteil) afin d'assurer leur sécurité transfusionnelle. Au cours des sept années de l'étude, 350 patients ont ainsi été inclus, mais 31 d'entre eux ont été exclus des analyses compte tenu de leur pathologie (drépanocytose et/ou thalassémie), risquant d'interférer avec les résultats de l'étude. Ainsi, 319 patients nécessitant une transfusion sanguine ont bénéficié des techniques d'allo-adsorption afin de mettre en évidence un potentiel allo-anticorps masqué par l'auto-anticorps.

##### **1.1.2 Répartition des patients de l'étude en fonction de leur pathologie**

L'inclusion des patients dans l'étude ne s'est pas faite sur la pathologie (AHAI clinique) mais sur la présence d'un auto-anticorps donnant une image de pan-agglutination à la RAI réalisée à +37°C avec un témoin autologue positif (AHAI biologique), car l'EFS ne dispose pas des données cliniques pour chaque patient. En effet, sur les 319 patients, la pathologie n'est renseignée que dans 145 dossiers. Cela est dû au fait que l'EFS n'a pas accès au logiciel médico-technique de l'hôpital permettant de connaître la pathologie du patient. D'autre part, l'EFS est limité par le manque de renseignements cliniques sur les demandes d'examen en provenance de l'hôpital ainsi que des autres établissements de soins qui envoient leurs examens à l'EFS site Mondor. Cette étude a néanmoins montré que sur 145 patients, 138 sont porteurs d'une AHAI clinique et biologique, qu'elle soit primaire ou secondaire, soit 95,17% des patients dont le dossier médical est renseigné. Malgré l'absence de données cliniques sur les 174 patients restants, aucun d'entre eux n'est drépanocytaire ou thalassémique, ces pathologies étant systématiquement renseignées. Par ailleurs, bien que des auto-anticorps puissent être observés chez des patients sains de tous âges, ceux-ci n'ont généralement pas besoin d'être transfusés. Il est ainsi raisonnable de penser que parmi les 174 patients dont la pathologie n'est pas renseignée mais pour lesquels la RAI pré-transfusionnelle a nécessité une technique d'allo-adsorption, la majorité d'entre eux doit présenter une AHAI clinique.

Dans la cohorte de 138 patients présentant une AHAI avérée, l'âge médian est de 73 ans et le sex ratio H/F de 1,22. L'âge médian retrouvé correspond aux données de la littérature. En effet, l'AHAI connaît un pic d'incidence après 65 ans, en lien avec le risque de développer une pathologie lymphoproliférative ou un dérèglement du système immunitaire avec l'âge<sup>5</sup>. La prédominance masculine de cette cohorte n'est pas en adéquation avec les données de la littérature car dans la population adulte, l'AHAI est généralement observée chez les femmes<sup>7</sup>. Ceci peut s'expliquer par un biais de recrutement.

Dans cette étude, l'origine idiopathique ou secondaire de l'AHAI clinique n'est pas étiquetée chez 36,95% des patients, mais chez les 63,05% restants, l'AHAI clinique est secondaire. Dans la littérature, la moitié des AHAI à auto-anticorps chauds est idiopathique<sup>10</sup> et l'autre moitié secondaire.

Au sein de la cohorte, on retrouve une majorité d'AHAI cliniques secondaires à une hémopathie (81,60%) suivie par les AHAI secondaires à des dérèglements du système immunitaire (18,40%). Parmi les dérèglements du système immunitaire, on retrouve les pathologies auto-immunes telles que le LES, les hépatites auto-immune et enfin les virus immunodéficients. Ces données sont en adéquation avec la littérature de l'AHAI clinique à auto-anticorps chauds<sup>11</sup>. De plus, dans cette cohorte, la LLC est l'hémopathie la plus fréquemment associée à une AHAI (49%), suivie par les LNH et les SMD. Ces données sont également superposables avec la littérature<sup>12</sup> de l'AHAI à auto-anticorps chauds.

### **1.1.3. Répartition des patients en fonction du TDA**

Les patients ont été sélectionnés sur la nécessité de réaliser des allo-adsorptions en raison d'un auto-anticorps recouvrant à +37°C. Or les images de pan-agglutination à la RAI à +37°C sont généralement dues à des auto-anticorps chauds<sup>13</sup>. En effet, les auto-anticorps froids ne donnent habituellement pas de réaction positive à la RAI réalisée à +37°C car à cette température, les IgM ne sont généralement pas actives. Ainsi, cette cohorte est constituée de patients présentant une AHAI biologique à auto-anticorps chauds, la plus fréquente des AHAI (75% des cas). De plus, dans l'AHAI à auto-anticorps chauds, l'auto-anticorps est généralement une IgG mais des auto-anticorps de type IgM<sup>14</sup> peuvent également être rencontrés. Chez les 138 patients présentant une AHAI, 38% ont un TDA IgG, 60% un TDA IgG+C3d et pour 2% des patients, le TDA n'a pas été réalisé. Ces données sont superposables aux données de Castilho *et al*<sup>16</sup> qui retrouvent 33% d'AHAI à auto-anticorps chauds avec un TDA IgG, 50% avec un TDA IgG+C3d et 10% d'AHAI à auto-anticorps chauds avec un TDA C3d pur.



## 1.2. Caractéristiques de l'allo-immunisation des patients auto-immunisés

### 1.2.1. Répartition des patients en fonction du type d'allo-immunisation

Si on s'intéresse aux allo-immunisations, 15,05% des patients non drépanocytaires et non thalassémiques inclus dans l'étude présentent un ou plusieurs allo-anticorps (76 allo-anticorps retrouvés) révélés par des techniques d'allo-adsorption. Cette fréquence d'allo-immunisation est en adéquation avec les données de la littérature sur les populations caucasiennes, qui indiquent un taux moyen d'allo-immunisation compris entre 10 et 40%<sup>107</sup>. Cependant, les critères d'inclusion des patients au sein des cohortes ayant permis de retrouver ces taux d'allo-immunisation sont variables d'une étude à l'autre. Dans certaines études, seuls les allo-anticorps d'intérêt clinique (allo-anticorps majeurs) ont été pris en compte<sup>116</sup>. Si on ne considère que les patients allo-immunisés contre un ou plusieurs antigènes majeurs dans la cohorte de patients suivis à l'EFS site Mondor, seuls 12,23% des patients sont allo-immunisés, ce qui correspond à la fourchette basse des données de la littérature. Ces résultats sont en adéquation avec l'étude de Sokol *et al.*<sup>116</sup>, ainsi qu'avec l'étude de So *et al.*<sup>113</sup> qui a trouvé un taux d'allo-immunisation de 16,4% si on considère tous les allo-anticorps, qu'ils soient majeurs ou mineurs et un taux d'allo-immunisation de 11,9% si on s'affranchit des allo-anticorps mineurs. L'équipe de So *et al.*<sup>113</sup> a expliqué les faibles taux d'allo-immunisation observés par une homogénéité phénotypique de leur population d'étude. Contrairement à la population chinoise de l'étude de So *et al.*<sup>113</sup>, la population caucasienne étudiée ici présente une diversité phénotypique importante. Les faibles taux d'allo-immunisation observés peuvent cependant s'expliquer par le fait qu'à l'EFS site Mondor, les patients porteurs d'un auto-anticorps responsable d'une image de pan-agglutination à la RAI sont systématiquement transfusés en CGR phénotypés RH-KEL1, ce qui limite le risque d'allo-immunisation dans ces deux systèmes de groupes sanguins très immunogènes. De plus, des techniques d'auto-adsorption ont été réalisées dans la plupart des études publiées, or au cours de l'auto-adsorption, des auto-anticorps mimant des allo-anticorps peuvent persister<sup>111</sup>. De ce fait, les études portant sur la prévalence de l'allo-immunisation, réalisées à partir d'échantillons auto-adsorbés risquent de donner des résultats surestimés. Dans l'étude présentée ici, seules des techniques d'allo-adsorptions ont été réalisées ; ainsi, les faibles taux d'allo-immunisations pourraient en partie être expliqués par l'absence d'auto-anticorps persistants. Enfin, cette étude s'est intéressée à une cohorte de patients présentant une image de pan-agglutination et ayant nécessité des adsorptions pré-transfusionnelles. Cette cohorte n'est pas exhaustive car elle n'inclut pas les patients présentant

une AHAI et n'ayant pas eu de besoin transfusionnel. Ainsi, il existe un biais de sélection pouvant fausser le taux d'allo-immunisation.

## **1.2.2. Caractéristiques des allo-anticorps retrouvés**

### **1.2.2.1. Allo-anticorps majeurs**

L'allo-anticorps le plus fréquemment retrouvé est l'anticorps anti-RH3 (E), présent chez 15 patients. Cet allo-anticorps est fréquemment cité dans la littérature<sup>108</sup>, tout comme les autres anticorps du système RH, dont l'anti-RH2 (C) retrouvé chez 6 patients de la cohorte. Le grand nombre d'allo-immunisations dans le système RH (49,18% des allo-anticorps majeurs) conforte le besoin de transfuser les patients atteints d'une AHAI avec des CGR phénotypés RH-KEL1. Dans cette cohorte, un faible nombre d'allo-anticorps anti-KEL1 a été mis en évidence à la différence des données de la littérature<sup>108</sup>. Cela peut s'expliquer par le fait que ces patients ont été transfusés avec des CGR phénotypés RH-KEL1. Les allo-anticorps anti-FY et anti-JK retrouvés dans cette cohorte sont également retrouvés dans la littérature à des fréquences similaires<sup>108</sup>. Par ailleurs, contrairement aux données de la littérature, il ressort de cette étude un grand nombre d'allo-immunisations dans le système MNS et plus particulièrement des allo-anticorps anti-MNS3 (S), présents chez 18,75% des patients allo-immunisés. Un élément d'explication pourrait être l'hétérogénéité phénotypique des populations de donneurs de sang en Ile-de-France. D'autre part, cette étude a mis en évidence 6,25% d'allo-immunisation anti-MNS1 (M). Ces allo-anticorps n'ont pas toujours été évalués dans les études réalisées par le passé du fait des doutes existant sur leur éventuelle implication en clinique<sup>108</sup>.

### **1.2.2.2. Allo-anticorps mineurs**

Dans cette étude, 18,75% des patients allo-immunisés présentent un ou plusieurs allo-anticorps mineur(s). Comme la plupart des travaux s'affranchissent des allo-anticorps mineurs du fait de leur faible implication clinique, cette étude est la seule qui met en évidence la part non négligeable des allo-immunisations liées à des antigènes mineurs.

## **1.2.3. Répartition des allo-anticorps en fonction du TDA**

Les patients ont été inclus dans cette étude sur la base d'une image de pan-agglutination avec un TDA positif et non sur la nature du TDA. Néanmoins, les fréquences d'allo-immunisation selon la nature du TDA sont identiques (15,18% chez les patients dont le TDA est de nature IgG contre 13,79% d'allo-immunisation chez les patients dont le TDA est IgG+C3d). Cette étude décrit pour la première fois les fréquences d'allo-immunisation en fonction du type

d'auto-anticorps. De plus, quel que soit le TDA du patient, l'allo-anticorps le plus fréquemment retrouvé est l'allo-anticorps anti-RH3 (E). L'étude de cette cohorte a également permis de mettre en évidence que les allo-anticorps anti-RH sont majoritairement retrouvés chez des patients présentant un TDA IgG. Etant donné qu'au cours de l'AHAI à auto-anticorps chauds, l'auto-anticorps est généralement dirigé contre le système RH, un lien pourrait exister entre l'allo-immunisation et l'auto-immunisation dans ce système.

#### **1.2.4. Allo-immunisations post-transfusionnelles**

Dans cette cohorte, 38% des patients sont porteurs de plus d'un allo-anticorps. Il faut cependant tenir compte du fait que cette cohorte est âgée (médiane à 73 ans) ce qui implique une exposition antigénique possiblement importante (grossesse(s), transfusions itératives)<sup>108</sup>. Par ailleurs, l'étude de l'incidence de nouvelles allo-immunisations chez les 48 patients allo-immunisés a montré que 10 d'entre eux (soit 20,83% des patients) ont développé un nouvel allo-anticorps à la suite d'une transfusion sanguine durant les 7 années de l'étude. Ces éléments peuvent s'expliquer par les perturbations du système immunitaire liées à l'auto-anticorps et l'évolution de leur pathologie auto-immune. Malgré les données contradictoires de la littérature<sup>101,102</sup>, ces deux observations semblent en faveur d'un risque d'allo-immunisation majoré des patients porteurs d'allo et d'auto-anticorps par rapport à la population de patients régulièrement transfusés sans auto-anticorps<sup>108,154</sup>.

L'incidence d'allo-immunisation *de novo* a également été étudiée sur cette cohorte au cours des sept années de l'étude. Aucun patient non préalablement allo-immunisé n'a développé d'allo-anticorps au cours de l'étude. Au vu de cet élément, le terrain auto-immun ne semble pas être un facteur de risque de primo allo-immunisation anti-érythrocytaire.

## **2. Sécurité transfusionnelle et auto-anticorps : comparaison des techniques**

### **2.1. Caractéristiques générales de la cohorte**

#### **2.1.1. Profil des patients inclus**

Au cours de ce travail, 11 patients porteurs d'un auto-anticorps donnant une image de pan-agglutination à la RAI à +37°C ont été inclus.

L'âge médian de cette cohorte est de 70 ans avec un sex ratio (H/F) de 0,37.

Malgré l'inclusion de deux patients drépanocytaires constituant un biais, les données démographiques de cette cohorte sont en adéquation avec les données de l'AHAI à auto-

anticorps chauds<sup>5</sup>. Pour deux patients, la pathologie n'était ni renseignée ni facilement accessible, car ces patients étaient pris en charge dans d'autres centres hospitaliers qu'Henri Mondor.

### **2.1.2. Répartition des patients en fonction du TDA**

Dans ce travail, 54,55% des patients sont porteurs d'une IgG à la surface de leurs GR et 45,45% portent à la fois des IgG et des fractions du complément (C3d). Ces résultats sont dans les mêmes proportions que ceux trouvés par Chaudhary *et al*<sup>64</sup> et Salama *et al*<sup>91</sup> qui obtiennent 65,21% d'IgG et 34,78% d'IgG+C3d pour l'un, 77,77% d'IgG et 22,23% d'IgG+C3d pour l'autre. Les différences de valeurs obtenues peuvent s'expliquer par la taille de la cohorte.

Par ailleurs, malgré des études controversées<sup>65</sup>, l'intensité de l'agglutination obtenue au TDA a été décrite comme étant associée au degré d'hémolyse<sup>66</sup>. Comme les 11 patients de l'étude ont des TDA très proches (3+ et 4+), aucune corrélation n'a pu être faite entre le degré d'hémolyse et l'intensité du TDA.

## **2.2. Techniques étudiées**

### **2.2.1. Allo-adsorptions**

Chez des patients porteurs d'un auto-anticorps, plusieurs techniques sont disponibles pour adsorber l'auto-anticorps afin de mettre en évidence un allo-anticorps sous-jacent. Au cours de ce travail, les techniques d'allo-adsorptions ont été réalisées plutôt que les techniques d'auto-adsorptions du fait des taux d'hémoglobine faibles chez les patients inclus à l'étude et de leurs antécédents transfusionnels récents. Dans cette étude, trois techniques d'allo-adsorptions ainsi que leur intérêt pour détecter un allo-anticorps ont été comparées afin de déterminer laquelle est la plus rapide et la plus efficace. Onze patients ont donc été étudiés en réalisant des allo-adsorptions à partir de GR sélectionnés en fonction de leur phénotype JK. En effet, l'intégralité des auto-anticorps de ces patients étaient réactifs en papaïne, il a ainsi été possible de s'affranchir des phénotypes FY et MNS. La réactivité des auto-anticorps à la papaïne est en adéquation avec les données de la littérature car lorsque des auto-anticorps sont actifs à +37°C, ceux-ci sont généralement dirigés contre des antigènes du système RH<sup>13</sup> et sont par conséquent actifs en papaïne. Par ailleurs, les cellules d'allo-adsorption disponibles ne couvrent pas tous les phénotypes RH-KEL1. Cependant, les patients auto-immunisés sont systématiquement transfusés en CGR phénotypés RH-KEL1 à l'EFS site Mondor.

L'étude de Chaudhary *et al.*<sup>126</sup> a montré que la technique en PEG est significativement plus efficace que la technique en LISS sur GR papainés (LISS papainé), résultats en contradiction avec cette étude. Dans l'étude de Chaudhary *et al.*<sup>126</sup>, 1,43 cycles d'allo-adsorption en PEG suffisent à retirer l'auto-anticorps contrairement aux 4 cycles nécessaires dans ce travail, en présence de PEG sur GR papainés (PEG papainé). De plus, en technique LISS papainé, 3,9 cycles d'allo-adsorption leur ont été nécessaires alors que 2,78 cycles suffisent ici. Ce résultat est comparable à celui de l'équipe de Chiaroni *et al.*<sup>128</sup> qui a eu besoin de 2,88 cycles d'allo-adsorption pour éliminer l'auto-anticorps. Les différences observées peuvent s'expliquer par le nombre minimal de cycles imposés en présence de PEG, ce qui peut conduire à un nombre de cycles d'allo-adsorption bien plus important que ce qu'il serait réellement nécessaire. Ce biais permettrait d'expliquer les discordances avec les travaux de la littérature<sup>64,127</sup>. Il serait donc intéressant de réévaluer l'efficacité du PEG en s'affranchissant du biais présent dans cette étude. De plus, contrairement à ce qui est décrit dans la littérature, l'étude a été réalisée ici en utilisant une technique en PEG papainé, ce qui suggère une meilleure efficacité de la technique. Néanmoins, l'utilisation concomitante du PEG et de la papaïne réduit peut-être l'efficacité de la technique. Une nouvelle étude comparant la technique en PEG et en PEG papainé permettrait d'éclairer ce point.

Ainsi, compte tenu des résultats observés avec la technique en LISS et les données de la littérature sur l'efficacité du PEG par rapport au LISS, le nombre de cycles réalisés en PEG semble trop important en première intention, ce qui risque de diluer l'allo-anticorps et avoir un impact sur le rendu des résultats et la mise à disposition des CGR.

Concernant la durée de la technique, l'allo-adsorption en présence de LISS semble être la plus rapide (55,6 minutes). L'équipe de Chiaroni *et al.*<sup>128</sup> a réalisé la technique en LISS en 57,6 minutes soit une durée équivalente à cette étude. Ces résultats peuvent s'expliquer par la durée d'incubation de 15 minutes dans les deux travaux. La technique en présence de PEG est légèrement plus longue (80 minutes) mais dans cette étude, le biais décrit plus haut est présent. Dans l'étude de Chaudhary *et al.*<sup>126</sup>, malgré des temps d'incubation similaires à cette étude (15 minutes d'incubation en PEG dans les 2 études et 20 minutes d'incubation en LISS pour l'équipe de Chaudhary *et al.*<sup>126</sup> contre 15 minutes dans ce travail), 93,6 minutes étaient nécessaires en PEG et 177,7 minutes en technique LISS ce qui est, dans les deux cas, bien plus long que les résultats obtenus dans ce travail. Notons que l'étude proposée ici, tout comme celle de Chiaroni *et al.*<sup>128</sup>, n'a pris en compte que la durée d'allo-adsorption. Ces résultats ne sont donc pas comparables à ceux de Chaudhary *et al.*<sup>126</sup> car ils ont indiqué la durée totale de la

technique, comprenant les temps liés à la méconnaissance de la technique par l'équipe ainsi que la RAI sur l'adsorbat.

Enfin, la technique en l'absence de LISS ou de PEG nécessite un nombre de cycles d'allo-adsorption plus important (3,70 cycles en moyenne) et est deux fois plus longue (129,50 minutes) que les autres techniques. Les résultats présentés ici ne sont pas superposables à ceux obtenus par l'équipe de Chiaroni *et al*<sup>128</sup> qui retrouvent un nombre moyen de 6 cycles d'allo-adsorption et un temps estimé à 180 minutes. Les différences observées ne peuvent s'expliquer par la durée d'incubation similaire et sont peut-être liées à la taille de la cohorte d'étude (120 échantillons pris en compte dans l'étude de Chiaroni contre 11 échantillons dans ce travail).

Ensuite, dans cette étude réalisée sur 11 échantillons, 36,36% des patients étaient allo-immunisés. Ce taux d'allo-immunisation correspond aux données de la littérature qui chiffrent le taux d'allo-immunisation avec des allo-anticorps d'intérêt clinique entre 10 et 40%. Néanmoins, cette cohorte est de trop petite taille pour que cette donnée soit exploitée. Une majorité d'allo-anticorps provenant du système RH (50% des allo-anticorps présents) ont été mis en évidence dans ce travail (anti-RH3 (E) et anti-RH2 (C)), ce qui est en adéquation avec les données de la littérature<sup>108,109,116</sup>. Par ailleurs, il existe peu de données dans la littérature sur les allo-anticorps mineurs. Ici, 42,86% des allo-anticorps sont des anti-KEL3 (Kpa) ce qui est bien plus élevé que les 10,52% retrouvés dans la première partie rétrospective de ce travail. A nouveau, ce chiffre peut être biaisé par la faible taille de la cohorte.

Par ailleurs, hormis pour un patient de l'étude de Chiaroni *et al*<sup>128</sup> dont l'allo-anticorps a été dilué en technique LISS papainé, des réactivités similaires ont été observées entre les techniques sans LISS ou PEG et LISS papainé dans l'étude de Chiaroni tout comme dans celle-ci. De plus, aucune dilution d'allo-anticorps n'a été observée dans ce travail. Mis à part la durée de l'allo-adsorption, aucune différence n'a été observée dans la détection d'un allo-anticorps entre les techniques **sans** PEG ou LISS et les techniques **avec** PEG ou LISS. La technique **sans** PEG ou LISS devrait être réservée aux seules situations où l'auto-anticorps est de faible intensité ou dans les cas où la technique en PEG ou en LISS ne fonctionne pas. L'étude de Cheng *et al*<sup>125</sup> a par ailleurs montré des dilutions de l'allo-anticorps par le PEG, dilutions non observées dans ce travail. L'étude de Barron et Brown<sup>130</sup> a également montré que le PEG pouvait détruire les anticorps anti-KEL1 et anti-JK2 (Jkb). Dans ce travail, seul un anti-JK2 (Jkb), d'intensité similaire en technique PEG par rapport à la technique **sans** PEG ou LISS et la technique en LISS a été retrouvé. Néanmoins, cette constatation n'est issue que de l'étude d'un allo-anticorps, une étude plus approfondie est nécessaire. Par ailleurs, Chaudhary *et al.*<sup>126</sup> retrouvent

une meilleure sensibilité de la technique en LISS par rapport à la technique en PEG dans la détection des allo-anticorps, en lien avec la précipitation des Ig causée par le PEG. Dans ce travail, l'intensité de l'allo-anticorps était équivalente dans les deux techniques. Cette différence observée peut être en lien avec l'utilisation d'une technique en PEG papainé, contrairement à l'équipe de Chaudhary *et al.* qui utilise du PEG seul.

Concernant le nombre de cycles d'allo-adsorption à réaliser, la théorie suggère que ce nombre correspond à l'intensité de la réaction en TIA, supposé en lien avec la force de l'auto-anticorps. Etant donné que le titre de l'auto-anticorps, reflet de la force de l'auto-anticorps, n'est pas associé à l'intensité du TDA (corrélé au TIA dans ce travail), l'allo-adsorption pourrait diluer un allo-anticorps chez des patients présentant un TDA ou un TIA de forte intensité malgré un faible titre d'auto-anticorps. Ainsi, l'estimation du nombre de cycles d'allo-adsorption ne devrait pas se faire sur l'intensité du TIA.

De plus, aucune corrélation n'a pu être établie entre le titre de l'auto-anticorps et le nombre de cycles d'allo-adsorption nécessaire. Le titre de l'auto-anticorps ne permet donc pas de prédire le nombre de cycles d'allo-adsorption nécessaire. Néanmoins, dans ce travail, lorsque le titre ne dépasse pas 1/16, deux cycles d'allo-adsorption semblent suffisants pour adsorber l'auto-anticorps. Au-delà, le nombre de cycles d'allo-adsorption requis est échantillon dépendant. Cette étude a montré que la majorité des auto-anticorps (66,67%) ont un titre inférieur ou égal à 1/16. Ainsi, il pourrait être intéressant de réaliser en premier lieu deux cycles d'allo-adsorptions au lieu des quatre habituellement réalisés au laboratoire, puis étudier la nécessité de poursuivre les adsorptions le cas échéant.

### **2.2.2. Dilutions**

L'ensemble des échantillons ont été dilués au 1/2 et au 1/5 afin de détecter un éventuel allo-anticorps, préalablement masqué par l'auto-anticorps. Ces techniques impliquent l'hypothèse que l'allo-anticorps est présent à titre plus élevé que l'auto-anticorps. Dans l'étude, la dilution au 1/2 a permis d'identifier 28% des allo-anticorps et d'en suggérer 29%. Pour 43% des allo-anticorps, la dilution au 1/2 n'a pas suffi pour les démasquer. Concernant la dilution au 1/5, 43% allo-anticorps ont été identifiés et 43% ont pu être suggérés. Dans 14% des cas, l'allo-anticorps identifié au 1/2 a été dilué au 1/5. Leger et Garratty<sup>112</sup> ont réalisé une étude similaire à celle-ci sur une cohorte d'échantillons contenant 26 allo-anticorps et dilués au 1/5. Ils ont montré que 19% des allo-anticorps présents étaient identifiables et 15% suggérés, ce qui est bien plus faible que les résultats obtenus dans ce travail. De plus, dans leur étude, 38% des allo-

anticorps étaient masqués par l'auto-anticorps et 27% des allo-anticorps n'étaient pas détectés, ce qui est également plus élevé que les résultats observés ici. Les variations entre ces deux études peuvent être liées au faible nombre d'échantillons traités ici.

Néanmoins, malgré le faible nombre d'échantillons traités, la dilution semble être une bonne alternative<sup>144</sup> à l'allo-adsorption en situation d'urgence, du fait de sa rapidité d'exécution. Si le laboratoire effectue des dilutions, des dilutions au 1/2 devraient être réalisées en parallèle des dilutions aux 1/5 afin de ne pas diluer un allo-anticorps d'une part et ne pas manquer un allo-anticorps masqué par l'auto-anticorps d'autre part.

De plus, chez un patient, un allo-anticorps (RH2 (C)) mis en évidence par la technique de dilution au 1/5 n'a pas été retrouvé lors de l'allo-adsorption. Cela est dû au fait que la cellule d'allo-adsorption utilisée possédait l'antigène RH2 (C) et a adsorbé l'allo-anticorps. En effet, le phénotype RH-KEL des cellules d'allo-adsorption utilisées n'est pas toujours le même que celui des patients compte tenu du respect du phénotype RH-KEL1 lors de transfusions sanguines, des allo-anticorps de ces deux systèmes peuvent donc être adsorbés. Ainsi, les techniques de dilutions sont une alternative à l'allo-adsorption pour démasquer des allo-anticorps dans ces deux systèmes.

Enfin, étant donné que les patients porteurs d'un auto-anticorps sont régulièrement transfusés, l'éluat a été étudié pour mettre en évidence des allo-anticorps de faible titre, présents à la surface d'hématies transfusées mais pas dans le plasma. Contrairement à l'équipe de Nathalang *et al.*<sup>146</sup> qui a pu identifier des allo-anticorps à partir de l'éluat de patients régulièrement transfusés, dans ce travail, hormis pour un patient, l'éluat, qu'il soit pur, traité au 1/2 ou au 1/5 n'a pas permis de révéler d'allo-anticorps à cause d'une pan-agglutination liée à l'auto-anticorps. Chez le patient pour lequel l'éluat a révélé un anti-JK1 (Jka), des allo-adsorptions avec des cellules JK-1 (Jka-) ont été réalisées à distance de la dernière transfusion. Ces allo-adsorptions n'ont pas révélées d'anticorps anti-JK1 (Jka). Cet anticorps est peut-être un auto-anticorps mimant un allo-anticorps.



## Conclusion

La prise en charge transfusionnelle des patients porteurs d'un auto-anticorps actif à +37°C est souvent un challenge pour le laboratoire d'immuno-hématologie. A l'heure actuelle, il n'existe pas de consensus sur la sélection de CGR à transfuser à des patients porteurs d'auto-anticorps. Afin de réévaluer les consignes transfusionnelles chez les patients auto-immunisés, une étude rétrospective a été réalisée sur une période de 7 ans au sein d'une cohorte de 319 patients pris en charge par l'EFS site Mondor (Créteil). Chez les patients porteurs d'un auto-anticorps et nécessitant une prise en charge transfusionnelle, le respect du phénotype RH-KEL1 peut expliquer leur basse fréquence d'allo-immunisation (12%) comparée aux données de la littérature (10-40%). Chez les patients auto-immunisés, l'harmonisation du recours aux CGR phénotypés RH-KEL1 semble être nécessaire pour maintenir un faible taux d'allo-immunisation. Par ailleurs, l'étude a mis en évidence que 20,83% des patients allo-immunisés se sont à nouveau immunisés à la suite d'une transfusion sanguine durant les 7 années de l'étude. Chez les patients porteurs d'un auto-anticorps, le risque de s'immuniser à nouveau est majoré par rapport à la population de patients régulièrement transfusés sans auto-anticorps. Cela semble être en lien avec les perturbations du système immunitaire de ces patients. Le cumul d'allo-anticorps risque de mener les patients auto-immunisés nécessitant des transfusions répétées à des impasses thérapeutiques. Compte tenu de ces éléments, il serait souhaitable que les patients porteurs d'un auto-anticorps et allo-immunisés soient transfusés avec des CGR compatibles dans leur phénotype étendu afin de limiter le risque d'allo-immunisations supplémentaires. Enfin, au cours de cette étude, aucun patient non préalablement allo-immunisé n'a développé d'allo-anticorps. Le terrain auto-immun ne semble donc pas être un facteur de risque de primo allo-immunisation anti-érythrocytaire.

Ensuite, une étude prospective a été réalisée sur une cohorte de 11 patients auto-immunisés afin d'évaluer leur prise en charge biologique. Tout d'abord, différentes techniques d'allo-adsorption ont été comparées. L'allo-adsorption en l'absence de PEG ou de LISS n'a pas montré de supériorité dans la mise en évidence d'un allo-anticorps par rapport aux techniques qui incluent le PEG ou le LISS ; cette technique est par ailleurs plus longue. Cette technique devrait être réservée aux seuls cas où la technique en PEG ou en LISS ne fonctionne pas. Les techniques en LISS et en PEG ont montré une efficacité similaire dans la mise en évidence d'un allo-anticorps. Ce travail n'a pas permis de déterminer quelle est la technique la plus rapide compte tenu du nombre minimal de cycles d'allo-adsorption plus important en PEG qu'en LISS. Afin d'actualiser les modes opératoires du laboratoire et d'harmoniser les pratiques au sein de

l'EFS Ile-de-France, il conviendra de réévaluer le nombre de cycles d'allo-adsorption nécessaire en PEG sur une cohorte de 30 patients au minimum.

De plus, ce travail a montré qu'il ne semble pas exister de corrélation entre le titre de l'auto-anticorps, l'intensité du TDA, l'intensité du TIA et le nombre de cycles d'adsorption nécessaires afin d'éliminer l'auto-anticorps. Néanmoins, lorsque le titre de l'auto-anticorps ne dépasse pas 1/16, deux cycles d'allo-adsorption semblent suffisants. Chez les patients dont le titre est supérieur à 1/16, le nombre de cycles nécessaires varie d'un patient à l'autre. L'étude d'une cohorte plus importante permettrait de confirmer que 2 cycles d'allo-adsorption sont suffisants en première intention ; réduisant ainsi le délai de rendu des résultats.

Par ailleurs, le titre de l'auto-anticorps pourrait être mis en relation avec la technique d'auto-adsorption. En effet, lorsque le titre d'un auto-anticorps est important, les sites antigéniques érythrocytaires *in vivo* sont saturés, ce qui laisse peu de place pour la fixation d'auto-anticorps supplémentaires *in vitro* lors de techniques d'auto-adsorptions. Etant donné que les réactifs permettant de décaper les GR autologues sont peu utilisés en routine, le titrage de l'auto-anticorps permettrait de déterminer un titre critique au-dessus duquel les techniques d'auto-adsorptions n'auraient aucune chance de fonctionner. En effet, à partir d'un certain seuil d'auto-anticorps fixés aux GR, les auto-anticorps du plasma ne peuvent pas être épurés par les GR autologues et risqueraient de donner des images d'allo-anticorps mimant un auto-anticorps. Ainsi, au-dessus d'un certain titre, des techniques d'allo-adsorptions pourraient être réalisées en première intention.

Pour finir, l'association des techniques de dilution au 1/2 et au 1/5 semble être une bonne alternative aux techniques d'allo-adsorption pour sécuriser la prise en charge en urgence des patients porteurs d'un auto-anticorps et allo-immunisés. L'étude doit être poursuivie sur une cohorte plus importante pour généraliser l'utilisation en routine des dilutions d'un auto-anticorps afin de détecter un allo-anticorps dans les situations d'urgence.

## Références bibliographiques

1. Mock, D. M. *et al.* Red blood cell (RBC) survival determined in humans using RBCs labeled at multiple biotin densities. *Transfusion (Paris)* **51**, 1047–1057 (2011).
2. Aladjidi, N. *et al.* Reliable assessment of the incidence of childhood autoimmune hemolytic anemia. *Pediatr. Blood Cancer* (2017). doi:10.1002/pbc.26683
3. Gehrs, B. C. & Friedberg, R. C. Autoimmune hemolytic anemia. *Am. J. Hematol.* **69**, 258–271 (2002).
4. Oliveira, J. B. *et al.* Revised diagnostic criteria and classification for the autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS): report from the 2009 NIH International Workshop. *Blood* **116**, e35-40 (2010).
5. Packman, C. H. Hemolytic anemia due to warm autoantibodies: new and traditional approaches to treatment. *Clin. Adv. Hematol. Oncol. HO* **6**, 739–741 (2008).
6. Aladjidi, N. *et al.* New insights into childhood autoimmune hemolytic anemia: a French national observational study of 265 children. *Haematologica* **96**, 655–663 (2011).
7. Genty, I. *et al.* [Characteristics of autoimmune hemolytic anemia in adults: retrospective analysis of 83 cases]. *Rev. Med. Interne* **23**, 901–909 (2002).
8. Michel, M. Classification and therapeutic approaches in autoimmune hemolytic anemia: an update. *Expert Rev. Hematol.* **4**, 607–618 (2011).
9. Bass, G. F., Tuscano, E. T. & Tuscano, J. M. Diagnosis and classification of autoimmune hemolytic anemia. *Autoimmun. Rev.* **13**, 560–564 (2014).
10. Dacie, S. J. The immune haemolytic anaemias: a century of exciting progress in understanding. *Br. J. Haematol.* **114**, 770–785 (2001).
11. Sokol, R. J., Hewitt, S. & Stamps, B. K. Autoimmune haemolysis: an 18-year study of 865 cases referred to a regional transfusion centre. *Br. Med. J. Clin. Res. Ed* **282**, 2023–2027 (1981).
12. Crowther, M. *et al.* Evidence-based focused review of the treatment of idiopathic warm immune hemolytic anemia in adults. *Blood* **118**, 4036–4040 (2011).
13. Lawrence Petz, George Garratty. *Immune Hemolytic Anemias - 2nd Edition.* (2003).
14. Arndt, P. A., Leger, R. M. & Garratty, G. Serologic findings in autoimmune hemolytic anemia associated with immunoglobulin M warm autoantibodies. *Transfusion (Paris)* **49**, 235–242 (2009).
15. Chadebech, P. *et al.* Clinical severity in adult warm autoimmune hemolytic anemia and its relationship to antibody specificity. *Haematologica* (2017). doi:10.3324/haematol.2017.175976
16. Solving cases in autoimmune haemolytic anaemia - Castilho - 2016 - ISBT Science Series - Wiley Online Library. Available at: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/voxs.12324/full>. (Accessed: 19th October 2017)

17. Tsuruta, R. *et al.* Corticosteroid therapy for hemolytic anemia and respiratory failure due to *Mycoplasma pneumoniae pneumoniae*. *Intern. Med. Tokyo Jpn.* **41**, 229–232 (2002).
18. Swiecicki, P. L., Hegerova, L. T. & Gertz, M. A. Cold agglutinin disease. *Blood* **122**, 1114–1121 (2013).
19. Berentsen, S. *et al.* Primary chronic cold agglutinin disease: a population based clinical study of 86 patients. *Haematologica* **91**, 460–466 (2006).
20. Eder, A. F. Review: acute Donath-Landsteiner hemolytic anemia. *Immunohematology* **21**, 56–62 (2005).
21. Sokol, R. J., Hewitt, S. & Stamps, B. K. Autoimmune hemolysis: mixed warm and cold antibody type. *Acta Haematol.* **69**, 266–274 (1983).
22. Heddle, N. M. Acute paroxysmal cold hemoglobinuria. *Transfus. Med. Rev.* **3**, 219–229 (1989).
23. Wolach, B. *et al.* Transient Donath-Landsteiner haemolytic anaemia. *Br. J. Haematol.* **48**, 425–434 (1981).
24. Mayer, B., Yürek, S., Kiesewetter, H. & Salama, A. Mixed-type autoimmune hemolytic anemia: differential diagnosis and a critical review of reported cases. *Transfusion (Paris)* **48**, 2229–2234 (2008).
25. Shulman, I. A. *et al.* Autoimmune hemolytic anemia with both cold and warm autoantibodies. *JAMA* **253**, 1746–1748 (1985).
26. Arndt, P. A. Drug-induced immune hemolytic anemia: the last 30 years of changes. *Immunohematology* **30**, 44–54 (2014).
27. Leger, R. M., Arndt, P. A. & Garratty, G. How we investigate drug-induced immune hemolytic anemia. *Immunohematology* **30**, 85–94 (2014).
28. Garratty, G. & Arndt, P. A. Drugs that have been shown to cause drug-induced immune hemolytic anemia or positive direct antiglobulin tests: some interesting findings since 2007. *Immunohematology* **30**, 66–79 (2014).
29. Ahrens, N., Pruss, A., Kähne, A., Kiesewetter, H. & Salama, A. Coexistence of autoantibodies and alloantibodies to red blood cells due to blood transfusion. *Transfusion (Paris)* **47**, 813–816 (2007).
30. Young, P. P., Uzieblo, A., Trulock, E., Lublin, D. M. & Goodnough, L. T. Autoantibody formation after alloimmunization: are blood transfusions a risk factor for autoimmune hemolytic anemia? *Transfusion (Paris)* **44**, 67–72 (2004).
31. Singer, S. T. *et al.* Alloimmunization and erythrocyte autoimmunization in transfusion-dependent thalassemia patients of predominantly asian descent. *Blood* **96**, 3369–3373 (2000).
32. Garratty, G. Autoantibodies induced by blood transfusion. *Transfusion (Paris)* **44**, 5–9 (2004).
33. Cox, K. O. & Howles, A. Induction and regulation of autoimmune hemolytic anemia in mice. *Immunol. Rev.* **55**, 31–53 (1981).
34. Semple, J. W. & Freedman, J. Autoimmune pathogenesis and autoimmune hemolytic anemia. *Semin. Hematol.* **42**, 122–130 (2005).

35. Alenzi, F. Q. B. Autoimmune haemolytic anaemia is associated with a defect in Fas-mediated apoptosis: a case report. *Br. J. Biomed. Sci.* **61**, 96–98 (2004).
36. Fagiolo, E. & Toriani-Terenzi, C. Th1 and Th2 cytokine modulation by IL-10/IL-12 imbalance in autoimmune haemolytic anaemia (AIHA). *Autoimmunity* **35**, 39–44 (2002).
37. Fagiolo, E. & Toriani-Terenzi, C. Mechanisms of immunological tolerance loss versus erythrocyte self-antigens and autoimmune hemolytic anemia. *Autoimmunity* **36**, 199–204 (2003).
38. Mqadmi, A., Zheng, X. & Yazdanbakhsh, K. CD4+CD25+ regulatory T cells control induction of autoimmune hemolytic anemia. *Blood* **105**, 3746–3748 (2005).
39. Lanzavecchia, A. How can cryptic epitopes trigger autoimmunity? *J. Exp. Med.* **181**, 1945–1948 (1995).
40. Nomura, S., Okamae, F., Matsuzaki, T., Ishida, T. & Fukuhara, S. Autoimmune hemolytic anemia and HLA-DQ6. *Autoimmunity* **28**, 57–58 (1998).
41. Gilsanz, F., De La Serna, J., Moltó, L. & Alvarez-Mon, M. Hemolytic anemia in chronic large granular lymphocytic leukemia of natural killer cells: cytotoxicity of natural killer cells against autologous red cells is associated with hemolysis. *Transfusion (Paris)* **36**, 463–466 (1996).
42. Kurlander, R. J., Rosse, W. F. & Logue, G. L. Quantitative influence of antibody and complement coating of red cells on monocyte-mediated cell lysis. *J. Clin. Invest.* **61**, 1309–1319 (1978).
43. DAT IgG Dilution Diamed Gmbh Cresier FR Switzerland.
44. Barcellini, W. New Insights in the Pathogenesis of Autoimmune Hemolytic Anemia. *Transfus. Med. Hemotherapy Off. Organ Dtsch. Ges. Transfusionsmedizin Immunhamatologie* **42**, 287–293 (2015).
45. Conley, C. L. *et al.* Autoimmune hemolytic anemia with reticulocytopenia and erythroid marrow. *N. Engl. J. Med.* **306**, 281–286 (1982).
46. Habibi, B. Drug induced red blood cell autoantibodies co-developed with drug specific antibodies causing haemolytic anaemias. *Br. J. Haematol.* **61**, 139–143 (1985).
47. Garratty, G., Arndt, P., Prince, H. E. & Shulman, I. A. The effect of methyldopa and procainamide on suppressor cell activity in relation to red cell autoantibody production. *Br. J. Haematol.* **84**, 310–315 (1993).
48. Kirtland, H. H., Mohler, D. N. & Horwitz, D. A. Methyldopa inhibition of suppressor-lymphocyte function: a proposed cause of autoimmune hemolytic anemia. *N. Engl. J. Med.* **302**, 825–832 (1980).
49. Arndt, P. A. & Garratty, G. The changing spectrum of drug-induced immune hemolytic anemia. *Semin. Hematol.* **42**, 137–144 (2005).
50. Stahl, D., Lacroix-Desmazes, S., Sibrowski, W., Kazatchkine, M. D. & Kaveri, S. V. Red blood cell transfusions are associated with alterations in self-reactive antibody repertoires of plasma IgM and IgG, independent of the presence of a specific immune response toward RBC antigens. *Clin. Immunol. Orlando Fla* **105**, 25–35 (2002).

51. Castellino, S. M., Combs, M. R., Zimmerman, S. A., Issitt, P. D. & Ware, R. E. Erythrocyte autoantibodies in paediatric patients with sickle cell disease receiving transfusion therapy: frequency, characteristics and significance. *Br. J. Haematol.* **104**, 189–194 (1999).
52. Domen, R. E. Warm red blood cell autoantibodies and the direct antiglobulin test revisited. *Am. J. Clin. Pathol.* **122**, 673–674 (2004).
53. Zantek, N. D., Koepsell, S. A., Tharp, D. R. & Cohn, C. S. The direct antiglobulin test: a critical step in the evaluation of hemolysis. *Am. J. Hematol.* **87**, 707–709 (2012).
54. Garratty, G. The significance of IgG on the red cell surface. *Transfus. Med. Rev.* **1**, 47–57 (1987).
55. Bencomo, A. A., Diaz, M., Alfonso, Y., Valdés, O. & Alfonso, M. E. Quantitation of red cell-bound IgG, IgA, and IgM in patients with autoimmune hemolytic anemia and blood donors by enzyme-linked immunosorbent assay. *Immunohematology* **19**, 47–53 (2003).
56. Johnston, M. F. & Belota, M. K. Determination of need for elution studies for positive direct antiglobulin tests in pretransfusion testing. *Am. J. Clin. Pathol.* **90**, 58–62 (1988).
57. Dittmar, K. *et al.* Comparison of DATs using traditional tube agglutination to gel column and affinity column procedures. *Transfusion (Paris)* **41**, 1258–1262 (2001).
58. Bardill, B., Mengis, C., Tschopp, M. & Wuillemin, W. A. Severe IgA-mediated auto-immune haemolytic anaemia in a 48-yr-old woman. *Eur. J. Haematol.* **70**, 60–63 (2003).
59. Fabijańska-Mitek, J., Lopińska, H. & Zupańska, B. Gel test application for IgG subclass detection in auto-immune haemolytic anaemia. *Vox Sang.* **72**, 233–237 (1997).
60. Bodensteiner, D., Brown, P., Skikne, B. & Plapp, F. The enzyme-linked immunosorbent assay: accurate detection of red blood cell antibodies in autoimmune hemolytic anemia. *Am. J. Clin. Pathol.* **79**, 182–185 (1983).
61. Kamesaki, T. Progress in diagnosis and treatment of autoimmune hemolytic disorders. *Rinsho Ketsueki* **58**, 329–335 (2017).
62. Thedsawad, A., Taka, O. & Wanachiwanawin, W. Development of flow cytometry for detection and quantitation of red cell bound immunoglobulin G in autoimmune hemolytic anemia with negative direct Coombs test. *Asian Pac. J. Allergy Immunol.* **29**, 364–367 (2011).
63. Fayek, M. H., Saad, A. A., Eissa, D. G., Tawfik, L. M. & Kamal, G. Role of gel test and flow cytometry in diagnosis of Coombs' negative autoimmune haemolytic anaemia. *Int. J. Lab. Hematol.* **34**, 311–319 (2012).
64. Chaudhary, R., Das, S. S., Gupta, R. & Khetan, D. Application of flow cytometry in detection of red-cell-bound IgG in Coombs-negative AIHA. *Hematol. Amst. Neth.* **11**, 295–300 (2006).
65. Park, S. H., Choe, W.-H. & Kwon, S.-W. Red Blood Cell Transfusion in Patients With Autoantibodies: Is It Effective and Safe Without Increasing Hemolysis Risk? *Ann. Lab. Med.* **35**, 436–444 (2015).
66. Wheeler, C. A., Calhoun, L. & Blackall, D. P. Warm reactive autoantibodies: clinical and serologic correlations. *Am. J. Clin. Pathol.* **122**, 680–685 (2004).

67. Goldberg, L. S. & Fudenberg, H. H. Warm antibody hemolytic anemia; prolonged remission despite persistent positive Coombs test. *Vox Sang.* **15**, 443–445 (1968).
68. Chaplin, H. Red cell-bound immunoglobulin as a predictor of severity of hemolysis in patients with autoimmune hemolytic anemia. *Transfusion (Paris)* **30**, 576–578 (1990).
69. Worlledge, S. M. The interpretation of a positive direct antiglobulin test. *Br. J. Haematol.* **39**, 157–162 (1978).
70. Gorst, D. W., Rawlinson, V. I., Merry, A. H. & Stratton, F. Positive direct antiglobulin test in normal individuals. *Vox Sang.* **38**, 99–105 (1980).
71. Bareford, D., Longster, G., Gilks, L. & Tovey, L. A. Follow-up of normal individuals with a positive antiglobulin test. *Scand. J. Haematol.* **35**, 348–353 (1985).
72. Toy, P. T., Chin, C. A., Reid, M. E. & Burns, M. A. Factors associated with positive direct antiglobulin tests in pretransfusion patients: a case-control study. *Vox Sang.* **49**, 215–220 (1985).
73. Rottenberg, Y. *et al.* Blood donors with positive direct antiglobulin tests are at increased risk for cancer. *Transfusion (Paris)* **49**, 838–842 (2009).
74. Segel, G. B. & Lichtman, M. A. Direct antiglobulin (‘Coombs’) test-negative autoimmune hemolytic anemia: a review. *Blood Cells. Mol. Dis.* **52**, 152–160 (2014).
75. Kamesaki, T., Toyotsuji, T. & Kajii, E. Characterization of direct antiglobulin test-negative autoimmune hemolytic anemia: a study of 154 cases. *Am. J. Hematol.* **88**, 93–96 (2013).
76. Jefferies, L. C. Transfusion therapy in autoimmune hemolytic anemia. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* **8**, 1087–1104 (1994).
77. Wilen, C. B. *et al.* Using direct antiglobulin test results to reduce unnecessary cold agglutinin testing. *Transfusion (Paris)* **57**, 1480–1484 (2017).
78. Stec, N., Shirey, R. S., Smith, B., Kickler, T. S. & Ness, P. M. The efficacy of performing red cell elution studies in the pretransfusion testing of patients with positive direct antiglobulin tests. *Transfusion (Paris)* **26**, 225–226 (1986).
79. Bell, C. A., Zwicker, H. & Sacks, H. J. Autoimmune hemolytic anemia: routine serologic evaluation in a general hospital population. *Am. J. Clin. Pathol.* **60**, 903–911 (1973).
80. Gologan, R. & Berceanu, S. Serologic diagnosis in the differentiation of autoimmune hemolytic anemias. *Med. Interne* **17**, 191–196 (1979).
81. Wikman, A. *et al.* Characterization of red cell autoantibodies in consecutive DAT-positive patients with relation to in vivo haemolysis. *Ann. Hematol.* **84**, 150–158 (2005).
82. Lechner, K. & Jäger, U. How I treat autoimmune hemolytic anemias in adults. *Blood* **116**, 1831–1838 (2010).
83. Howard, J., Hoffbrand, A. V., Prentice, H. G. & Mehta, A. Mycophenolate mofetil for the treatment of refractory auto-immune haemolytic anaemia and auto-immune thrombocytopenia purpura. *Br. J. Haematol.* **117**, 712–715 (2002).

84. Moyo, V. M. *et al.* High-dose cyclophosphamide for refractory autoimmune hemolytic anemia. *Blood* **100**, 704–706 (2002).
85. Michel, M. *et al.* A randomized and double-blind controlled trial evaluating the safety and efficacy of rituximab for warm auto-immune hemolytic anemia in adults (the RAIHA study). *Am. J. Hematol.* **92**, 23–27 (2017).
86. Dierickx, D. *et al.* Rituximab in auto-immune haemolytic anaemia and immune thrombocytopenic purpura: a Belgian retrospective multicentric study. *J. Intern. Med.* **266**, 484–491 (2009).
87. Gea-Banacloche, J. C. Rituximab-associated infections. *Semin. Hematol.* **47**, 187–198 (2010).
88. Coon, W. W. Splenectomy in the treatment of hemolytic anemia. *Arch. Surg. Chic. Ill 1960* **120**, 625–628 (1985).
89. Pignon, J. M., Poirson, E. & Rochant, H. Danazol in autoimmune haemolytic anaemia. *Br. J. Haematol.* **83**, 343–345 (1993).
90. Mueller-Eckhardt, C. *et al.* Lack of efficacy of high-dose intravenous immunoglobulin in autoimmune haemolytic anaemia: a clue to its mechanism. *Scand. J. Haematol.* **34**, 394–400 (1985).
91. Salama, A., Berghöfer, H. & Mueller-Eckhardt, C. Red blood cell transfusion in warm-type autoimmune haemolytic anaemia. *Lancet Lond. Engl.* **340**, 1515–1517 (1992).
92. Berentsen, S. *et al.* Rituximab for primary chronic cold agglutinin disease: a prospective study of 37 courses of therapy in 27 patients. *Blood* **103**, 2925–2928 (2004).
93. Ries, C. A., Garratty, G., Petz, L. D. & Fudenberg, H. H. Paroxysmal cold hemoglobinuria: report of a case with an exceptionally high thermal range Donath-Landsteiner antibody. *Blood* **38**, 491–499 (1971).
94. Rosenfield, R. E. & Jagathambal, null. Transfusion therapy for autoimmune hemolytic anemia. *Semin. Hematol.* **13**, 311–321 (1976).
95. Petz, L. D. A physician's guide to transfusion in autoimmune haemolytic anaemia. *Br. J. Haematol.* **124**, 712–716 (2004).
96. Schäppi, M. G. *et al.* Severe autoimmune hemolytic anemia in a liver transplanted child. *Pediatr. Transplant.* **12**, 809–812 (2008).
97. van der Meulen, F. W. *et al.* The role of adherence to human mononuclear phagocytes in the destruction of red cells sensitized with non-complement binding IgG antibodies. *Br. J. Haematol.* **38**, 541–549 (1978).
98. Sabio, H., Jones, D. & McKie, V. C. Biphasic hemolysin hemolytic anemia: reappraisal of an acute immune hemolytic anemia of infancy and childhood. *Am. J. Hematol.* **39**, 220–222 (1992).
99. Rausen, A. R., LeVine, R., Hsu, T. C. & Rosenfield, R. E. Compatible transfusion therapy for paroxysmal cold hemoglobinuria. *Pediatrics* **55**, 275–278 (1975).



100. Hoyer, K. K., Wolslegel, K., Dooms, H. & Abbas, A. K. Targeting T cell-specific costimulators and growth factors in a model of autoimmune hemolytic anemia. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **179**, 2844–2850 (2007).
101. Branch, D. R. & Petz, L. D. Detecting alloantibodies in patients with autoantibodies. *Transfusion (Paris)* **39**, 6–10 (1999).
102. Applied Blood Group Serology by Peter D. Issitt, David J., Ph.D. Anstee: Montgomery Scientific Pubns 9780935643053 Hardcover, 4 Sub. - Ergodebooks.
103. Orlina, A. R., Unger, P. J. & Koshy, M. Post-transfusion alloimmunization in patients with sickle cell disease. *Am. J. Hematol.* **5**, 101–106 (1978).
104. Coles, S. M., Klein, H. G. & Holland, P. V. Alloimmunization in two multitransfused patient populations. *Transfusion (Paris)* **21**, 462–466 (1981).
105. Yazdanbakhsh, K., Ware, R. E. & Noizat-Pirenne, F. Red blood cell alloimmunization in sickle cell disease: pathophysiology, risk factors, and transfusion management. *Blood* **120**, 528–537 (2012).
106. Morel PA, Bergen MO, Frank BA. A simple method for the detection of alloantibody in the presence of warm autoantibody. *Transfusion* (1978).
107. Branch, D. R. & Petz, L. D. A new reagent (ZZAP) having multiple applications in immunohematology. *Am. J. Clin. Pathol.* **78**, 161–167 (1982).
108. Wallhermfechtel, M. A., Pohl, B. A. & Chaplin, H. Alloimmunization in patients with warm autoantibodies. A retrospective study employing three donor alloabsorptions to aid in antibody detection. *Transfusion (Paris)* **24**, 482–485 (1984).
109. Laine, M. L. & Beattie, K. M. Frequency of alloantibodies accompanying autoantibodies. *Transfusion (Paris)* **25**, 545–546 (1985).
110. James, P., Rowe, G. P. & Tozzo, G. G. Elucidation of alloantibodies in autoimmune haemolytic anaemia. *Vox Sang.* **54**, 167–171 (1988).
111. Issitt, P. D. *et al.* Studies of antibodies in the sera of patients who have made red cell autoantibodies. *Transfusion (Paris)* **36**, 481–486 (1996).
112. Leger, R. M. & Garratty, G. Evaluation of methods for detecting alloantibodies underlying warm autoantibodies. *Transfusion (Paris)* **39**, 11–16 (1999).
113. So, C. C., Wong, K. F., Yu, P. H., Kwan, A. M. & Lee, A. W. Alloimmunization in Chinese with warm autoimmune haemolytic anaemia - incidence and characteristics. *Transfus. Med. Oxf. Engl.* **10**, 141–143 (2000).
114. Yürek, S., Mayer, B., Almahallawi, M., Pruss, A. & Salama, A. Precautions surrounding blood transfusion in autoimmune haemolytic anaemias are overestimated. *Blood Transfus. Trasfus. Sangue* **13**, 616–621 (2015).

115. Maley, M., Bruce, D. G., Babb, R. G., Wells, A. W. & Williams, M. The incidence of red cell alloantibodies underlying panreactive warm autoantibodies. *Immunohematology* **21**, 122–125 (2005).
116. Sokol, R. J., Hewitt, S., Booker, D. J. & Morris, B. M. Patients with red cell autoantibodies: selection of blood for transfusion. *Clin. Lab. Haematol.* **10**, 257–264 (1988).
117. Böttiger, L. E. & Westerholm, B. Acquired haemolytic anaemia. I. Incidence and aetiology. *Acta Med. Scand.* **193**, 223–226 (1973).
118. Pirofsky, B. *Autoimmunization and the autoimmune hemolytic anemias*. (Williams & Wilkins, 1969).
119. Arrêté du 26 avril 2002 modifiant l'arrêté du 26 novembre 1999 relatif à la bonne exécution des analyses de biologie médicale | Legifrance. Available at: <https://www.legifrance.gouv.fr/eli/arrete/2002/4/26/SANP0221588A/jo>. (Accessed: 18th January 2018)
120. Petz, L. D. Red cell transfusion problems in immunohematologic disease. *Annu. Rev. Med.* **33**, 355–361 (1982).
121. Ziman, A. *et al.* Warm-reactive (immunoglobulin G) autoantibodies and laboratory testing best practices: review of the literature and survey of current practice. *Transfusion (Paris)* **57**, 463–477 (2017).
122. Katharia, R. & Chaudhary, R. K. Removal of antibodies from red cells: Comparison of three elution methods. *Asian J. Transfus. Sci.* **7**, 29–32 (2013).
123. Edwards, J. M., Moulds, J. J. & Judd, W. J. Chloroquine dissociation of antigen-antibody complexes. A new technique for typing red blood cells with a positive direct antiglobulin test. *Transfusion (Paris)* **22**, 59–61 (1982).
124. Hanfland, P. A simple method for the rapid and selective absorption of warm-reactive erythrocyte autoantibodies from serum. *Vox Sang.* **43**, 310–320 (1982).
125. Cheng, C. K., Wong, M. L. & Lee, A. W. PEG adsorption of autoantibodies and detection of alloantibodies in warm autoimmune hemolytic anemia. *Transfusion (Paris)* **41**, 13–17 (2001).
126. Das, S. S. & Chaudhary, R. Utility of adsorption techniques in serological evaluation of warm autoimmune haemolytic anaemia. *Blood Transfus. Trsfus. Sangue* **7**, 300–304 (2009).
127. Cid, J. *et al.* Use of polyethylene glycol for performing autologous adsorptions. *Transfusion (Paris)* **45**, 694–697 (2005).
128. Chiaroni, J., Touinssi, M., Mazet, M., De Micco, P. & Ferrera, V. Adsorption of autoantibodies in the presence of LISS to detect alloantibodies underlying warm autoantibodies. *Transfusion (Paris)* **43**, 651–655 (2003).
129. Champagne, K. & Moulds, M. K. Autoadsorptions for the detection of alloantibodies--should polyethylene glycol be used? *Transfusion (Paris)* **36**, 384 (1996).

130. Barron, C. L. & Brown, M. B. The use of polyethylene glycol (PEG) to enhance the adsorption of autoantibodies. *Immunohematology* **13**, 119–122 (1997).
131. Judd, W. J. & Dake, L. PEG adsorption of autoantibodies causes loss of concomitant alloantibody. *Immunohematology* **17**, 82–85 (2001).
132. Leger, R. M., Ciesielski, D. & Garratty, G. Effect of storage on antibody reactivity after adsorption in the presence of polyethylene glycol. *Transfusion (Paris)* **39**, 1272–1273 (1999).
133. Laine, E. P. *et al.* In vitro studies of the impact of transfusion on the detection of alloantibodies after autoadsorption. *Transfusion (Paris)* **40**, 1384–1387 (2000).
134. Mollison's blood transfusion in clinical medicine. - NLM Catalog - NCBI. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nlmcatalog/?term=Mollison%27s%20blood%20transfusion%20in%20clinical%20medicine%5BTtitle%5D>. (Accessed: 11th October 2017)
135. La transfusion dans les anémies hémolytiques auto-immunes.
136. Issitt, P. D. & Pavone, B. G. Critical re-examination of the specificity of auto-anti-Rh antibodies in patients with a positive direct antiglobulin test. *Br. J. Haematol.* **38**, 63–74 (1978).
137. Garratty, G., Sattler, M. S., Petz, L. D. & Flannery, E. P. Immune hemolytic anemia associated with anti-Kell and a carrier state for chronic granulomatous disease. *Rev. Fr. Transfus. Immunohematol.* **22**, 529–549 (1979).
138. Ellisor, S. S. *et al.* Autoantibodies mimicking anti-Jkb plus anti-Jk3 associated with autoimmune hemolytic anemia in a primipara who delivered an unaffected infant. *Vox Sang.* **45**, 53–59 (1983).
139. Manny, N. *et al.* Autoimmunity and the Kell blood groups: auto-anti-Kpb in a Kp(a+b-) patient. *Vox Sang.* **45**, 252–256 (1983).
140. van 't Veer, M. B. *et al.* Red-cell auto-antibodies mimicking anti-Fyb specificity. *Vox Sang.* **47**, 88–91 (1984).
141. Harris, T. Two cases of autoantibodies that demonstrate mimicking specificity in the Duffy blood group system. *Immunohematology* **6**, 87–91 (1990).
142. Reisner, R., Butler, G., Bundy, K. & Moore, S. B. Comparison of the polyethylene glycol antiglobulin test and the use of enzymes in antibody detection and identification. *Transfusion (Paris)* **36**, 487–489 (1996).
143. Dara, R. C. *et al.* Alloimmunization in autoimmune hemolytic anemia patient: The differential adsorption approach. *Asian J. Transfus. Sci.* **11**, 53–57 (2017).
144. Øyen, R. & Angeles, M. L. A simple screening method to evaluate the presence of alloantibodies with concomitant warm autoantibodies. *Immunohematology* **11**, 85–87 (1995).
145. Engelfriet, C. P. *et al.* The detection of alloantibodies against red cells in patients with warm-type autoimmune haemolytic anaemia. *Vox Sang.* **78**, 200–207 (2000).
146. Nathalang, O., Sriwanitchrak, P., Tubrod, J. & Kupatawintu, P. Antibody elutions in Thai patients with a positive direct antiglobulin test. *Blood Transfus. Trasfus. Sangue* **9**, 306–310 (2011).

147. transfusion\_de\_globules\_rouges\_homologues\_-\_produits\_indications\_alternatives\_-\_recommandations.pdf.
148. Shirey, R. S. *et al.* Prophylactic antigen-matched donor blood for patients with warm autoantibodies: an algorithm for transfusion management. *Transfusion (Paris)* **42**, 1435–1441 (2002).
149. Burin des Roziers, N. & Squalli, S. Removing IgG antibodies from intact red cells: comparison of acid and EDTA, heat, and chloroquine elution methods. *Transfusion (Paris)* **37**, 497–501 (1997).
150. Griffin, G. D. *et al.* A flow cytometric method for phenotyping recipient red cells following transfusion. *Transfusion (Paris)* **34**, 233–237 (1994).
151. Lomas-Francis, C. & DePalma, H. DNA-based assays for patient testing: their application, interpretation, and correlation of results. *Immunohematology* **24**, 180–190 (2008).
152. El Kenz, H. *et al.* Transfusion support of autoimmune hemolytic anemia: how could the blood group genotyping help? *Transl. Res. J. Lab. Clin. Med.* **163**, 36–42 (2014).
153. Powerful tools for resolving antibody problems - Hamilton - 2016 - ISBT Science Series - Wiley Online Library. Available at: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/voxs.12218/abstract>. (Accessed: 23rd October 2017)
154. Bhuva, D. K. & Vachhani, J. H. Red cell alloimmunization in repeatedly transfused patients. *Asian J. Transfus. Sci.* **11**, 115–120 (2017).

## SERMENT DE GALIEN

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

D'exercer dans l'intérêt de la Santé publique ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur mais aussi les règles de l'Honneur, de la Probité et du Désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine.

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

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

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

Que je sois méprisé de mes Confrères si je manque à mes engagements.



COOMBS Justine

**Etude rétrospective (2010-2017) de l'allo-immunisation chez 319 patients auto-immunisés. Apport et efficacité de l'allo-adsorption et des techniques complémentaires en immuno-hématologie.**

Th. D. Pharm., 16 avril 2018, 73 p.

Composition du Jury : Pr F. Pirenne, Pr L. Favennec, Pr Y. Benhamou, Dr B. Chami, Dr S. Daliphard

---

**RESUME**

L'anémie hémolytique auto-immune entraîne une destruction accélérée des globules rouges par un mécanisme immunologique. Chez les patients dont l'hémolyse est sévère, des transfusions sanguines permettent de compenser l'anémie. Chez ces patients, une étude rétrospective a été réalisée sur une cohorte de 319 patients pris en charge par l'EFS site Mondor (Créteil) pour déterminer leur fréquence d'allo-immunisation. Le faible taux d'allo-immunisation observé (12%) par rapport aux données de la littérature (10-40%) suggère de généraliser l'utilisation de CGR phénotypés RH-KEL1 pour les patients auto-immunisés. Les patients préalablement allo-immunisés ont plus de risques de s'immuniser de nouveau (21%) et devraient être transfusés dans leur phénotype étendu afin de limiter les impasses thérapeutiques. Le terrain auto-immun ne semble pas être un facteur de risque de primo allo-immunisation anti-érythrocytaire.

La prise en charge d'échantillons de patients auto-immunisés est souvent un challenge technique pour le laboratoire d'immuno-hématologie. Une étude prospective permettant de comparer la rapidité et l'efficacité des techniques employées pour sécuriser la transfusion sanguine a été réalisée sur une cohorte de 11 patients auto-immunisés. Les allo-adsorptions en présence de LISS et de PEG sont les plus efficaces pour détecter un allo-anticorps masqué par un auto-anticorps. Deux cycles d'allo-adsorption permettent d'éliminer la majorité des auto-anticorps. Dans les situations d'urgence, l'association de dilutions au 1/2 et au 1/5 est une bonne alternative aux allo-adsorptions pour sécuriser la prise en charge transfusionnelle des patients auto-immunisés.

---

**MOTS CLES**

AHAI – Fréquence d'allo-immunisation – Auto-anticorps – Allo-anticorps – Adsorptions