

**DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE DES ANEMIES HEMOLYTIQUES
AUTO-IMMUNES**

**France Noizat-Pirenne
Centre National de Référence des Groupes Sanguins
Institut National de la Transfusion Sanguine
Paris , France**

DEFINITION DES AHAI

Anémie due à la destruction accrue des hématies par des auto-anticorps dirigés contre les propres antigènes de la membrane érythrocytaire des hématies du patient

CLASSIFICATION DES AHAI

• Classification Evolutive :

- ➔ formes aiguës transitoires
- ➔ formes chroniques

• Classification Etiologique:

- ➔ formes idiopathiques
- ➔ formes associées à une maladie immunologique
- ➔ formes associées à une maladie sans lien établi

• Classification Immunologique:

- ➔ AHAI à auto-anticorps « chauds » (IgG)
- ➔ AHAI à auto-anticorps « froids » (IgM)

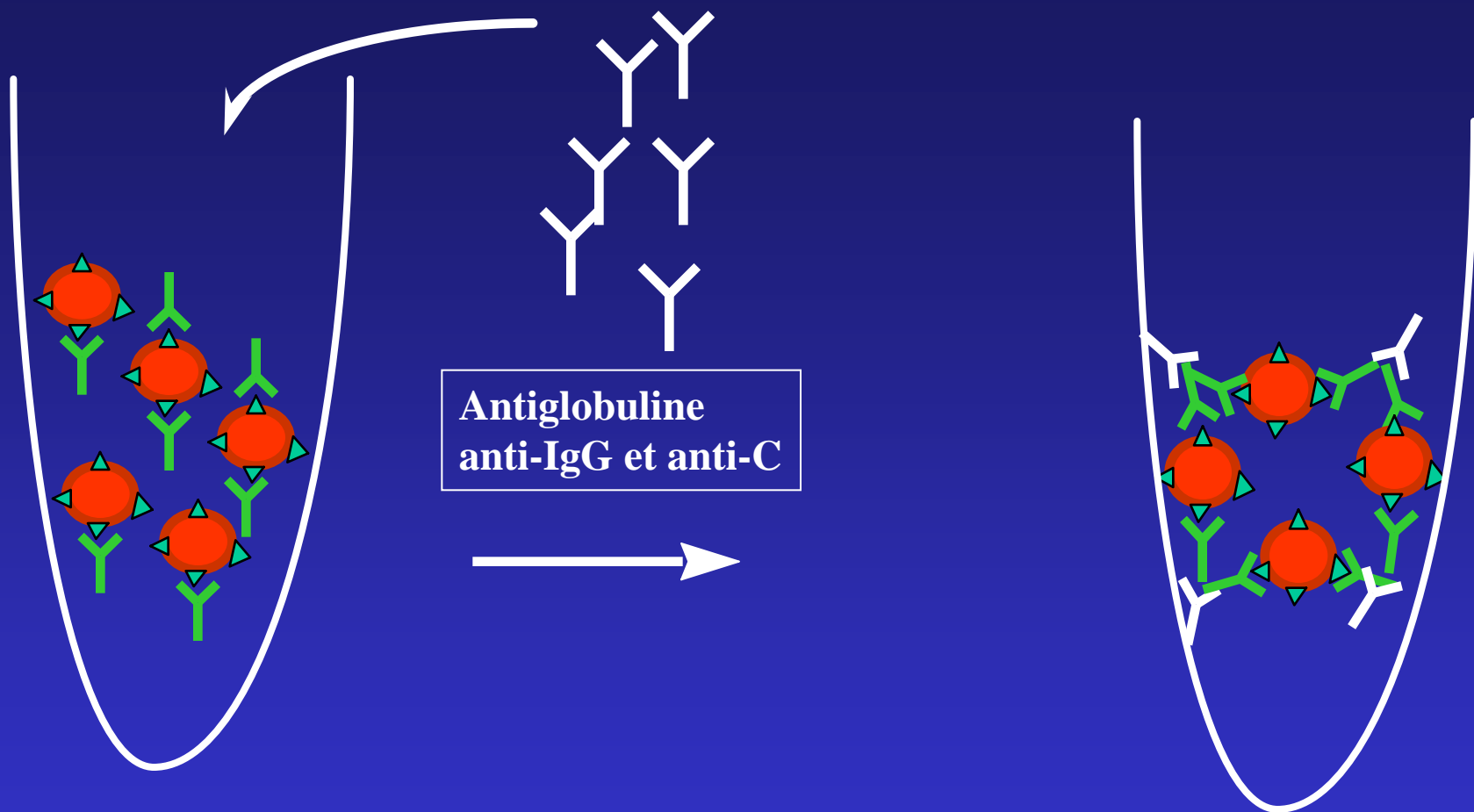
DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE DES AHAI

- Basé sur la classification immunologique
- Orienté sur l'étiologie et le traitement à mettre en œuvre
- Fait appel à 3 examens :
 - ➔ Test Direct à l' Antigobuline (TDA ou Coombs Direct)
 - ➔ Elution Directe
 - ➔ Recherche d'Anticorps Anti-Erythrocytaires (RAI)



Existence d'un auto-anticorps anti-érythrocytaire
Caractéristiques de l'auto-anticorps
(classe, amplitude thermique, spécificité, activité hémolysante)

TEST DIRECT A L'ANTIGLOBULINE



hématies du malade sensibilisées
in vivo
Pas d'agglutination visible in vitro

Agglutination visible
Test positif = il existe un anticorps
anti-érythrocytaire ou
du complément fixé sur les hématies

MISE EN ŒUVRE DU TDA

Antiglobulines :

- anti-IgG dirigée contre les marqueurs isotypiques des IgG
- anti-C3d
- utilisées simultanément et de façon indépendante

Techniques:

- Phase liquide: lavage des hématies obligatoire
- Phase solide: lavage des hématies non nécessaire
- Contrôles
 - réactivité des GR sans adjonction d'antiglobuline (gel neutre)
 - de qualité interne : GR sensibilisés in vitro par des IgG

MISE EN ŒUVRE DU TDA : PROBLEMES

Faux-négatifs:

- **Lavages insuffisants : 1 vol de sérum humain dilué au 1/4000 peut neutraliser un volume équivalent d'antiglobuline humaine**
- **Test interrompu ou retardé**
- **Conditions de centrifugation**
- **Concentration des hématies**
- **PH de l'eau de lavage : ↓PH ⇔ ↓de l'agglutination**
- **Nombre d'IgG fixées : seuil de détection du test**

MISE EN ŒUVRE DU TDA : PROBLEMES

Faux-positifs:

- Agglutination avant adjonction d'antiglobuline (contrôle +++)
- Particules ou contaminants sur la verrerie
- Centrifugation excessive

VALEUR PREDICTIVE DU TDA POUR LES AHAI

- si anémie hémolytique en dehors d'un contexte transfusionnel : +++
- si absence d'anémie hémolytique : +/-

TDA sur les donneurs de sang

Auteurs	Pays	Incidence
Weiner	UK	1/3300
Habibi	France	1/13000
Allen/Garatty	USA	1/1400
Gorst	UK	1/14000
Bareford	UK	1/7500

72% des TDA+ : durée de vie↓
-de 10% des TDA+ : anémie biologique

80% : 1+, 18% : 2+, 2% : 3 ou 4+
32% : IgG, 35% : IgG et C, 34% : C

32TDA + : 1 AHAI

67TDA + : 1 AHAI

SENSIBILISATION DES GR AU COURS DES AHAI

Auteurs	IgG	C3	IgG-C3
Worlledge Blachjman	31%	11%	48%
Issit	45%	0%	55%
Petz Garratty	21%	14%	64%

ELUTION DIRECTE

Principe :

- « Décrocher » les anticorps fixés sur les GR sensibilisés in vivo en utilisant les propriétés physico-chimiques de la réaction antigène-anticorps
- Tester les anticorps élués sur un panel de globules rouges tests

Objectifs:

- Confirmer la sensibilisation in vivo
- Définir les caractéristiques de l'auto-anticorps

ELUTION DIRECTE : TECHNIQUES

La chaleur :

Réaction antigène-anticorps exothermique : \uparrow chaleur \Rightarrow dissociation

Modifications conformationnelles des protéines \Rightarrow dissociation

La congélation-décongélation:

• Changement conformationnel de la membrane par modification brutale de la température \Rightarrow dissociation

Modification de PH:

A des valeurs extrêmes de PH:

• PH très \uparrow : toutes les protéines sont de charge +

• PH très \downarrow : toutes les protéines sont de charge –

-Répulsion

-Perte conformationnelle tertiaire

-Rupture des liaisons peptidiques à PH très \uparrow

Haute force ionique:

- Changement conformationnel important des protéines

Solvants organiques:

- La ↓ des forces de tension du milieu transforme les forces attractives de Van der Waals en forces répulsives

Sonication (ondes de haute fréquence):

- Formation de bulles de gaz dont l'implosion entraîne des forces de scission
- ↑ de la température

Chloroquine diphosphate:

- Neutralisation des charges: dissociation Ag-Ac sans dénaturation des antigènes

ZZAP (papaine + cystéine activée + DTT):

- Protéolyse et clivage intercaténaire des Ig

ELUTION DIRECTE : TECHNIQUES

Choix de la technique:

- Ac à optimum thermique froid : élution à la chaleur
- Ac à optimum thermique chaud : élution avec solvant ou acide
- Intérêt des techniques standardisées

Importance des lavages :

- 6 lavages : saline, PBS, BFI à 4°C
- Contrôle : dernière eau de lavage

ELUTION DIRECTE : LIMITES

Faux-négatifs:

- **Syndrome hémolytique avec destruction totale des GR sensibilisés**
- **Inadéquation de la technique par rapport à l'anticorps fixé**
- **Elution tardive par rapport à la date de prélèvement**
- **Excès de lavages éluant les anticorps de faible affinité (lavages à 4°C ou BFI)**
- **Dénaturation de l'anticorps lors de l'éluat**
- **Dilution de l'éluat**
- **Inadéquation des techniques d'analyse de l'éluat**

ELUTION DIRECTE : LIMITES

Faux Positifs:

Lavages insuffisants

Fixation non spécifique d'Ig sur les GR

Phénomène de Matuhasi-Ogata: fixation aspécifique d'un anticorps sur un complexe antigène-anticorps préalablement formé

ETUDE DU SERUM : LA RAI

Spécificité de l'anticorps : plusieurs techniques :

- test indirect à l'antiglobuline**
- agglutination directe avec GR tests traités aux enzymes**

Amplitude thermique de l'anticorps: plusieurs températures

4°C

22°C

30°C

37°C

Titrage pour les agglutinines froides

AHAI: SPECIFICITE DE L'ANTICORPS

Le + fréquemment : anticorps agglutinant toutes les hématies du panel

Parfois: spécificité précise

- **Auto-anticorps chaud**

 - RH**

 - LW**

 - Glycoprotéines A, B, C, D (S, U, Wrb, Gerbich, M, N, Pr)**

- **Auto-Anticorps froid**

 - Ii, ABO**

 - P**

 - MNS**

 - Pr**

Pas de corrélation entre la spécificité de l'anticorps et sa capacité à induire une hémolyse

RAI : AUTO-ANTICORPS

Pour confirmer qu'il s'agit d'un auto-anticorps :

**DISPARITION DE LA REACTIVITE DU SERUM APRES
ABSORPTION DU SERUM SUR HEMATIES AUTOLOGUES**

- **difficile à réaliser si:**

 - TDA fortement positif**

- **non valable si:**

 - contexte transfusionnel récent**

RAI : LE TEMOIN AUTOLOGUE

Principe:

GR du sujet testés avec son propre sérum dans les techniques de la RAI

Positif au cours des AHAI

Ne remplace pas le test direct à l'antiglobuline

Si témoin négatif et TDA +: n'élimine pas un auto-anticorps

- Problème technique (techniques différentes pour TDA et RAI)
- Diminution transitoire de la réactivité de l'antigène

AHA I A AUTO-ANTICORPS CHAUDS

CLASSIFICATION EN FONCTION DU TDA IgG-C

1/Présence isolée d'une immunoglobuline au TDA

2/Présence simultanée d'immunoglobuline et de complément au TDA

3/ Présence isolée de complément au TDA

4/ TDA négatif

AHA1 A AUTO-ANTICORPS CHAUDS

CLASSIFICATION EN FONCTION DU TDA IgG et C

1/TDA positif de type IgG

- **IgG1 ou IgG3 : distance excessive entre 2 sites antigéniques empêchant la fixation du complément**
- **IgG2 ou IgG4 : rarement car n'induisent pas d'hémolyse**

2/TDA positif de type IgG + C

Habituel au cours des connectivites mais possible pour toutes les étiologies

- **IgG fixant le complément**
- **IgG + IgM (IgM mise en évidence uniquement par la fixation du C)**

AHAI A AUTO-ANTICORPS CHAUDS

3/ TDA positif de type C

1% des AHAI chaudes sans agglutinines froides

Activation du complément par :

- IgG : seuil de détection sur la membrane est < au seuil du TDA
- IgM : qui s'éluent à 37°C, persistance du complément
- IgM chaudes + complément: IgM détectées par TDA anti-IgM rare, propriété d'hémolysines chaudes actives à 37°C sur GR traités aux enzymes. Hémolyses sévères

4/ TDA négatif

- IgA non détectées par un test IgG et C
- Manque de sensibilité du TDA

AHA1 A AUTO-ANTICORPS FROIDS : MALADIE DES AGGLUTININES FROIDES

•Anticorps

- IgM, + rarement IgM et IgG (MNI)**
- agglutinant les GR à froid, activité lytique thermo-dépendante nécessitant le complément**

•Antigènes ubiquitaires

- I**
- i**
- Pr: spécificité détruite par la papaine**

•Mécanisme :

- Fixation des AF en périphérie (température ↓)**
- Activation du Complément**
- Circulation centrale : libération des AF, persistance du C3d**
- Signification pathologique : amplitude thermique +++: 4°C → 37°C**

AHAI A AUTO-ANTICORPS FROIDS : HEMOGLOBINURIE PAROXYSTIQUE A FRIGORE

Caractérisée par un anticorps anti-P de type IgG se fixant à basse température, fixant le complément et entraînant une hémolyse à 37°C.

Hémolysine bithermique de Donath-Landsteiner

Diagnostic immunologique:

TDA :

- de type complément (C3d)
- rarement mixte (IgG + C) car l'IgG s'élue à partir de 15-20°C

RAI :

- anticorps peu agglutinant, de titre peu élevé, + à 4°C
- activité hémolytique maximum si une incubation à 0°C précède l'incubation à 37°C
- spécificité anti-P (globoside)

Contexte clinique: infection (*mycoplasma pneumoniae*)

CONCLUSION

**Le Diagnostic biologique des AHAI fait appel à 3 examens :
RAI, TDA, Elution**

TDA et Elution directe

**Ne peuvent s'interpréter qu'en dehors d'un contexte
transfusionnel**

**Confirment la sensibilisation in vivo des GR par un anticorps
anti-érythrocytaire**

RAI

**Précise les caractéristiques de l'auto-anticorps
Retrouve les allo-anticorps associés**