

DIAGNOSTIC IMMUNO-HEMATOLOGIQUE DES ANEMIES HEMOLYTIQUES AUTO-IMMUNES IMMUNOHEMATOLOGICAL DIAGNOSIS OF AUTOIMMUNE HEMOLYTIC ANEMIA

I. BEN AMOR^{1,2} ; I. DIMASSI^{1,2} ; W.BETBOUT^{1,2} ET J.GARGOURI^{1,2}

1 : Centre Régional de Transfusion Sanguine de Sfax

2 : Faculté de médecine, Université de Sfax-Tunisie

*e-mail de l'auteur correspondant : ikrambenamor.hemato@gmail.com

Résumé

Le diagnostic des anémies hémolytiques auto-immunes est un diagnostic clinico-biologique. Le test direct à l'antiglobuline (TDA) est la pierre angulaire de l'enquête étiologique d'une anémie hémolytique. Il permet de caractériser le mécanisme de l'hémolyse: immunologique ou non immunologique. Une attention particulière doit être apportée à l'interprétation des résultats du TDA. Nous ferons la synthèse du diagnostic immuno-hématologique à entreprendre devant la suspicion d'une AHAI. Cette exploration biologique répond à un triple objectif : établir le diagnostic et le type du conflit auto-immun, détecter les facteurs prédictifs de sévérité et garantir la sécurité transfusionnelle. Nous proposerons à la fin un algorithme du diagnostic immunohématologique des AHAI.

Mots-clés : Anémie ; Hémolyse ; Antiglobuline ; Autoanticorps

Abstract

Immuno-hematological diagnosis of autoimmune anemia is a clinic biological diagnosis. The direct antiglobulin test (DAT) is the cornerstone of the etiological investigation of hemolytic anemia. It allows the characterization of the hemolysis's mechanism: immunological or non-immunological. Special attention should be paid to the interpretation of the results of TDA. We will synthesize the immuno-hematological diagnosis to be undertaken if AHAI is suspected. This biological exploration has a triple objective: to establish the diagnosis and the type of autoimmune conflict, to detect predictive factors of severity and to guarantee transfusion safety. We will propose at the end an algorithm of immuno-hematological diagnosis of AHAI.

Keywords: Anemia; Hemolysis; Antiglobuline; Autoantibody

ملخص

تشخيص فقر الدم الانحلالي المناعي الذاتي هو تشخيص سريري بيولوجي. اختبار مضاد الغلوبولين المباشر (ADT) هو حجر الزاوية في التحقيق المسبب لفقر الدم الانحلالي و هو مما يجعل من الممكن وصف آلية انحلال الدم من النوعين المناعي أو غير المناعي. يجب إيلاء اهتمام خاص لتفسير نتائج TDA. سنقوم بتجميع التشخيص المناعي الدموي الذي يجب إجراؤه قبل الاشتباه في الإصابة بفقر الدم الانحلالي المناعي الذاتي: AHAI. هذا الاستكشاف البيولوجي له هدف ثلاثي الأبعاد: تأسيس التشخيص ونوع تعارض المناعة الذاتية للكشف عن العوامل التنبؤية للشدة وضمان سلامة نقل الدم. سنقترح في النهاية خوارزمية للتشخيص المناعي لـ AHAI.

الكلمات المفاتيح : فقر الدم ; انحلال الدم ; الجلوبيولين ; الأجسام المضادة.

1. Introduction

Les anémies hémolytiques auto-immunes font partie des anémies hémolytiques acquises d'origine extra-corpusculaire. Elles sont liées à la destruction accrue des hématies autologues par des autoanticorps dirigés contre des antigènes de la membrane érythrocytaire [1-3]. Ces autoanticorps sont produits par les lymphocytes B auto-réactifs suite à la rupture de la tolérance immune. Bien que les AHAI soient les plus fréquentes des anémies hémolytiques acquises, elles restent un événement rare comparativement à d'autres maladies auto-immunes puisque leur incidence annuelle est estimée entre 1 à 4 pour 100 000. Elles peuvent survenir à tout âge de la vie avec une discrète prédominance féminine [4,5].

La grande variabilité des AHAI se traduit par les nombreuses classifications proposées en fonction de critères immunologiques, étiologiques ou évolutifs. En pratique courante, la connaissance des caractéristiques des autoanticorps responsables a une valeur pronostique et permet d'orienter le traitement. Le laboratoire d'immunohématologie est donc un support indispensable à la décision et au suivi thérapeutique. On distingue les AHAI à autoanticorps chauds, les AHAI à autoanticorps froids, les AHAI mixtes et l'hémoglobinurie paroxystique à frigore.

Le diagnostic biologique des AHAI a largement bénéficié des progrès accomplis dans le domaine de l'immunohématologie érythrocytaire, marqués essentiellement par une optimisation des méthodes de détection des autoanticorps et par l'apparition des anticorps monoclonaux.

Après une première partie consacrée à la classification immunochimique des AHAI, nous ferons la synthèse du diagnostic immunohématologique à entreprendre devant la suspicion d'une AHAI. Cette exploration biologique répond à un triple objectif : établir le diagnostic et le type du conflit auto-immun, détecter les facteurs prédictifs de sévérité et garantir la sécurité transfusionnelle. Nous proposerons à la fin un algorithme du diagnostic immunohématologique des AHAI. Nous n'aborderons pas, dans cette revue générale, les examens complémentaires à entreprendre pour la recherche d'une cause sous-jacente.

2. Classification immunologique des AHAI

La diversité clinique des AHAI est expliquée par la diversité biologique des autoanticorps anti-érythrocytaire. Ainsi, les AHAI sont classées selon

les caractéristiques de l'auto-anticorps en cause : cible antigénique, optimum thermique, classe immunochimique, conditions de fixation et caractère hémolysant. Cette classification revêt un intérêt clinico-biologique, pronostique et thérapeutique [6].

Les autoanticorps sont ainsi qualifiés de « chauds » lorsqu'ils exercent leur activité hémolytique maximale (optimum thermique) à des températures comprises entre 35°C et 40°C, et de « froids » lorsqu'ils sont actifs à des températures inférieures à 30°C (optimum thermique se situant habituellement à 4°C).

Les autoanticorps chauds, qui sont responsables de 60 à 80% de l'ensemble des AHAI [5], sont le plus souvent d'isotype IgG et sont dirigés contre un ou plusieurs antigènes du système Rhésus [7]. L'hémolyse est essentiellement de type intratissulaire et de siège principalement splénique. A l'inverse, les autoanticorps froids, encore appelés agglutinines froides, sont presque toujours de type IgM et ciblent principalement l'antigène I ou i à la surface des hématies. Les agglutinines froides, par leur structure pentamérique, fixent et activent le complément et entraînent une hémolyse intravasculaire ou une lyse des hématies de siège essentiellement hépatique, par le biais des macrophages exprimant le récepteur du C3d [8]. Sur le plan clinique, les AHAI à autoanticorps froids comprennent la forme chronique appelée la maladie chronique des agglutinines froides (MCAF) et les formes transitoires.

La présence simultanée d'auto-anticorps chauds et d'agglutinines froides à titre élevé (>1/1000 à 0-4°C) ou à large amplitude thermique (30-37°C) définit les AHAI mixtes (5 %). Enfin, la forme la plus rare (1 %) est l'hémoglobinurie paroxystique à frigore induite par un autoanticorps, qualifié d'hémolysine biphasique, de classe IgG et de spécificité P qui se fixe sur les hématies à froid et active les premiers composants du complément. A 37°C, l'activation de la cascade du complément se poursuit jusqu'à l'hémolyse [9].

Les principales caractéristiques des différents types d'AHAI et les propriétés immunochimiques des autoanticorps en cause sont résumées dans le tableau I.

3. Diagnostic positif des AHAI : Test direct à l'antiglobuline

Devant la suspicion d'une AHAI, 3 questions doivent être posées : existe-il une hémolyse ?

L'hémolyse est-elle d'origine immunologique ? Si oui, quel est son type ?

3-1- Existe-il une hémolyse ?

La recherche de stigmates d'hémolyse est indispensable dans la mesure où elle permet d'évaluer la signification clinico-biologique d'un test direct à l'antiglobuline (TDA) positif. Au niveau hématologique et biochimique, l'hémolyse exagérée se manifeste par :

- Une augmentation du taux des réticulocytes > 120 000 / μ L. Toutefois, une réticulocytopenie est observée au cours de la phase aiguë de l'AHAI, en cas de déficit en fer, de destruction des précurseurs érythroïdes par les autoanticorps, d'infiltration de la moelle osseuse, de l'aplasie médullaire ou d'infection par le parvo-virus B19 [8, 9]
- Au frottis sanguin : Des microsphérocytes, une polychromatophilie, une discrète myélémie incluant les érythroblastes, parfois des schizocytes dans les hémolyses intravasculaires, une agglutination des globules rouges en présence d'agglutinines froides
- Une hyperbilirubinémie à prédominance non conjuguée
- Des lactates déshydrogénases: augmentées ou normales
- Une haptoglobine : diminuée ou effondrée dans les hémolyses intravasculaires
- Une hémoglobulinurie dans les hémolyses intravasculaires
- Une hémosidérinurie : détectée environ 1 semaine après une hémolyse intravasculaire

Toutefois, ces paramètres biologiques peuvent être normaux surtout en cas d'une hémolyse modérée et compensée [8,9].

3-2- L'hémolyse est-elle d'origine immunologique ?

Devant une anémie hémolytique, il importe d'en identifier l'étiologie. La première étape consiste à caractériser le mécanisme de l'hémolyse : immunologique ou non immunologique. L'implication d'un mécanisme immunologique repose sur la positivité du TDA, encore communément appelé test de Coombs direct, pierre angulaire du diagnostic de l'AHAI [10].

Principe et aspects techniques du TDA :

C'est un test d'agglutination artificielle qui met en évidence, grâce à une antiglobuline humaine, la sensibilisation *in vivo* des globules rouges par des immunoglobulines (Ig) G, M, A et/ou des fractions du complément (C3d), traduction du conflit immunologique en cause [11,12]. En effet, l'antiglobuline humaine entraîne la formation de ponts et l'agglutination des globules rouges sensibilisés. Il est recommandé de toujours commencer par une antiglobuline polyspécifique ayant une activité anti-IgG et anti-C3d [13,14] puis compléter par des antiglobulines spécifiques (anti-IgG, anti-C3d, anti-IgA, anti-IgM) [8]. Il faut souligner que la présence d'IgM à la surface des hématies ne peut, en règle générale, pas être démontrée de façon directe, les IgM étant le plus souvent spontanément éluées de la surface des GR. Actuellement, le TDA fait appel à des antiglobulines humaines monoclonales et la technique classique en tube est le plus souvent remplacée par une technique en microfiltration à l'aide d'une batterie de gels contenant chacun un Ac monoclonal spécifique (figure1). Ces progrès ont haussé la sensibilité du TDA puisqu'ils permettent de détecter jusqu'à 100 à 150 Ig et/ou fractions du complément fixées par hématies, au lieu de 500 par la technique en tube [15].

Il est également possible d'identifier la sous classe de l'IgG par des procédés de microfiltration. Ceci peut apporter une valeur de gravité puisque la présence d'IgG3 a été corrélée à une hémolyse sévère en raison de sa capacité à activer le complément [8, 16].

Prélèvement sanguin nécessaire :

Le TDA se fait sur un prélèvement sanguin réalisé dans un tube avec anticoagulant de type EDTA qui, par le biais de la chélation de calcium, évite la fixation de C4 source de faux positif avec certains réactifs. En effet, cette fraction du complément peut se fixer sur les hématies prélevées dans un tube sec et conservé à +4°C. Le test doit être réalisé dans un délai maximal de 48 heures après le prélèvement [17,18].

Signification diagnostique du TDA :

L'interprétation des résultats du TDA n'est pas toujours aisée. Le plus difficile est de rattacher un TDA positif à un contexte pathologique. Dans ce sens, un TDA positif isolément n'a pas de valeur pathologique propre en l'absence de stigmates clinico-biologiques d'hémolyse. De même, une hémolyse d'origine immunologique plus ou moins importante peut être associée à un TDA négatif.

Nombre de circonstances pathologiques peut s'associer à un TDA faussement positif par adsorption non spécifique d'Ig ou de complexes immuns à la surface des globules rouges : hypergammaglobulinémies polyclonales, autres maladies auto-immunes, administration intraveineuse d'Ig polyvalentes, myélome, cirrhose, infections chroniques, anémie hémolytique immunoallergique causée par un médicament [9]. Un TDA positif en l'absence de toute hémolyse a même été rapporté dans la population générale avec une fréquence estimée de 1/1000 à 1/14000 donneurs de sang [19-21]. La signification de ce résultat n'est pas clairement élucidée, mais certains individus peuvent développer ultérieurement une AHAI ou un cancer [22,23]. Cette prévalence s'élève jusqu'à 1% à 15% dans des populations de patients hospitalisés n'ayant aucun signe clinique associé ni symptôme d'hémolyse [24].

Un TDA positif permet de confirmer la sensibilisation des hématies par des anticorps sans pour autant signifier à coup sûr une AHAI [10]. De ce fait, le contexte clinique est un élément majeur dans l'interprétation d'un TDA positif. Ainsi, devant un TDA positif avec une hémolyse évidente, 5 questions doivent être posées avant de porter le diagnostic d'une AHAI :

(1) Y a-t-il un historique transfusionnel dans les 3 derniers mois ? Si oui, il peut s'agir d'une réaction hémolytique retardée et la positivité du TDA serait expliquée par la sensibilisation des hématies incompatibles du donneur par un allo-anticorps anti-érythrocytaire circulant dans le plasma du receveur.

(2) En période néonatale, s'agit-il de la maladie hémolytique du nouveau-né ? Dans ce cas, le TDA positif atteste la sensibilisation des globules rouges du nouveau-né par des anticorps anti-érythrocytaires d'origine maternelle.

(3) Quels sont les médicaments pris par le patient ? Plusieurs médicaments peuvent entraîner des anémies hémolytiques immuno-allergiques.

(4) Le patient a-t-il subi une transplantation d'organe ou une greffe de cellules souches hématopoïétiques ? Dans ces cas, il faut considérer une hémolyse allo-immune causée par incompatibilité ABO majeure ou le syndrome des lymphocytes passagers ?

(5) Existe-t-il une autre cause d'hémolyse ?

3-3- Quel est le type de l'AHAI ?

La caractérisation du type de l'AHAI est déterminante dans la prise en charge thérapeutique.

Dans les AHAI à autoanticorps chauds, le TDA peut être de type IgG exclusif (68 % des cas), mixte IgG+C3d (24 % des cas), de type C3d exclusif (7 % des cas) ou négatif (1 % des cas) [5]. Dans les anémies à autoanticorps froids, le TDA est classiquement de type complément exclusif. Une corrélation directe entre le degré de l'hémolyse et la quantité de complément fixée à la surface des hématies a été documentée [18]. Il existe sur le marché des antiglobulines monospécifiques anti-IgM qui pourraient détecter l'IgM responsable. Ces réactifs ne sont pas utilisés en première intention. Un TDA de type complément associé à un syndrome hémolytique sévère chez un enfant ou un adulte jeune doit faire évoquer l'hémoglobinurie paroxytique a frigore et faire pratiquer le test de Donath-Landsteiner [9,18].

Au laboratoire, l'intensité des réactions positives est qualifiée de 4+ (fortement positives) à 1+ (faiblement positives). Il est à noter que les études n'ont pas confirmé la corrélation entre l'intensité du TDA et le degré de l'hémolyse. D'ailleurs, les AHAI à TDA négatif peuvent avoir une symptomatologie modérée et cortico-sensibles ou, au contraire, être sévères mettant en jeu le pronostic vital [16, 25-28].

Chez les patients avec AHAI sous traitement, le TDA est aussi un outil d'évaluation de l'efficacité thérapeutique. Celle-ci est attestée par la négativité du TDA associée à la disparition des signes de l'hémolyse. Toutefois, la persistance d'un TDA positif malgré la maîtrise du processus hémolytique, doit inciter à la prudence avant l'arrêt du traitement puisqu'une récurrence pourrait survenir à plus ou moins long terme [29].

Les AHAI à TDA négatif est une entité particulière qui a suscité beaucoup de débat : un TDA négatif dans un contexte d'anémie hémolytique doit-il faire écarter le diagnostic d'une AHAI ? Tout d'abord, il faut chercher les hémolyses non immunologiques et les anémies hémolytiques immunoallergiques d'origine médicamenteuse [10]. Toutefois, dans d'authentiques AHAI, le TDA peut être négatif [30]. Dans les anciennes études utilisant la technique en tube, ce taux variait de 3 à 11 % selon les séries [8, 30]. En fait, le TDA est une réaction précise dont tous les éléments (réactifs, globules rouges, etc) doivent être corrects. Le non-respect de certaines règles fondamentales peut donner des résultats faussement négatifs ou faussement positifs [31]. Les réactions faussement négatives peuvent être expliquées par :

- **Des problèmes techniques :** mauvaise qualité ou oubli d'ajout de l'antiglobuline, inhibition de l'antiglobuline par son adsorption sur les immunoglobulines résiduelles ou les protéines

plasmatiques en cas de lavage insuffisant des globules rouges, retard de l'ajout de l'antiglobuline après lavage des globules rouges, agitation intempestive du culot des hématies lors de la lecture des réactions, concentration inappropriée de la suspension des globules rouges [10,32].

- **Une quantité trop faible d'auto-anticorps à la surface des hématies en deçà du seuil de sensibilité (<200/hématies) [33,34].**

- **Une faible affinité de l'auto-anticorps** qui est éliminé lors des lavages des hématies. Pour réduire l'éluion des autoanticorps, il a été recommandé de faire des lavages à froids (+4°C) avec une solution isotonique ou à basse force ionique et en utilisant une centrifugeuse réfrigérée [9, 30,35, 36].

- **AHAI à autoanticorps chauds de type IgA :** ces anticorps ne sont pas détectés par les antiglobulines anti-IgG et anti-C3d et nécessitent une antiglobuline monospécifique anti-IgA. Cette entité est rare (0,2 % des AHAI) mais représente 14 % des AHAI à TCD négatif. [29, 37-40].

Ainsi, un TDA par la technique en microfiltration et avec une antiglobuline anti-IgA doit systématiquement être demandé lorsque le test est négatif en IgG et C3d et en présence d'une hémolyse inexplicquée. Toutefois, environ 50 % des AHAI à TDA négatif demeurent sans explication [12]. Le recours à la technique de la cytométrie de flux, réputée plus sensible, peut résoudre certaines difficultés par la mise en évidence des IgG ou du complément à la surface des hématies. A titre indicatif, la sensibilité de cette technique a été estimée à 30- 50 molécules d'Ig/hématie [41,42]. Par ailleurs, chez les enfants se présentant dans un tableau d'hémolyse sévère avec une hémoglobinurie, il faut penser à réaliser le test de Donath Landsteiner à la recherche de l'hémolysine biphasique qui, du fait de ses propriétés thermiques, n'est pas révélée par le TDA à l'anti-IgG et anti-C3d.

Le diagnostic d'AHAI à TDA négatif *stricto sensu* ne peut être retenu qu'après avoir exclu les autres causes d'anémies hémolytiques constitutionnelles ou acquises et devrait être remis en question en

l'absence de réponse à une corticothérapie « d'épreuve » [9].

4. Autres tests utiles dans le cadre d'une AHAI suspectée ou confirmée

4-1 : L'étude du sérum :

Outre le TDA, qui est l'examen clé pour le diagnostic d'AHAI, l'étude du sérum et l'éluion peuvent être utiles dans certains cas. L'étude du sérum permet de détecter et d'identifier les autoanticorps sériques. En effet, dans la majorité des cas, les autoanticorps sont présents aussi bien libres dans le sérum que fixés sur les hématies. Cette étude est particulièrement utile en cas d'autoanticorps de faible affinité ou spontanément élués et donc non détectables par le TDA.

Dans les AHAI à autoanticorps chauds, la mise en évidence des autoanticorps dans le sérum fait appel aux procédés immunohématologiques de la recherche d'agglutinines irrégulières (test de Coombs indirect, à différentes températures : +4°C, +22°C, +37°C, avec des hématies normales ou traitées par des enzymes protéolytiques). Il est à noter qu'on observe dans la majorité des cas une pan-agglutination de la totalité des hématies du panel, les autoanticorps reconnaissant des antigènes de grande fréquence [43]. La comparaison de la spécificité des anticorps sériques avec celle de l'éluat permet de rechercher les associations allo- et autoanticorps, élément important pour assurer la sécurité transfusionnelle. Il est opportun de réaliser un témoin autologue en testant le sérum du patient vis-à-vis de ses propres hématies dans les mêmes conditions techniques de la RAI. Sa positivité atteste de la nature autoimmune de la pan-agglutination en l'absence d'un épisode transfusionnel récent.

L'étude du sérum revêt un intérêt particulier dans les AHAI avec TDA positif de type C3 ± IgG. On réalise la recherche et le titrage des agglutinines froides dans le plasma par la technique saline à +4°C. Le plasma doit être obtenu à partir d'un prélèvement sanguin sur EDTA, lequel doit être préalablement placé pendant 1 à 2 heures à 37°C dès son arrivée au laboratoire avant de séparer le plasma des hématies immédiatement à la sortie du bain-marie de façon à éviter la fixation des anticorps sur les hématies [24]. Le titre des autoanticorps froids est classiquement très élevé dans la maladie des agglutinines froides : > 1/500 à +4°C. Dans les AHAI froides post-infectieuses, on observe des titres moindres dépassant rarement

1/64. Il est à noter qu'à l'état physiologique, la plupart des sujets sains présentent des autoanticorps IgM de faible titre $\leq 1/32$ sans hémolyse associée [29]. La présence d'agglutinines froides peut être suspectée devant l'agglutination spontanée des globules rouges dans le tube de prélèvement ou sur le frottis sanguin [43]. Typiquement, cette agglutination disparaît après incubation de l'échantillon sanguin à 37°C. Par ailleurs, en présence d'agglutinines froides, les automates de numération formule sanguine qui analysent les échantillons sanguins avec des réactifs à température ambiante produisent également des artefacts évocateurs : alors que le taux d'hémoglobine est convenablement mesuré, le nombre total d'hématies est exagérément bas, le volume globulaire moyen (VGM) augmenté de façon variable, la CCMH souvent très élevée (37-50 g/dL voire plus), et le calcul de l'hématocrite erroné. Afin d'éviter ce type d'artefacts lorsque la présence d'AF est connue ou suspectée, le prélèvement sanguin doit être rapidement acheminé puis étudié au laboratoire à la température de 37°C [29].

Plus que le titre des agglutinines froides dans le sérum, c'est l'amplitude thermique de l'auto-anticorps qui conditionne sa pathogénicité [8]. Ainsi, il est pertinent de procéder au titrage de l'autoanticorps à diverses températures : +4°C, +22°C, +37°C. Classiquement, ces anticorps ont un optimum thermique à +4°C et deviennent inactifs lorsque la température s'approche de 37°C. Une amplitude thermique large est caractérisée par des réactions encore nettement positives à +37°C et serait corrélée à une plus grande pathogénicité et à une hémolyse plus sévère [44].

L'étude de l'activité hémolytique du sérum peut également être utile d'autant plus qu'elle possède une valeur de gravité [45]. Ça consiste à rechercher la présence d'hémolysines sériques chaudes, froides, acides ou neutres en étudiant différentes dilutions du sérum du patient vis-à-vis d'hématies OI et Oi en milieu acidifié à pH 6,5 (hémolysines acides) ou en milieu neutre (pH 7,3) en présence de complément à +20 °C ou à +37°C [29].

4-2- L'élution :

L'élution consiste à détacher les autoanticorps de la surface des hématies par différents procédés

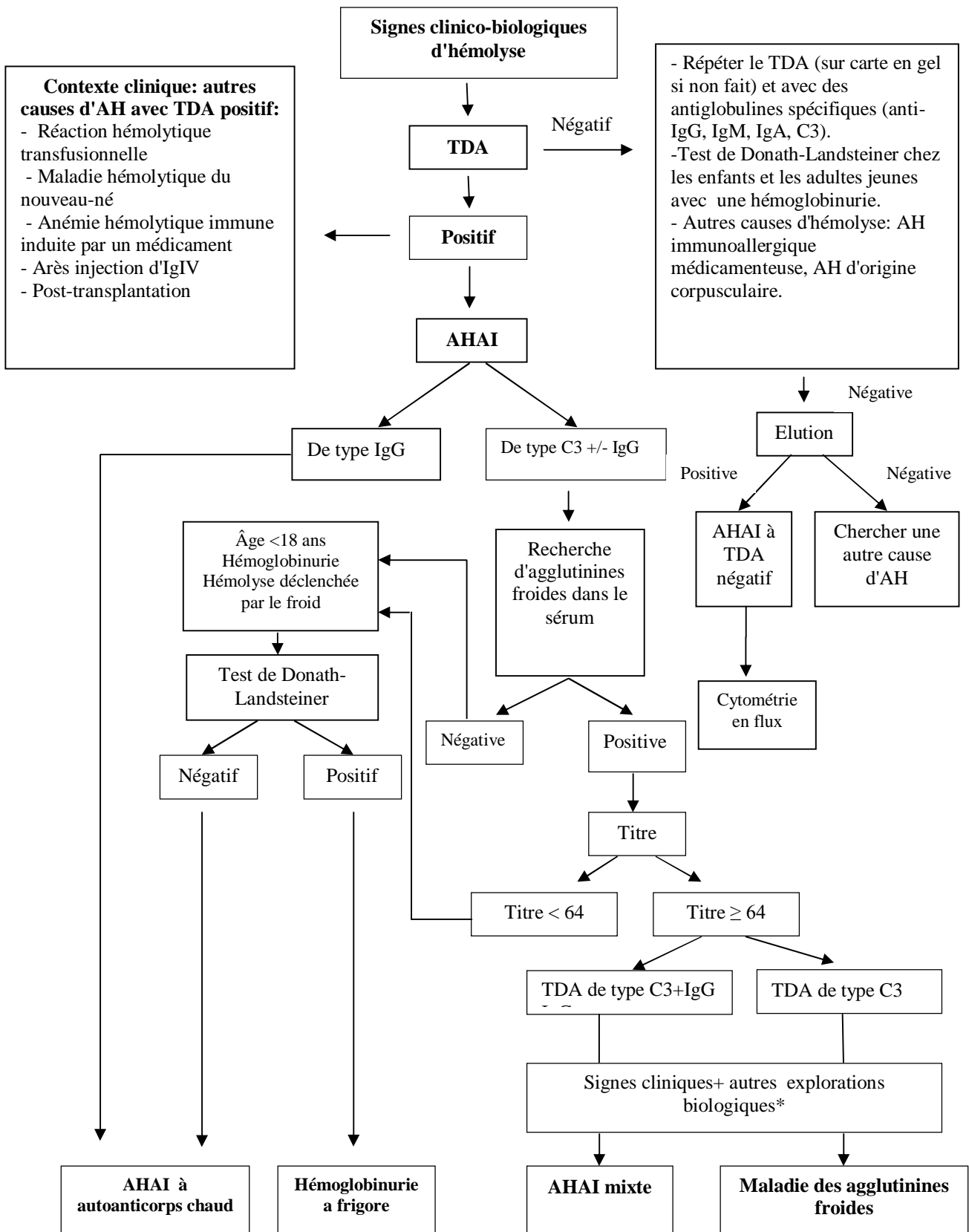
physico-chimiques (chaleur à 56°C, éther, modification du pH...).

Elle permet de confirmer la présence d'anticorps fixés sur les hématies, que le TDA soit positif ou négatif, et d'étudier leurs caractéristiques (spécificité, optimum et amplitude thermique). Dans certains cas, les autoanticorps IgG sont entièrement fixés sur les hématies du patient et ne sont retrouvés que dans l'éluat. D'un point de vue pratique, l'élution n'est pas indispensable au diagnostic d'AHAI et est rarement réalisée. Elle est surtout utile dans un contexte d'hémolyse post-transfusionnelle pour distinguer des autoanticorps d'allo-anticorps ou encore dans les cas d'hémolyse induite par un médicament [8,9]. Il faut signaler qu'une élution négative n'est pas un argument formel en faveur de l'absence d'autoanticorps. Cette négativité s'observe dans les AHAI à autoanticorps froids et dans l'hémoglobinurie paroxystique a frigore, dans la mesure où les autoanticorps s'éluent spontanément de la surface des hématies dans les zones les plus chaudes de la circulation corporelle.

4-3- Test de Donath-Landsteiner :

Il permet de mettre en évidence l'autoanticorps IgG doté d'une activité biphasique. Il est indiqué dans le cadre d'une AHAI avec un TDA de type C3d+/- IgG après exclusion d'une maladie des agglutinines froides et en présence d'une hémolyse avec hémoglobinurie ou chez un enfant ou un adulte jeune ayant une infection récente (même avec un TDA négatif) [9]. Dans une première étape, on incube le sérum du patient avec des hématies-tests O papainées P1 P2 à +4°C, température optimale à la fixation de l'autoanticorps IgG sur sa cible antigénique, classiquement l'antigène P (GLOB1). La seconde étape consiste à réchauffer le mélange réactionnel à + 37°C qui permet de fixer le complément et de déclencher l'hémolyse. Ce test peut poser de nombreuses difficultés techniques et donner lieu à des faux négatifs [29].

5- Algorithme de la démarche diagnostique immuno-hématologique des AHAI [9]



* étude de l'amplitude thermique, recherche d'agglutinines irrégulières...

Tableau N°I : Caractéristiques principales des AHAI selon le type de l'autoanticorps.

Type d'AHAI	Terrain/clinique	Classe d'Ig	Optimum thermique	Spécificité du TCD	Éluat	Spécificité de l'Ac
AHAI chaudes	Adulte > enfant Hémolyse extravasculaire, mode d'installation subaigu	IgG>>>IgA>IgM	37°C	IgG ou IgG + C3	IgG	- Pan-spécifique - Dans 3% : spécificité pseudoolotypique (anti-e, anti-E, anti-c)
MAF	>50 ans Hémolyse extravasculaire ± acrosyndrome	IgM>>>IgA ou IgG Titre >1/500	4°C (souvent ≥ 30°C)	C3	Négatif	I> i>>Pr
AHAI à autoanticorps froids transitoires	Enfant, adulte jeune Hémolyse intravasculaire	IgM polyclonale Titre souvent < à 1/64 et dépassé rarement 1/256	4°C (souvent < 25°C)	C3	Négatif	I> i
HPF	Exceptionnelle chez l'adulte (<2%) Plus fréquente chez l'enfant Hémolyse aigue intravasculaire	IgG (Hémolysine biphasique de Donath- Landsteiner	>30°C	C3	Négatif	P
AHAI « mixte »	Adulte	IgG, IgM (peut être de titre faible < 1/64)	Large amplitude thermique (4°C- 37°C)	IgG + C3	IgG	Pan-spécifique pour l'IgG Anti-i ou anti-I pour l'IgM

HPF: Hémoglobinurie paroxystique à frigore

MAF: maladie des agglutinines froides



Figure 1: Cartes en gel pour la réalisation du TDA (Marque: BIO-RAD)

5. CONCLUSION

L'exploration immunohématologique des AHAI doit se faire selon une démarche progressive prenant en compte le contexte clinique ainsi que le résultat du TDA et des autres explorations biologiques. Le laboratoire d'immunohématologie joue un rôle déterminant dans cette démarche diagnostique. Une communication efficace entre le clinicien et le biologiste est de nature à apporter des éléments d'orientation diagnostique mais aussi sur la gravité clinique de l'AHAI. Le Biologiste doit en effet être informé de l'ensemble du tableau clinique afin de pousser les explorations permettant de caractériser les autoanticorps fixés sur les globules rouges et d'étudier le sérum à la recherche d'un éventuel alloanticorps masqué par l'autoanticorps.

6. REFERENCES

[1] Garraty G. The James Blundell Award Lecture 2007: do we really understand immune red cell destruction? *Transfus Med.* 2008;18(6):321-334.

[2] Barcellini W. New insights in the pathogenesis of autoimmune hemolytic anemia. *Transfus Med Hemother.* 2015;42(5):287-293.

[3] Hill QA, Hill A, Berentsen S. Defining autoimmune hemolytic anemia: a systematic review of the terminology used for diagnosis and treatment. *Blood Adv.* 2019 Jun 25;3(12):

[4] Michel M. Classification and therapeutic approaches in autoimmune hemolytic anemia: an update. *Expert Rev Hematol.* 2011;4(6):607-618.

[5] Sokol RJ, Hewitt S, Stamps BK. Autoimmune haemolysis: an 18-year study of 865 cases referred to a regional transfusion centre. *Br Med J (Clin Res Ed).* 1981;282(6281):2023-2027.

[6] Bass GF, Tuscano ET, Tuscano JM. Diagnosis and classification of autoimmune hemolytic anemia. *Autoimmun Rev.* 2014;13(4-5):560-564.

[7] Barros MM, Blajchman MA, Bordin JO. Warm autoimmune hemolytic anemia: recent progress in understanding the immunobiology and the treatment. *Transfus Med Rev.* 2010;24(3):195-210.

[8] Kalfa TA. Warm antibody autoimmune hemolytic anemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2016 Dec 2;2016(1):690-697.

[9] Hill QA, Stamps R, Massey E, Grainger JD, Provan D, Hill A. The diagnosis and management of primary autoimmune haemolytic anaemia. *Br J Haematol.* 2017 Feb;176(3):395-411.

[10] Zantek ND, Koepsell SA, Tharp DR Jr, Cohn CS. The direct antiglobulin test: a critical step in the evaluation of hemolysis. *Am J Hematol.* 2012 Jul;87(7):707-709.

[11] Coombs RR, Mourant AE, Race RR. A new test for the detection of weak and incomplete Rh agglutinins. *Br J Exp Pathol* 1945;26:255-266.

[12] Reardon JE, Marques MB. Laboratory evaluation and transfusion support of patients with autoimmune hemolytic anemia. *Am J Clin Pathol* 2006 ;125 :S71-77

[13] Garraty G. The significance of IgG on the red cell surface. *Transfus Med Rev.* 1987 ;1 :47-57

[14] Howard JE, Winn LC, Gottlieb CE, Grumet FC, Garraty G, Petz LD. Clinical significance of anti-

Complement component of antiglobulin sera. *Transfusion.* 1982 ;22 :269-272

[15] Meulenbroek EM, Wouters D, Zeerleder SS. Lyse or not to lyse: Clinical significance of red blood cell autoantibodies. *Blood Rev.* 2015 Nov; 29(6):369-376.

[16] Wheeler CA, Calhoun L, Blackall DP. Warm reactive autoantibodies: clinical and serologic correlations. *Am J Clin Pathol* 2004 ;122 :680-685

[17] South SF. Use of the direct antiglobulin test in routine testing. In: Wallace MaLJS, editor. *Current Applications and Interpretations of the Direct Antiglobulin Test.* Arlington, VA: American Association of Blood Banks; 1988. pp 25-45.

[18] Roubinet F, Chiaroni J. Test direct à l'antiglobuline ou test de Coombs direct. In: les analyses immunohématologiques et leurs applications cliniques. Edition John Libbey Eurotext 2011 Paris 78-86.

[19] Gorst DW, Rawlinson VI, Merry AH, et al. Positive direct antiglobulin test in normal individuals. *Vox Sang* 1980;38:99-105.

[20] Kajii E, Omi T, Miura Y, Ikemoto S. A new approach for diagnosis of autoimmune hemolytic anemia. *Rinsho Ketsueki.* 1994;35(4):336-340.

[21] Gilliland BC, Baxter E, Evans RS. Red-cell antibodies in acquired hemolytic anemia with negative antiglobulin serum tests. *N Engl J Med.* 1971;285(5):252-256

[22] Bareford D, Longster G, Gilks L, et al. Follow-up of normal individuals with a positive antiglobulin test. *Scand J Haematol* 1985;35:348-353.

[23] Rottenberg Y, Yahalom V, Shinar E, et al. Blood donors with positive direct antiglobulin tests are at increased risk for cancer. *Transfusion* 2009;49:838-842.

[24] Reardon JE, Marques MB. Laboratory evaluation and transfusion support of patients with autoimmune hemolytic anemia. *Am J Clin Pathol* 2006 ;125 :S71-77.

[25] Wikman A, Ardorph U, Gryfelt G, Gustafsson L, Björkholm M, Lundahl J. Characterization of red cell autoantibodies in consecutive DAT-positive patients with relation to in vivo haemolysis. *Ann Hematol.* 2005;84:150-158

[26] Biagi E, Assali G, Rossi F, Jankovic M, Nicolini B, Balduzzi A. A persistent severe autoimmune hemolytic anemia despite apparent direct antiglobulin test negativization. *Haematologica.* 1999;84(11): 1043-1045.

[27] Karafin MS, Denomme GA, Schanen M, Gottschall JL. Clinical and reference lab characteristics of patients with suspected direct antiglobulin test (DAT)-negative immune hemolytic anemia. *Immunohematology.* 2015;31(3):108-115.

[28] Sachs UJ, Roder L, Santoso S, Bein G. Does a negative direct anti-globulin test exclude warm autoimmune haemolytic anaemia? A prospective study of 504 cases. *Br J Haematol.* 2006;132(5):655-656.

[29] Mortelecque R, Noizat-Pirenne F. Anémies hémolytiques autoimmunes. In: les analyses immunohématologiques et leurs applications cliniques. Edition John Libbey Eurotext 2011 Paris. P : 212-224.

[30] Segel GB, Lichtman MA. Direct antiglobulin ("Coombs") test-negative autoimmune hemolytic anemia: a review. *Blood Cells Mol Dis.* 2014 Apr;52(4):152-60.

[31] Rouger P, Salmon C. le test de coombs. In : la pratique de l'agglutination des érythrocytes et du test de Coombs. Masson, 1981. pages 49-77.

[32] Voak D, Downie DM, Moore BP, et al. Replicate tests for the detection and correction of errors in anti-human globulin (AHG) tests: optimum conditions and quality control. *Haematologia (Budap)* 1988;21: 3-16

DIAGNOSTIC IMMUNO-HEMATOLOGIQUE DES ANEMIES HEMOLYTIQUES AUTO-IMMUNES

- [33] Merry AH, Thomson EE, Rawlinson VI, et al. Quantitation of IgG on erythrocytes: correlation of number of IgG molecules per cell with the strength of the direct and indirect antiglobulin tests. *Vox Sang* 1984;47:73-81.
- [34] Kamesaki T, Toyotsuji T, Kajii E. Characterization of direct antiglobulin test-negative autoimmune hemolytic anemia : a study of 154 cases. *Am J Hematol*. 2013;88(2):93-96.
- [35] Garratty G. Immune hemolytic anemia associated with negative routine serology. *Semin Hematol* 2005;42:156-164.
- [36] Sokol RJ, Booker DJ, Stamps R, Jaliha S, Paul B. Direct Coombs test-negative autoimmune hemolytic anemia and low-affinity IgG class antibodies. *Immunoematology*. 1997;13(4):115-118.
- [37] Baek SW, Lee MW, Ryu HW, Lee KS, Song IC, Lee HJ, et al. Clinical features and outcomes of autoimmune hemolytic anemia: a retrospective analysis of 32 cases. *Korean J Hematol*. 2011;46:111-117.
- [38] Philippe P. Diagnostic et prise en charge de l'anémie hémolytique auto-immune. *Presse Med*. 2007;36:1959-69.
- [39] McGann PT, McDade J, Mortier NA, et al. IgA-mediated autoimmune hemolytic anemia in an infant. *Pediatr Blood Cancer* 2011;56:837-839.
- [40] Leger RM, Co A, Hunt P, Garrity G. Attempts to support an immune etiology in 800 patients with direct antiglobulin test-negative hemolytic anemia. *Immunoematology*. 2010;26(4):156-160.
- [41] Lin JS1, Hao TC, Lyou JY, Chen YJ, Liu HM, Tzeng CH, Chiou TJ. Clinical application of a flow cytometric direct antiglobulin test. *Transfusion*. 2009 Jul;49(7):1335-1346.
- [42] Fayek MH, Saad AA, Eissa DG, Tawfik LM, Kamal G. Role of gel test and flow cytometry in diagnosis of Coombs' negative autoimmune haemolytic anaemia. *Int J Lab Hematol*. 2012;34(3):311-319.
- [43] Kalfa TA, Warm antibody autoimmune hemolytic anemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2016 Dec 2;2016(1):690-697.
- [44] Jefferies LC. Transfusion therapy in autoimmune hemolytic anemia. *Hematol Oncol Clin North Am* 1994;8:1087-1104.
- [45] Znazen R, Kaabi H, Hmida S, et al. detection of serum hemolysins in autoimmune hemolytic anemia. *Transfus Clin Biol* 2006 ; 13 :341-345