

Les interférences du daratumumab dans le suivi du  
myélome multiple et en transfusion sanguine

Adrien – NIZET

Master en sciences pharmaceutiques

Finalité spécialisée en conception et développement du médicament – bioanalyse

Année académique 2017-2018



## Remerciements

Je tiens à remercier toutes les personnes qui ont contribué à mon stage, pour l'expérience enrichissante qu'elles m'ont fait vivre et pour l'aide lors de la réalisation de ce mémoire.

Tout d'abord, je remercie le Professeur Etienne Cavalier, chef du service de chimie clinique au CHU de Liège, pour l'accueil et l'opportunité qu'il m'a offert de pouvoir travailler durant ce stage dans son service.

Ensuite, je tiens à exprimer toute ma reconnaissance et à remercier grandement mes promotrices, madame Laurence Lutteri, responsable du laboratoire de biochimie spécialisée du CHU de Liège, et madame Mélanie Monfort, responsable du laboratoire d'immuno-hématologie du CHU de Liège, de m'avoir accordé leur confiance, de m'avoir si bien accueilli au sein de leur laboratoire, ainsi que pour leurs nombreux conseils, leur disponibilité face à toutes mes interrogations et leur aide précieuse tout au long du stage et lors de la rédaction de mon mémoire.

Je souhaite également dire merci à toute l'équipe des laboratoires de biochimie spécialisée et d'immuno-hématologie du CHU de Liège pour leur accueil chaleureux, leur gentillesse, leur coopération et leurs conseils indispensables. Toutes ces personnes m'ayant mis dans les meilleures conditions pour mener à bien mon travail.

Enfin, je tiens à remercier vivement mes parents, pour leur soutien tout au long de mes études ainsi que toutes les personnes qui m'ont conseillé et relu lors de la rédaction de ce mémoire.

## Table des matières

Remerciements .....	3
Table des matières .....	4
Table des figures .....	6
Table des tableaux .....	6
Objectifs du travail .....	7
1. Introduction .....	8
1.1. Le myélome multiple .....	8
1.2. Les traitements .....	12
1.3. Les tests de diagnostic et de suivi du myélome .....	15
1.4. Les tests pré-transfusionnels .....	16
1.5. Les interférences de la thérapie anti-CD38 dans l'interprétation des résultats biologiques .....	18
2. Matériel et méthodes .....	20
2.1. L'immunofixation .....	20
2.1.1. Principe de l'analyse .....	20
2.1.2. Échantillonnage .....	20
2.1.3. Matériel et réactifs .....	21
2.1.4. Protocole expérimental .....	23
2.1.5. Analyse des données .....	26
2.2. La recherche d'anticorps irréguliers .....	27
2.2.1. Principe de la technique .....	27
2.2.2. Échantillonnage .....	28
2.2.3. Matériel et réactifs .....	29
2.2.4. Protocole expérimental .....	30
2.2.5. Analyse des données .....	33
3. Résultats .....	34
3.1. L'immunofixation .....	34
3.2. La recherche d'anticorps irréguliers .....	35
3.2.1. Validation de la méthode de traitement des globules rouges au DTT .....	35
3.2.2. Étude de la stabilité des globules rouges traitées au DTT .....	35

4.	Discussion .....	36
4.1.	L'immunofixation.....	36
4.2.	La recherche d'anticorps irréguliers .....	38
4.2.1.	Validation de la méthode de traitement des globules rouges au DTT .....	38
4.2.2.	Étude de la stabilité des globules rouges traitées au DTT.....	39
5.	Conclusion et perspectives .....	41
6.	Bibliographie.....	42
7.	Annexes .....	45

## Table des figures

Figure 1 - Classification du myélome multiple (The Binding Site, 2015).....	8
Figure 2 - Phases de la maladie (Durie, 2016).....	9
Figure 3 - Myélogramme (UMVF, 2010).....	10
Figure 4 - Structure générale des cinq classes majeures d'anticorps (Absolute Antibody).....	11
Figure 5 - Mécanismes d'actions du daratumumab (Sanchez <i>et al.</i> , 2016).....	13
Figure 6 - Profil électrophorétique normal (Le Carrer, 2005).....	15
Figure 7 - Profil de gammopathie monoclonale de mobilité $\gamma$ (Le Carrer, 2005).....	15
Figure 8 - Sérum normal (Le Carrer, 2005).....	15
Figure 9 - Ig G lambda monoclonale (Le Carrer, 2005).....	15
Figure 10 - Règles de compatibilité ABO pour les concentrés érythrocytaires et plaquettaires (Gerard, 2010).....	16
Figure 11 - Test de Coombs indirect.....	17
Figure 12 - Traitement des hématies au DTT (SRNJTS, 2016).....	19
Figure 13 - Appareil HYDRASYS 2 de SEBIA®.....	21
Figure 14 - Positions de dépôt des applicateurs SEBIA®.....	24
Figure 15 - Puit pour RAI (L'italien, 2008).....	27
Figure 16 - ID-Card Reverse Grouping with Antibody Screening (BIO-RAD®).....	29
Figure 17 - ID-Card LISS/Coombs (BIO-RAD®).....	29
Figure 18 - Score d'agglutination (L'italien, 2008).....	33
Figure 19 - Immunofixation avec et sans Hydrashift.....	34
Figure 20 - RAI avant et après traitement au DTT.....	35

## Table des tableaux

Tableau 1 - Critères de réponse selon IMWG.....	10
Tableau 2 - Classes d'immunoglobulines.....	11
Tableau 3 - Calendrier d'administration du DARZALEX® (EMA, 2017).....	14
Tableau 4 - Système de groupe sanguin ABO.....	16
Tableau 5 - Transfusion de GR (Gerard, 2010).....	16
Tableau 6 - Dilutions des échantillons.....	23
Tableau 7 - Schéma de dépôt des échantillons.....	23
Tableau 8 - Schéma de dépôt de l'anti-daratumumab.....	23
Tableau 9 - Schéma de dépôt des antisérums.....	24
Tableau 10 - Préparation des PBS.....	30
Tableau 11 - Immunofixations avec et sans hydrashift.....	34
Tableau 12 - RAI avant et après le traitement au DTT.....	35
Tableau 13 - Étude de stabilité des globules rouges traités au DTT.....	35

## Objectifs du travail

La récente arrivée sur le marché des médicaments du daratumumab, un anticorps monoclonal anti-CD38 utilisé dans le traitement du myélome multiple récidivant et réfractaire, s'est faite remarquée dans plusieurs laboratoires de biologie clinique par l'apparition d'interférences lors de l'immunofixation des protéines sériques et de la recherche d'anticorps anti-érythrocytaires irréguliers.

Dès lors, ce travail a consisté d'une part, à tester au laboratoire de biochimie spécialisée du CHU de Liège les immunofixations avec le kit Hydrashift commercialisé par SEBIA®, afin d'éventuellement l'ajouter aux analyses de routine réalisées au laboratoire.

D'autre part, au laboratoire d'immuno-hématologie du CHU de Liège, le travail a eu pour but d'optimiser la technique du traitement des globules rouges au dithiothréitol (DTT), celle-ci donnant souvent des résultats insatisfaisants et peu reproductibles, et ensuite d'étudier la stabilité de ces cellules traitées dans le temps en vue de définir leur durée de validité.

# 1. Introduction

## 1.1. Le myélome multiple

Selon la Fondation Internationale du Myélome, en 2016, près de 230 000 personnes étaient atteintes du myélome dans le monde, ce qui fait de cette pathologie le 2<sup>e</sup> cancer du sang le plus courant. Il représente environ 12 % des cancers hématologiques diagnostiqués. L'incidence varie d'un pays à l'autre, mais la maladie se manifeste le plus fréquemment chez la personne âgée (Le carrer, 2005 ; Nau et Lewis, 2008).

Les patients atteints de myélome multiple peuvent être subdivisés en types sécrétoires et non-sécrétoires en fonction de la présence ou de l'absence d'une protéine monoclonale détectable (The Binding Site, 2015). Le type non-sécrétoire représente seulement 2 %, la plupart des patients sécrétant des immunoglobulines monoclonales intactes (85 %), majoritairement de type Ig G (Figure 1).

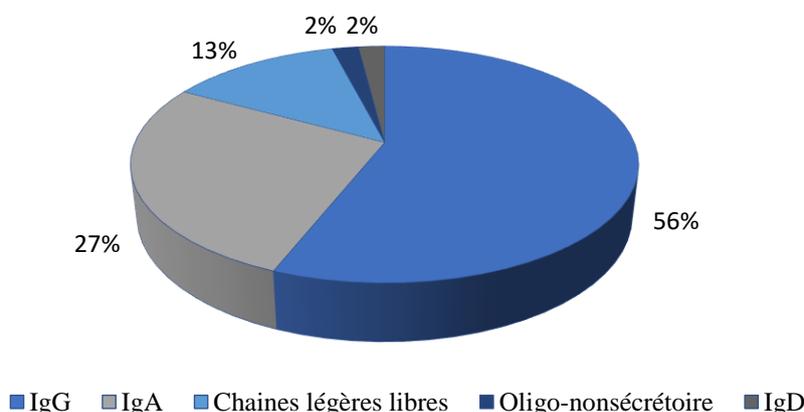


Figure 1 - Classification du myélome multiple (The Binding Site, 2015).

Les nouveaux critères établis par le Groupe de Travail International sur le Myélome (IMWG) en 2014 pour poser le diagnostic du myélome multiple reprennent les diverses atteintes organiques identifiées comme critère « CRAB », mais également d'autres troubles cliniques directement liés à l'évolution de la pathologie telles que des infections ou une neuropathie.

Les critères « CRAB » sont définis comme :

- **C**alcium : hypercalcémie (> 10 mg/dL) ;
- **R**enal : insuffisance rénale (créatinine > 2 mg/dL ou clairance à la créatinine < 40 mL/min) ;
- **A**nemia : anémie (hémoglobine < 10 g/dL ou diminution > 2 g/dL par rapport au taux normal d'hémoglobine du patient) ;
- **B**one : lésions osseuses (une ou plusieurs lésions ostéolytiques à la radiographie du squelette, au scanner du corps entier à faible dose ou au PET/CT scan).

Sur base des critères « CRAB », des analyses de laboratoire et des techniques d'imagerie, trois stades ont été définis.

La figure 2 permet de distinguer les différentes phases de la maladie. Le stade le plus précoce est appelé « gammopathie monoclonale de signification indéterminée (MGUS) ». C'est une entité pré-maligne asymptomatique qui peut se transformer en myélome multiple. Le « myélome multiple indolent » est le stade intermédiaire entre le MGUS et le myélome multiple. Il est également asymptomatique, mais présente un plus haut risque d'évolution vers le myélome multiple. La distinction entre le myélome indolent et le MGUS est basée sur le taux du composant monoclonal et sur la plasmocytose médullaire. Le myélome multiple est le stade symptomatique le plus avancé de la maladie (Caers *et al.*, 2014 ; Rajkumar *et al.*, 2014 ; Rajkumar, Landgren and Mateos, 2015).

Définitions des différents stades de la maladie :

- Gammopathie monoclonale de signification indéterminée (MGUS) ;
  - o Présence d'immunoglobuline monoclonale dans le sérum < à 3 g/dL,
  - o Plasmocytes monoclonaux dans la moelle osseuse < 10 %,
  - o Absence de critères « CRAB » ou d'autres indicateurs du myélome actif ;
  
- Myélome multiple indolent ;
  - o Présence d'immunoglobuline monoclonale dans le sérum > à 3 g/dL,
  - o Plasmocytes monoclonaux dans la moelle osseuse entre 10 % et 60 %,
  - o Absence de critères « CRAB » ou d'autres indicateurs du myélome actif ;
  
- Myélome multiple ;
  - o Présence d'immunoglobuline monoclonale dans le sérum > à 3 g/dL,
  - o Plasmocytes monoclonaux dans la moelle osseuse > 60 %,
  - o Au moins un critère CRAB et/ou un autre indicateur du myélome actif.

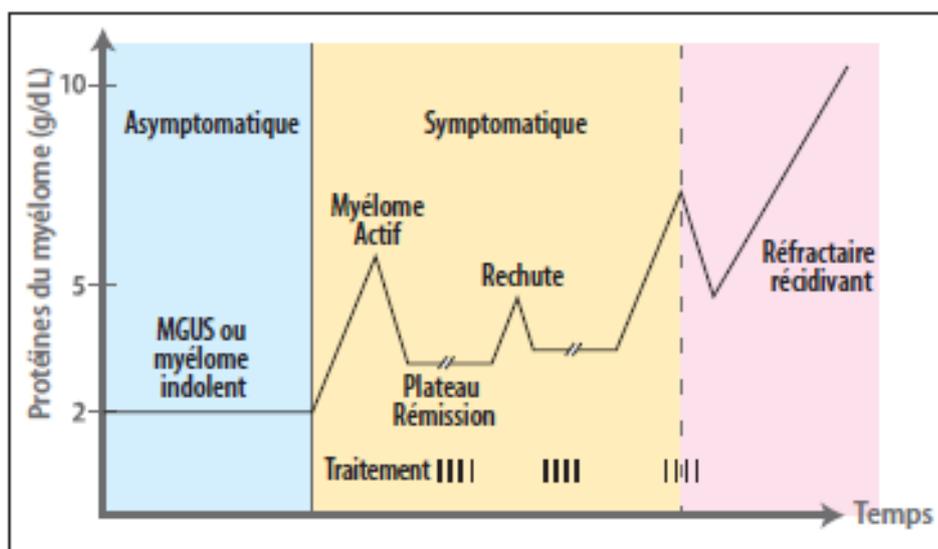


Figure 2 - Phases de la maladie (Durie, 2016).

En plus des critères de diagnostic, le Groupe de Travail International sur le Myélome (IMWG) a établi des critères de références (Tableau 1) définissant la réponse clinique au traitement (Kumar *et al.*, 2016 ; Landgren et Rajkumar, 2016)

Tableau 1 - Critères de réponse selon IMWG.

Réponse complète stricte	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Réponse complète,</li> <li>- Rapport des chaînes légères libres normal,</li> <li>- Absence de cellules clonales dans la biopsie de moelle osseuse par immunohistochimie.</li> </ul>
Réponse complète	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Immunofixation négative dans le sérum et l'urine,</li> <li>- Disparition de tout plasmocytome des tissus mous,</li> <li>- &lt; 5 % de plasmocytes dans la moelle osseuse.</li> </ul>
Très bonne réponse partielle	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Protéines sérique et urinaire détectables par immunofixation, mais pas par électrophorèse ou réduction de <math>\geq 90\%</math> de la protéine sérique,</li> <li>- Taux de protéine monoclonale dans l'urine &lt; 100 mg/24h.</li> </ul>
Réponse partielle	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <math>\geq 50\%</math> de réduction de la protéine sérique et réduction du taux de protéine urinaire de 24h par <math>\geq 90\%</math> ou &lt; 200 mg par 24h ;</li> <li>- Si les protéines sérique et urinaire ne sont pas mesurables, une baisse de <math>\geq 50\%</math> de la différence entre les taux de chaînes légères libres impliquées et non impliquées est requise ;</li> <li>- Si ni les protéines sérique et urinaire, ni les chaînes légères libres sérique ne sont pas mesurables, une baisse de <math>\geq 50\%</math> des cellules plasmocytaires est requise à condition que le pourcentage de plasmocytes médullaires au départ soit <math>\geq 30\%</math>. En plus de ces critères, s'ils sont présents au départ, une réduction de 50 % de la taille des plasmocytomes des tissus mous est également requise.</li> </ul>
Réponse minimale	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <math>\geq 25\%</math> mais <math>\leq 49\%</math> de réduction de la protéine sérique et réduction de la protéine urinaire de 24h de 50 à 89 % ,</li> <li>- En plus des critères énumérés, s'ils sont présents au départ, une réduction de <math>\geq 50\%</math> de la taille des plasmocytomes des tissus mous est également requise.</li> </ul>

Une gammopathie monoclonale, dont fait partie le myélome multiple, est un trouble dans lequel les plasmocytes malins s'accumulent dans la moelle osseuse. La prolifération d'un seul clone est caractérisée par une production excessive d'une immunoglobuline monoclonale ou paraprotéine, habituellement Ig G ou Ig A (Bataille et Harousseau, 1997 ; International Myeloma Working Group, 2003 ; Le Carrer, 2005).

Le plasmocyte est le stade final de différenciation d'un lymphocyte B. C'est une cellule lymphoïde sécrétrice d'anticorps soluble, contrairement à d'autres lymphocytes B qui expriment ces immunoglobulines à leur surface membranaire. Présent naturellement dans la moelle osseuse, les ganglions lymphatiques ou la rate, ils ne sont normalement pas retrouvés dans le sang. C'est une cellule aisément reconnaissable, car elle présente un cytoplasme très basophile ainsi qu'un noyau ovalaire et excentré (Figure 3). Ces globules blancs participent activement à l'immunité humorale (Kindt, Goldsby et Osborne, 2008 ; UMVF, 2010).

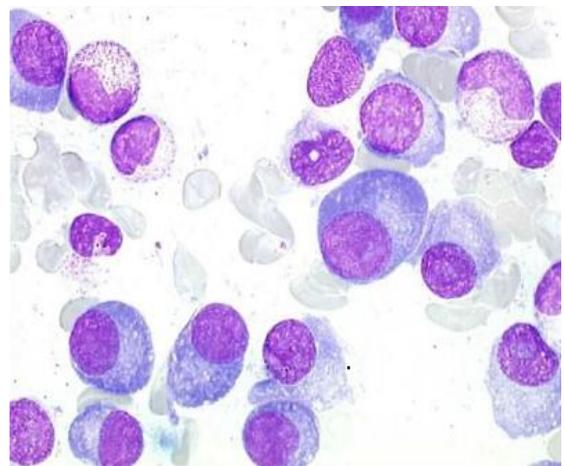


Figure 3 - Myélogramme (UMVF, 2010).

Les molécules d'anticorps ont une structure commune (Figure 4) formées de quatre chaînes polypeptidiques. Cette structure particulière est constituée de deux chaînes légères (L) identiques et de deux chaînes lourdes (H) identiques. Les différentes chaînes sont liées entre elles par des ponts disulfures et par un ensemble d'interactions non-covalentes (Kindt, Goldsby et Osborne, 2008). Les parties N-terminales de l'immunoglobuline constituent la région variable ( $V_L$  et  $V_H$ ) pour la reconnaissance des antigènes tandis que les parties C-terminales constituent la région constante ( $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$ ,  $C_{H3}$  et  $C_L$ ) porteuse de fonctions effectrices (Nau et Lewis, 2008). Il existe cinq classes d'immunoglobulines chez l'homme, caractérisées par cinq chaînes lourdes différentes (Tableau 2).

Tableau 2 - Classes d'immunoglobulines.

Classe	Chaînes lourdes	Chaînes légères
Ig G	$\gamma$	$\kappa$ et $\lambda$
Ig A	$\alpha$	$\kappa$ et $\lambda$
Ig M	$\mu$	$\kappa$ et $\lambda$
Ig E	$\epsilon$	$\kappa$ et $\lambda$
Ig D	$\delta$	$\kappa$ et $\lambda$

La figure 4 présente la structure des différentes classes d'anticorps une fois sécrétés. Les immunoglobulines de types Ig G, Ig D et Ig E se retrouvent toujours sous forme monomérique. En revanche, les Ig A peuvent être sécrétés sous forme de mono- di- et trimère, tandis que les Ig M sont sécrétés sous forme de pentamère (Le Carrer, 2005).

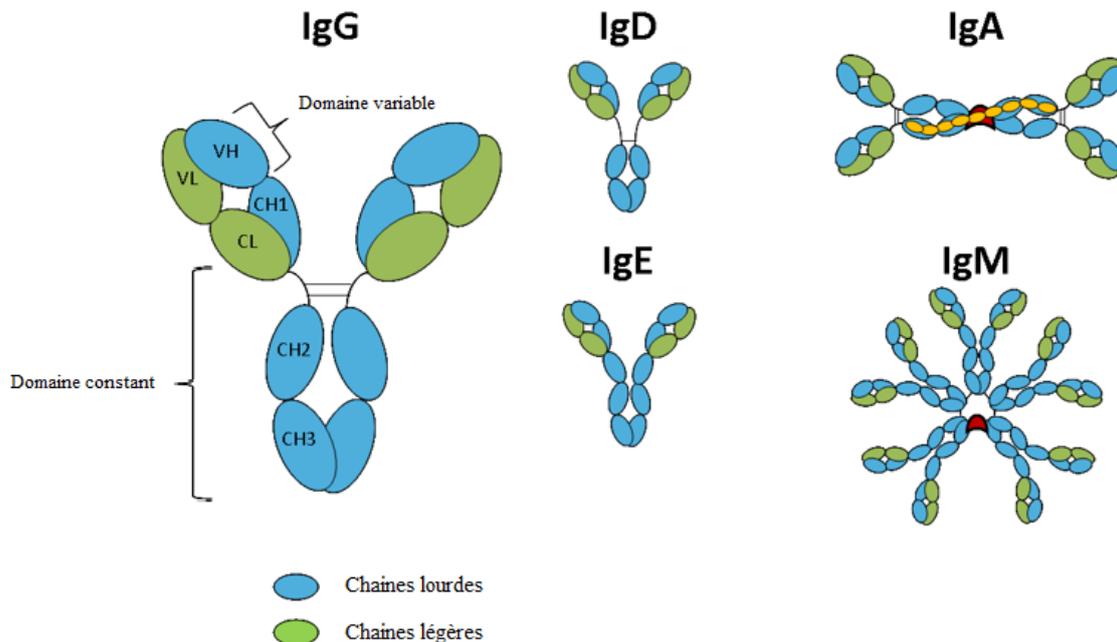


Figure 4 - Structure générale des cinq classes majeures d'anticorps (Absolute Antibody).

## 1.2. Les traitements

Depuis plusieurs décennies, la survie des patients atteints du myélome multiple a pratiquement doublé. Cette brillante avancée est principalement due aux développements de nouvelles classes de médicaments que sont les inhibiteurs du protéasomes (bortezomib, carfilzomib, ixazomib) et les immunomodulateurs (thalidomide, lénalidomide), ceux-ci faisant actuellement partie du *standard of care* pour traiter le myélome multiple (Dimopoulos *et al.*, 2016 ; Touzeau et Moreau, 2017).

Cependant, des rechutes peuvent survenir même après une rémission complète. Les premières lignes de traitement devenant insuffisantes, de nouvelles thérapies ont dû être envisagées pour traiter ces personnes atteintes d'un myélome récidivant et réfractaire aux traitements classiques (Dimopoulos *et al.*, 2016 ; Touzeau et Moreau, 2017). La découverte d'autres cibles a conduit à la conception de nouveaux médicaments. Parmi ceux-ci, il y a les anticorps monoclonaux (daratumumab, élotuzumab), qui font partie des composés thérapeutiques les plus étudiés en oncologie. Ils représentent aujourd'hui une classe importante d'agents pharmacologiques avec un mécanisme d'action unique pour traiter le myélome multiple (Afifi, Michael et Lesokhin, 2017).

Le daratumumab (DARZALEX®) fait partie de la classe pharmacothérapeutique des antinéoplasiques. C'est un anticorps monoclonal humain de type Ig G1  $\kappa$  qui cible le CD38. Le CD38 est une glycoprotéine transmembranaire présente à la surface des cellules lymphoïdes et myéloïdes. Il y régule le flux de calcium cytoplasmique, médie la transduction du signal et possède une activité enzymatique. Il est fortement et uniformément exprimé sur les cellules du myélome, alors que l'on en retrouve relativement peu sur les cellules lymphoïdes et myéloïdes normales et dans certains tissus d'origine non-hématopoïétique. Il est également faiblement exprimé sur les globules rouges et les plaquettes. Ce sont ces propriétés propres qui en ont fait une cible potentielle dans le traitement du myélome (de Weers *et al.*, 2011 ; Lokhorst *et al.*, 2015 ; Jung *et al.*, 2017).

La destruction des cellules myélomateuses par le daratumumab peut se faire par différents mécanismes (Figure 5). Il peut induire la lyse des cellules tumorales grâce à une cytotoxicité dépendante des anticorps (ADCC), d'une cytotoxicité dépendante du complément (CDC) et d'une phagocytose cellulaire dépendante des anticorps (ADCP) au sein des tumeurs malignes exprimant le CD38. Le daratumumab induit également l'apoptose par le mécanisme de *cross-linking* médié par le fragment constant de l'immunoglobuline. De plus, il module l'activité enzymatique du CD38 et des effets immunomodulateurs ont été également décrits à l'aide du séquençage ADN des récepteurs des lymphocytes T qui a confirmé l'augmentation de la clonalité des lymphocytes T lors du traitement par le daratumumab (de Weers *et al.*, 2011 ; Afifi, Michael et Lesokhin, 2016 ; Dimopoulos *et al.*, 2016 ; Sanchez *et al.*, 2016 ; European Medicines Agency, 2017 ; Jung *et al.*, 2017).

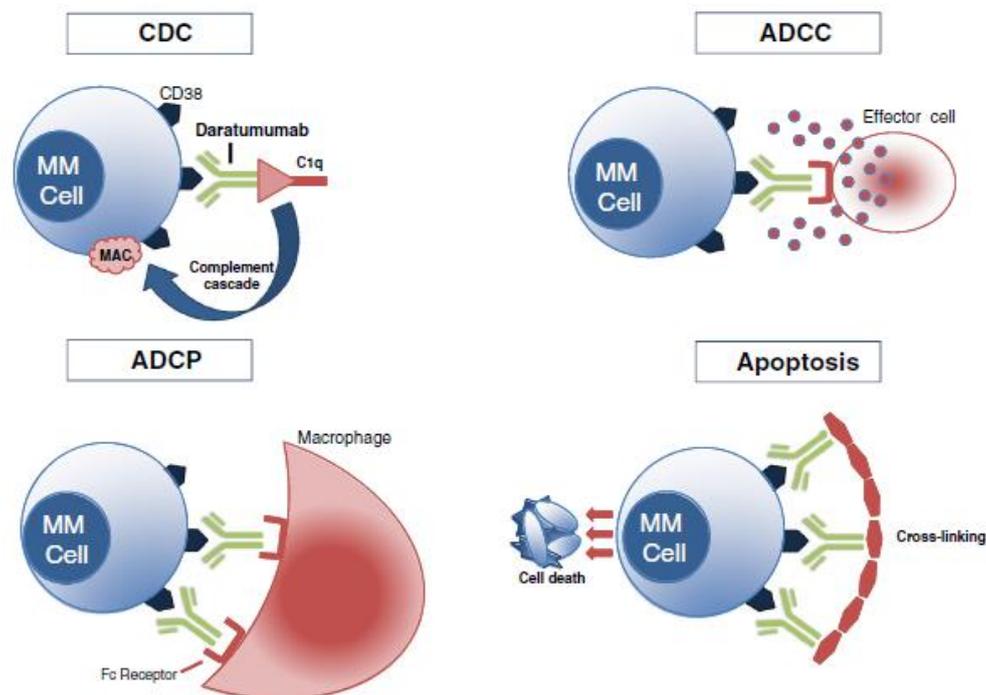


Figure 5 - Mécanismes d'actions du daratumumab (Sanchez *et al.*, 2016).

Le daratumumab présente un profil de sécurité élevé, même chez les patients âgés. Les effets indésirables les plus fréquents décrits lors des études cliniques sont la fatigue, l'anémie, la nausée, la thrombocytopénie, la neutropénie, la douleur dorsale et la toux (Lonial *et al.*, 2016 ; Cejalvo, Ribas et de la Rubia, 2017 ; Jung *et al.*, 2017). Une réaction liée à la perfusion (RLP) est parfois observée chez des patients, majoritairement lors de la première perfusion. Les symptômes prédominants sont une congestion nasale, une toux, une irritation de la gorge, des frissons, des vomissements et des nausées. Cependant, des réactions sévères peuvent également se produire (des bronchospasmes, des hypoxies, des dyspnées, des hypertensions, des œdèmes laryngés ou des œdèmes pulmonaires). La RLP peut être réduite par la prise d'une médication pré-perfusion ou d'une médication post-perfusion à base d'antihistaminiques, d'antipyrétiques et/ou de corticoïdes (Cejalvo, Ribas et de la Rubia, 2017 ; European Medicines Agency, 2017).

La dose recommandée est de 16 mg/kg de masse corporelle, administrée en perfusion intraveineuse. La posologie varie selon l'indication du médicament. Le tableau 3 compare le calendrier d'administration habituel du DARZALEX® en monothérapie et en association avec le lénalidomide (traitement par cycles de 4 semaines) avec le calendrier d'administration modifié de DARZALEX® en association avec le bortézomib (traitement par cycles de 3 semaines).

Le lénalidomide (REVLIMID®) et le bortézomib (VELCADE®) sont deux médicaments utilisés en première ligne pour traiter le myélome. Le lénalidomide possède des propriétés anti-néoplasiques, anti-angiogènes, pro-érythropoïétiques et immunomodulatrices, tandis que le bortézomib, en inhibant le protéasome, provoque la mort des cellules cancéreuses.

Le DARZALEX® est indiqué (European Medicines Agency, 2017) :

- En monothérapie, pour le traitement des patients adultes atteints d'un myélome multiple en rechute et réfractaire, pour lesquels les traitements antérieurs incluaient un inhibiteur du protéasome et un agent immunomodulateur et dont la maladie a progressé lors du dernier traitement ;
- En association avec le lénalidomide et la dexaméthasone, ou le bortézomib et la dexaméthasone, pour le traitement des patients adultes atteints d'un myélome multiple ayant reçu au moins un traitement antérieur.

Tableau 3 - Calendrier d'administration du DARZALEX® (European Medicines Agency, 2017).

	<b>Semaines</b>	<b>Fréquence d'administration</b>
<b>DARZALEX® monothérapie ou association avec le lénalidomide</b>	Semaines 1 à 8	Hebdomadaire (8 doses au total)
	Semaines 9 à 24	Toutes les deux semaines (8 doses au total)
	A partir de la semaine 25	Toutes les quatre semaines
<b>DARZALEX® en association avec le bortézomib</b>	Semaines 1 à 9	Hebdomadaire (9 doses au total)
	Semaines 10 à 24	Toutes les trois semaines (5 doses au total)
	A partir de la semaine 25	Toutes les quatre semaines

### 1.3. Les tests de diagnostic et de suivi du myélome

Les laboratoires de chimie clinique, grâce à leur technique d'électrophorèse capillaire et d'immunofixation sur gel, vont permettre non seulement le diagnostic, le suivi de l'évolution de la maladie, mais aussi le suivi de la réponse du patient au traitement.

L'électrophorèse capillaire permet la visualisation et la quantification des protéines dans le sérum d'un patient grâce au tracé d'un graphique (Figure 6). Celui-ci exprime le profil électrophorétique en séparant les différentes classes protéiques présentes chez un patient. Le plus grand pic étant l'albumine, protéine majoritaire du sérum, suivie des  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ -globulines. Un pic anormal dans la zone des  $\gamma$ -globulines (Figure 7) permet de repérer facilement une gammopathie, mais il n'est pas rare de trouver un pic anormal en  $\alpha$  ou en  $\beta$  correspondant également à une gammopathie (McCudden *et al.*, 2017 ; Smith, Raines et Schneider, 2017).

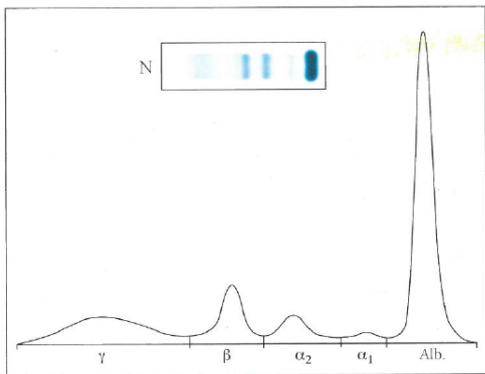


Figure 6 - Profil électrophorétique normal (Le Carrer, 2005).

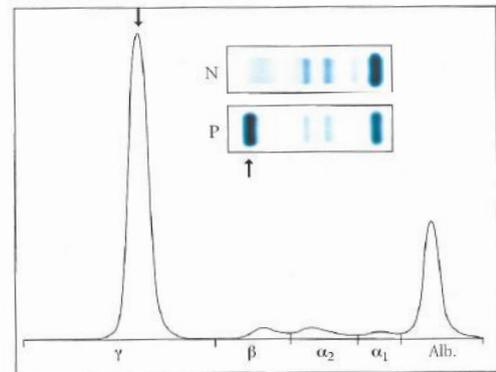


Figure 7 - Profil de gammopathie monoclonale de mobilité  $\gamma$  (Le Carrer, 2005).

L'analyse seule du profil électrophorétique n'est pas suffisante pour poser le diagnostic d'une gammopathie monoclonale. L'immunofixation sur gel d'agarose (Figure 8 et Figure 9) est une technique qualitative qui met en évidence la chaîne lourde et la chaîne légère de l'immunoglobuline monoclonale présente en excès dans le sérum du patient. Cette analyse est nécessaire pour distinguer le type de myélome et elle est notamment utilisée par les cliniciens pour définir la réponse du patient au traitement (Le carrer, 2005 ; McCudden *et al.*, 2017 ; Smith, Raines et Schneider, 2017).

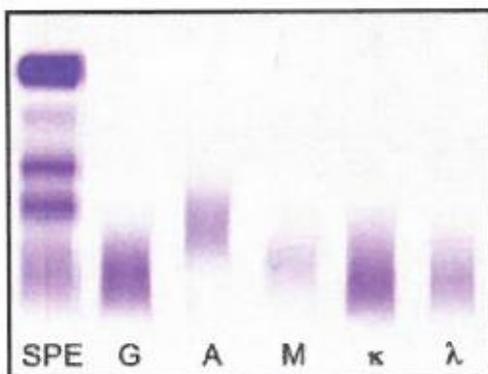


Figure 8 - Sérums normaux (Le Carrer, 2005).

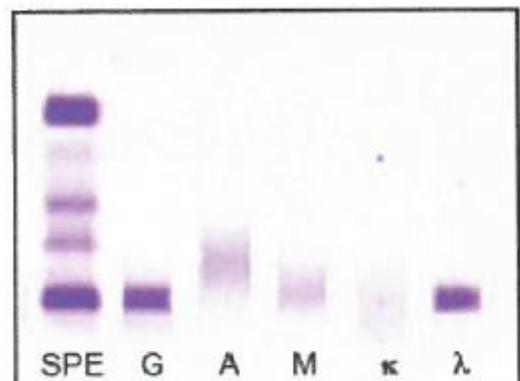


Figure 9 - Ig G lambda monoclonale (Le Carrer, 2005).

## 1.4. Les tests pré-transfusionnels

L'anémie fait partie des atteintes caractéristiques du myélome et une transfusion sanguine peut parfois s'avérer nécessaire chez le patient. Pour éviter tout risque d'accident immunologique lié à la transfusion, il est vital de faire un test de compatibilité pré-transfusionnelle avant la transfusion dans les laboratoires d'immuno-hématologie.

En effet, en cas de transfusion incompatible, l'interaction entre les antigènes présents sur les globules rouges transfusés et les anticorps correspondants présents dans le sérum du receveur peut provoquer une « réaction transfusionnelle ». La réaction transfusionnelle *in vivo* peut aller jusqu'à l'hémolyse des globules rouges transfusés. Les conséquences d'une incompatibilité transfusionnelle sont très variables. Elles peuvent être indétectables ou bien bénignes (température, frissons, hyperthermie, douleurs lombaires), mais elles peuvent aussi être gravissimes : blocage rénal, œdème aigu du poumon, décès (Brand, 2016 ; Delaney *et al.*, 2016 ; Long et Koyfman, 2016 ; Savage, 2016 ; Frazier *et al.*, 2017).

Les globules rouges portent une multitude d'antigènes de groupes sanguins, répartis en 36 systèmes comprenant plus de 600 antigènes différents. Cependant, ils n'ont pas tous la même importance en pratique transfusionnelle. Les antigènes sont groupés en systèmes génétiquement indépendants les uns des autres. Les plus importants sont les systèmes ABO, Rh, Kell, Lewis, Duffy, Kidd et MNSs. Les antigènes de groupe sanguin présents sur les globules rouges sont immunogènes (à des degrés divers suivant le système de groupe sanguin), ceux-ci pouvant induire la formation d'anticorps (Dean, 2005).

La règle absolue lorsque du sang doit être transfusé est de respecter la compatibilité dans le système ABO (Figure 10), chaque individu possédant des anticorps réguliers correspondant aux antigènes ABO qu'ils ne possèdent pas (Tableau 4 et 5). À ces anticorps réguliers, peuvent s'ajouter des anticorps irréguliers produits par le receveur, le plus souvent suite à une stimulation antigénique (grossesse, transfusion, greffe, etc.). Il est essentiel de rechercher la présence de ce type d'anticorps avant la transfusion afin d'éviter toute réaction transfusionnelle lors de celle-ci (Gerard, 2010).

Tableau 4 - Système de groupe sanguin ABO.

Groupe sanguin	A	B	AB	O
Antigènes sur les GR	Antigène A	Antigène B	Antigène A et B	Aucun
Anticorps dans le sérum	Anti-B	Anti-A	Aucun	Anti-A et Anti-B

Tableau 5 - Transfusion de GR (Gerard, 2010).

Groupe receveur	Peut recevoir des globules rouges			
O	O			
A	A	O		
B	B	O		
AB	AB	A	B	O

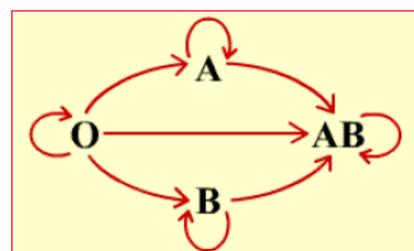


Figure 10 - Règles de compatibilité ABO pour les concentrés érythrocytaires et plaquettaire (Gerard, 2010).

Un anticorps est dit « irrégulier » lorsqu'il n'est pas systématiquement présent chez des personnes ne présentant pas l'antigène correspondant. La recherche d'anticorps irréguliers (RAI), appelé aussi « test de Coombs indirect » (Figure 11), permet, grâce à l'antiglobuline humaine, la mise en évidence et l'identification de la spécificité d'anticorps anti-érythrocytaires présents dans le sérum de patients (Cohen-Bacrie *et al.*, 2014).

La réalisation de cet examen consiste à faire réagir le sérum du patient (receveur) sur un certain nombre de globules rouges phénotypés, c'est-à-dire dont les différents antigènes de groupes sanguins sont connus. Une agglutination sera provoquée si un anticorps présent dans le sérum se fixe sur l'antigène correspondant présent sur les hématies-test. S'il n'y a pas de fixation d'anticorps sur un antigène, il n'y a pas d'agglutination (Chabrières, 2006).

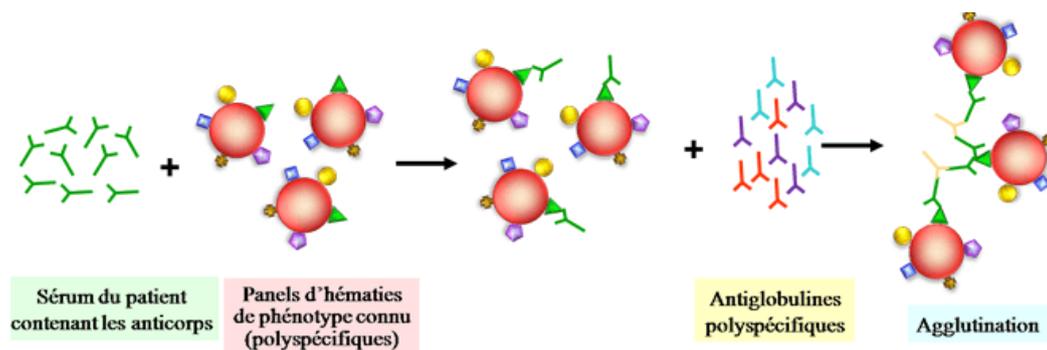


Figure 11 - Test de Coombs indirect.

### 1.5. Les interférences de la thérapie anti-CD38 dans l'interprétation des résultats biologiques

Le daratumumab doit être bien connu du biologiste médical, des interférences pouvant entraver le résultat de l'analyse ont été décrites.

Tout d'abord, par sa structure d'anticorps humain Ig G1  $\kappa$ , le daratumumab interfère à la fois dans l'électrophorèse protéique et dans l'immunofixation des protéines. Cette dernière faisant partie des critères de réponse (Tableau 1), la présence d'une bande monoclonale surnuméraire Ig G1  $\kappa$  peut conduire à une mauvaise interprétation du résultat chez les patients ayant un myélome multiple à Ig G monoclonale et de chaîne légère kappa. L'évolution de la réponse complète peut donc être sous-estimée chez les patients traités par l'anti-CD38 (McCudden *et al.*, 2016 ; Murata *et al.*, 2016 ; Sanchez *et al.*, 2016 ; Van De Donk *et al.*, 2016 ; Touzeau et Moreau, 2017 ; Rabut, Castro-Fernandez et Le Gall, 2017).

La méthode DIRA (*Daratumumab Immunofixation Reflex Assay*) a été développée pour atténuer l'interférence provoquée par le daratumumab lors de l'immunofixation. Cette technique est basée sur l'ajout d'un anticorps anti-daratumumab qui va se lier au médicament et le déplacer hors de la zone des  $\gamma$ -globulines (McCudden *et al.*, 2016 ; Sanchez *et al.*, 2016 ; Van De Donk *et al.*, 2016 ; Touzeau et Moreau, 2017).

Ensuite, par son activité anti-CD38, le daratumumab interfère à la fois dans la recherche et l'identification des anticorps anti-érythrocytaires irréguliers en se comportant comme un allo-anticorps. En effet, les globules rouges exprimant l'antigène CD38 en faible quantité, le médicament provoque l'agglutination de toutes les hématies-test et donc une fausse positivité avec toutes les cellules de telle sorte qu'il est impossible de distinguer le médicament d'un allo-anticorps de groupe sanguin éventuellement présent (Oostendorp *et al.*, 2015 ; Chapuy *et al.*, 2016 ; Sanchez *et al.*, 2016 ; De Vooght, Oostendorp et van Solinge, 2016 ; Touzeau et Moreau, 2017 ; Rabut, Castro-Fernandez et Le Gall, 2017).

Pour éliminer l'interférence du daratumumab lors de la recherche des anticorps irréguliers, la méthode utilisant du dithiothréitol (DTT) pour traiter les globules rouges (Figure 12) a été internationalement validée (Chapuy *et al.*, 2016). En effet, le DTT dénature le CD38 présent en faible quantité sur les hématies, empêchant le daratumumab de se fixer dessus et de réagir avec l'antiglobuline humaine (Hannon et Clarke, 2015 ; Chapuy *et al.*, 2016 ; Sanchez *et al.*, 2016 ; Touzeau et Moreau, 2017 ; Rabut, Castro-Fernandez et Le Gall, 2017 ; Chari *et al.*, 2017 ; Subramaniyan, Satheshkumar et Pereira, 2017).

La technique de traitement des globules rouges au DTT est cependant longue, fastidieuse et très peu reproductible. La méthode utilisée au laboratoire d'immuno-hématologie ne donnant pas de résultats satisfaisants, une optimisation de celle-ci s'est avérée être nécessaire. Un des facteurs pouvant être responsable est le DTT, cette petite molécule étant fortement sensible au pH.

Le traitement des globules rouges par le DTT a des avantages, mais il est également pourvu de certains inconvénients (Chapuy *et al.*, 2016 ; SRNJTS, 2016).

- Avantages ;
  - Peu onéreuse,
  - Technique internationalement validée et fréquemment utilisée dans les banques de sang et les laboratoires d'immuno-hématologie ;
- Inconvénients ;
  - Destruction totale des antigènes suivants : Kell (KEL), Landsteiner-Wiener (LW), Dombrock (DO), Indian (IN), John Milton Hagen (JMH) et Knops (KN),
  - Destruction partielle des antigènes suivants : l'antigène YT1 du système Cartwright (YT), Lutheran (LU), l'antigène MER2 et l'antigène CROM,
  - Technique longue et fastidieuse,
  - Peu reproductible,
  - Stabilité faible des hématies traitées au DTT.

Les antigènes du système Kell étant détruits par le traitement au DTT, il sera dès lors nécessaire de transfuser les patients avec une poche K négative, un anticorps anti-K n'étant jamais détecté par cette technique (Chapuy *et al.*, 2016). Les autres antigènes détruits par le DTT ayant peu ou pas de signification clinique, il n'est pas nécessaire de sélectionner des poches d'antigènes négatifs.

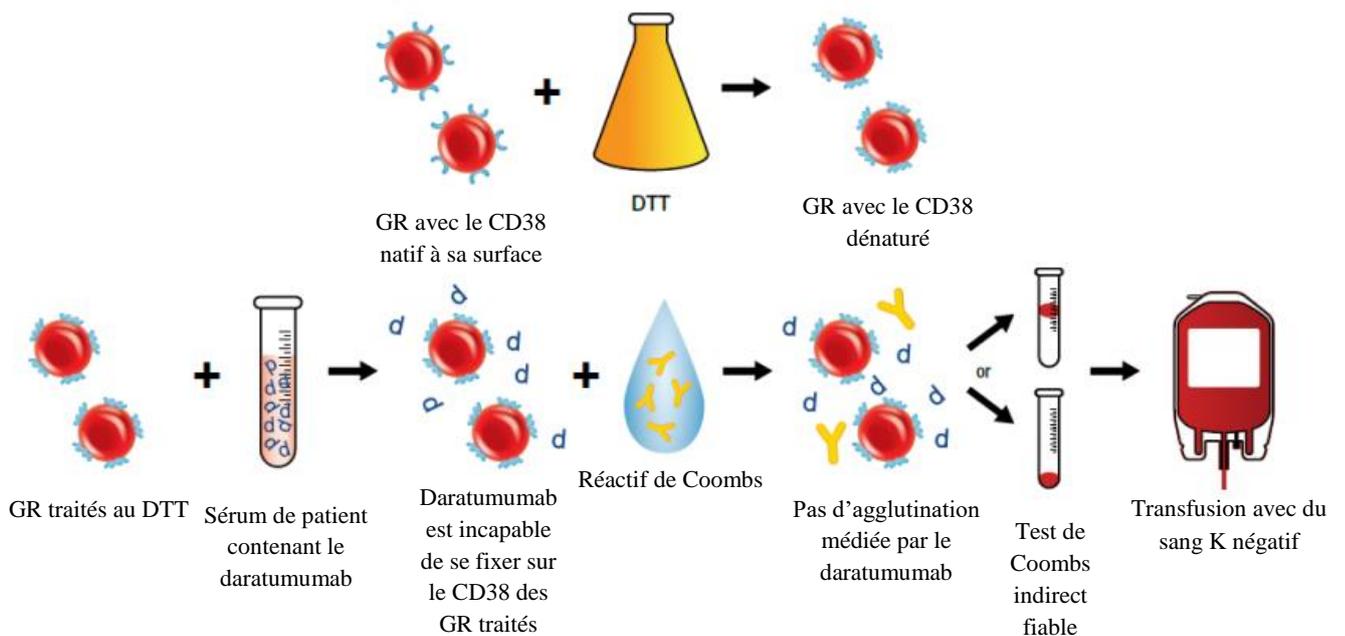


Figure 12 - Traitement des hématies au DTT (SRNJTS, 2016).

## 2. Matériel et méthodes

### 2.1. L'immunofixation

#### 2.1.1. Principe de l'analyse

L'immunofixation est une électrophorèse sur gel d'agarose. Le principe de l'électrophorèse est basé sur le fait qu'une particule chargée, placée dans un champ électrique, migre vers une des électrodes. Cette migration dépend de plusieurs paramètres dont la charge électrique des particules, la puissance du champ électrique et la nature du support utilisé. Cette technique permet l'identification, à l'aide d'antisérum monospécifique, des pics d'immunoglobulines monoclonales observés à l'électrophorèse capillaire. Afin de préciser la nature de la bande monoclonale, l'échantillon est testé sur six pistes. Une piste (ELP) servant de référence grâce à la précipitation par le fixateur de toutes les protéines présentes et cinq autres pistes permettant de caractériser la ou les bandes monoclonales grâce à des anticorps spécifiques anti-chaînes lourdes gamma (Ig G), alpha (Ig A) et mu (Ig M) et anti-chaînes légères kappa et lambda (libres et liées).

Quatre étapes clés lors d'une immunofixation :

- Séparation électrophorétique des protéines sur gel d'agarose ;
- Fixation et immunoprécipitation des protéines séparées par électrophorèse ;
- Élimination des protéines non précipitées par pompage et lavage, les protéines précipitées restent piégées dans le gel ;
- Coloration des protéines et comparaison.

Pour atténuer l'interférence produite par la daratumumab, la firme SEBIA® s'est basée sur la méthode *Daratumumab Immunofixation Reflex Assay* (DIRA) pour développer le kit Hydrashift, compatible avec l'appareil « Hydrasys 2 » de SEBIA®. La méthode DIRA consiste à ajouter à une immunofixation classique un anticorps anti-daratumumab, déposé sur un applicateur supplémentaire. Cet anti-daratumumab entraîne la formation d'un complexe immun avec le médicament présent dans le sérum du patient. Lors de la séparation électrophorétique des protéines, le complexe anti-daratumumab – daratumumab va migrer hors de la zone des  $\gamma$ -globulines pour se retrouver au niveau des  $\alpha 1$ -globulines. Les  $\gamma$ -globulines étant débarrassée de la bande interférente du daratumumab, l'interprétation du résultat peut se faire comme une immunofixation classique.

#### 2.1.2. Échantillonnage

Les échantillons ont été sélectionnés selon deux critères : patients atteints de myélome multiple et sous traitement anti-CD38. Pour diversifier les analyses, les patients choisis ne présentent pas tous la même immunoglobuline monoclonale. Les analyses sont effectuées sur du sérum afin d'éviter d'éventuelles interférences du fibrinogène. Le sérum est obtenu après la coagulation et la centrifugation du sang de patients.

7 échantillons de patients et 1 sérum témoin fourni SEBIA® ont été analysés.

% H/F : 57,1 % de femmes – 42,9 % d'hommes ; Âge moyen :  $74 \pm 10$  ans

### 2.1.3. Matériel et réactifs

#### 2.1.3.1. Appareillage

L'immunofixation dans le sérum est réalisée grâce à l'appareil Hydrasys 2 (Figure 13) de SEBIA®. C'est un appareil multiparamétrique et semi-automatisable qui permet la réalisation de tout type d'électrophorèse sur gel d'agarose. Il est composé de trois compartiments : un qui permet le dépôt des échantillons, la migration à température constante et éventuellement l'incubation. Un deuxième compartiment permet la coloration, la décoloration, le lavage et le séchage des gels, le dernier est un compartiment de scan.



Figure 13 - Appareil HYDRASYS 2 de SEBIA®.

L'appareil Hydrasys 2 de SEBIA® est accompagné d'accessoires indispensables à la réalisation de l'analyse, mais certains réactifs doivent être préparés en laboratoire.

#### 2.1.3.2. Réactifs et accessoires commerciaux

- Une chambre humide ;
- Une barre métallique pour la fixation du masque dynamique ;
- Un masque dynamique et son support ;
- Un kit d'accessoires « HYDRAGEL 2/4 IF violet acide » comprenant ;
  - o Des gels d'agarose,
  - o Des sachets de deux mèches tamponnées,
  - o 1 flacon de 75 mL de colorant violet acide,
  - o 1 flacon de 32 mL de diluant pour sérum,
  - o Un porte applicateur,
  - o Des barrettes antisérum,
  - o Des applicateurs gris,
  - o Des papiers filtres fins et épais ;

- Un coffret d'antisérum et de fixateur à conserver entre 2 et 8°C ;
  - 1 flacon de fixateur,
  - 1 flacon d'immunoglobulines totales de mammifère anti-chaînes lourdes  $\gamma$ ,
  - 1 flacon d'immunoglobulines totales de mammifère anti-chaînes lourdes  $\alpha$ ,
  - 1 flacon d'immunoglobulines totales de mammifère anti-chaînes lourdes  $\mu$ ,
  - 1 flacon d'immunoglobulines totales de mammifère anti-chaînes légères  $\kappa$ ,
  - 1 flacon d'immunoglobulines totales de mammifère anti-chaînes légères  $\lambda$  ;
- Un kit d'accessoires « HYDRASHIFT 2/4 IF violet acide » comprenant ;
  - Des applicateurs verts,
  - Un porte-applicateur Hydrashift,
  - 1 flacon d'anticorps anti-daratumumab,
  - 1 flacon de diluant pour applicateur vert.

*2.1.3.3. Réactifs préparés en laboratoire :*

- Décolorant : 1 flacon de 5 mL doit être complété à 5 L par de l'eau déminéralisée ;
- Solution de lavage Hydrasys : 1 flacon de 80 mL doit être complété à 5 L par de l'eau déminéralisée ;
- Colorant : 1 flacon de 75 mL doit être complété à 300 mL par de l'eau déminéralisée, à n'utiliser que 10 fois.

#### 2.1.4. Protocole expérimental

##### 2.1.4.1. Préparation des échantillons

Les échantillons de sang sont recueillis dans des tubes SEC avec séparateur de caillot et centrifugés au laboratoire afin de récupérer le sérum. Ils doivent être dilués avec du diluant pour sérum avant le dépôt (tableau 6) ;

Tableau 6 - Dilutions des échantillons.

Piste	Sérum (µL)	Diluant (µL)
Profil électrophorétique ELP	20	40
<i>Piste immunologique G</i>	20	100
Autres pistes immunologiques	20	40

- Déposer 10 µL d'échantillons dilués à l'aide d'une micropipette dans les puits des applicateurs gris selon le schéma suivant (tableau 7) en laissant vide les puits 1, 8 et 15 ;

Tableau 7 - Schéma de dépôt des échantillons.

Applicateur 1 (ou 2)															
	Sérum 1							Sérum 2							
Position de dépôt	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Antisérum		ELP	<i>G</i>	A	M	<i>K</i>	L		ELP	<i>G</i>	A	M	<i>K</i>	L	

- Déposer 10 µL d'anticorps *anti-daratumumab* (A-D) dans les puits 3 (G), 6 (K), 10 (G) et 13 (K) et déposer 10 µL de diluant pour applicateur vert (D) dans les autres puits sur l'applicateur vert selon le schéma suivant (tableau 8) en laissant vide les puits 1, 8 et 15 ;

Tableau 8 - Schéma de dépôt de l'anti-daratumumab.

Applicateur 1 (ou 2)															
	Sérum 1							Sérum 2							
Position de dépôt	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Antisérum		D	<i>A-D</i>	D	D	<i>A-D</i>	D		D	<i>A-D</i>	D	D	<i>A-D</i>	D	

- Placer les applicateurs dans la chambre humide, dents vers le haut. Laisser diffuser pendant 5 minutes, après le dépôt du dernier échantillon.

##### 2.1.4.2. Préparation de la migration

- Mettre l'appareil Hydrasys 2 sous tension ;
- Sélectionner le programme de migration « 2/4 IF MS/MD » ;
- Ouvrir le capot et relever les chariots porte-applicateurs et portes électrodes ;
- Positionner les mèches tamponnées en insérant chaque extrémité dans les points de fixation porte-électrodes ;
- Sortir le gel de son emballage et éliminer rapidement l'excès de liquide en surface du gel à l'aide d'un papier filtre fin ;
- Déposer 1 goutte d'eau distillée sur le plateau ;

- Positionner le gel sur le plateau contre la barrette à l'intérieur du cadre en prenant soin de ne pas piéger de bulles d'air en dessous du gel ;
- Abaisser l'ensemble porte-applicateur et porte-électrodes ;
- Retirer les applicateurs de la chambre humide, casser lentement la protection plastique des dents et déposer les applicateurs sur le porte-applicateur (buté du côté gauche) dans les positions suivantes (Figure 14) ;
  - Applicateur vert 1 → Position 2
  - Applicateur gris 1 (sérum 1 et 2) → Position 3
  - Applicateur vert 2 → Position 8
  - Applicateur gris 2 (sérum 3 et 4) → Position 9

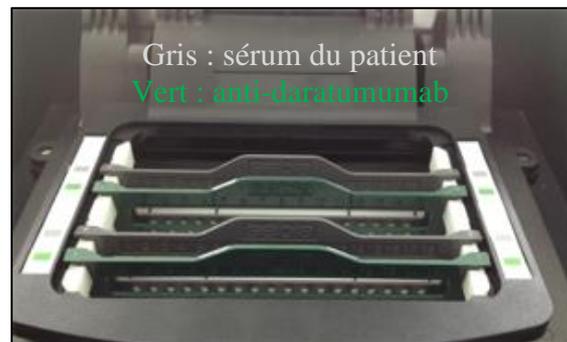


Figure 14 - Positions de dépôt des applicateurs SEBIA®.

- Fermer le capot et lancer la procédure en appuyant deux fois sur la flèche verte ;
- 2.1.4.3. *Préparation de l'incubation par les antisérums*
- Préparer le masque dynamique dès que la migration a commencé ;
    - Positionner la barrette sur le support barrette, les ergots situés aux extrémités de la barrette doivent être enclenchés dans les deux encoches du support ;
    - Placer l'ensemble barrette - support barrette sur le guide du masque dynamique puis placer le repère couleur qui indique les emplacements de dépôts des antisérums, sur le support barrette devant les puits de dépôts ;
    - Déposer 12  $\mu$ L d'antisérum selon le schéma suivant (Tableau 9) en tenant la pipette inclinée et en appliquant légèrement l'embout sur le bord de l'orifice. Comme sur les applicateurs gris et verts, laisser les puits 1, 8 et 15 vide ;

Tableau 9 - Schéma de dépôt des antisérums.

Piste	Volume ( $\mu$ L)	Désignation
ELP	12	Solution de fixation
G	12	Antisérum anti-chaînes lourdes $\gamma$
A	12	Antisérum anti-chaînes lourdes $\alpha$
M	12	Antisérum anti-chaînes lourdes $\mu$
K	12	Antisérum anti-chaînes légères $\kappa$ (libres et liées)
L	12	Antisérum anti-chaînes légères $\lambda$ (libres et liées)

- A la fin de la migration, un signal sonore retentit et l'écran affiche le message : « dépôt des antisérums » ;
- Ouvrir le capot et retirer les applicateurs et les mèches ;
- Placer les encoches du masque dynamique dans les repères de la tige métallique ;
- En maintenant l'ensemble du support barrette par la poignée de droite, exercer une pression (1 seconde) sur le point d'appui central pour amener la barrette en contact avec le gel. Relâcher la pression puis immédiatement effectuer un aller et retour lent et régulier (environ 5 à 6 secondes) au-dessus du gel avec la poignée de droite pour répartir les antisérums ;
- Retirer l'ensemble guide – masque dynamique, enlever la barrette antisérums et la jeter ;
- Fermer le capot et appuyer sur la flèche verte pour démarrer l'incubation. L'écran affiche « incubation » ;
- Après 5 minutes, un signal retentit et l'écran affiche « pompage papier » ;
  - Appliquer une feuille de papier filtre épais (partie lisse vers le gel) sur le gel en passant fermement le doigt sur toute la surface,
  - Fermer le capot et démarrer la séquence en poussant sur la flèche verte ;
- Après 3 minutes, un signal retentit et l'écran affiche « elim. papier » ;
  - Ouvrir le capot et retirer le buvard,
  - Refermer le capot et pousser sur la flèche verte pour démarrer le séchage du gel ;
- Une fois le séchage terminé, le gel est prêt pour la coloration.

#### 2.1.4.4. Préparation de la coloration

- Sélectionner le programme de coloration « IF Acide Violet » ;
- Ouvrir le capot du module de migration ;
- Retirer le gel et le placer sur le porte film en s'assurant qu'il est bien enfoncé dans les gorges des deux colonnettes ;
- Introduire le porte-film dans le module de coloration ;
- Avant de lancer un cycle de coloration, s'assurer que ;
  - Le flacon de solution de lavage contienne minimum 400 mL de solution,
  - Le flacon de colorant contienne minimum 300 mL de colorant,
  - Le flacon de décolorant contienne minimum 1 L de décolorant ;
- Démarrer la séquence de coloration en appuyant deux fois sur la flèche verte ;
- Après 45 minutes, retirer le gel et nettoyer son dos avec un papier humide ;
- Nettoyer le plateau et les électrodes avec un papier humide.

## 2.1.5. Analyse des données

### 2.1.5.1. Interprétation des résultats

L'immunofixation est une technique qualitative. Les résultats obtenus après cette analyse ne sont pas chiffrés, les données récoltées étant la présence ou l'absence de bandes diffuses ou étroites dont la coloration varie de manière plus ou moins importante. L'analyse se fait en associant à une immunofixation classique, une immunofixation avec le kit Hydrashift. La comparaison des résultats obtenus par ces deux techniques permet au biologiste de détecter aisément, lors de l'analyse du gel, la présence d'une bande interférente causée par le daratumumab.

Lors d'une immunofixation classique (sans le kit Hydrashift) :

- Absence de bande monoclonale : un « sérum normal » montre une zone colorée diffuse d'immunoglobulines polyclonales sur toutes les pistes.  
Une « hypergammaglobulinémie » est caractérisée par une zone diffuse très colorée, avec l'absence de bande étroite ;
- Présence d'une bande monoclonale : une « gammopathie » est caractérisée par une bande étroite détectée avec l'un des anti-chaînes lourdes et avec l'un des anti-chaînes légères. La fraction monoclonale mise en évidence, généralement étroite et bien visible, doit être située au même niveau de migration que la bande détectée sur la piste de référence (ELP) ;

L'absence de réaction avec l'un des anti-chaînes lourdes appliqués mais avec la présence d'une chaîne légère libre peut signifier :

- La présence d'une chaîne légère libre qu'il conviendra de confirmer avec les anti-chaînes légères libres (kappa libre ou lambda libre),
- La présence d'une gammopathie Ig D ou Ig E qu'il conviendra de confirmer avec les anti-chaînes lourdes delta ou epsilon,

L'absence de réaction avec les anti-chaînes légères, mais avec la présence d'une chaîne lourde est rare. Il conviendra de confirmer la présence d'une maladie des chaînes lourdes gamma, alpha ou mu.

Lors d'une immunofixation avec le kit Hydrashift :

- Présence d'une bande monoclonale en G et K dans la zone des  $\gamma$ -globulines lors d'une immunofixation classique et qui se retrouve en G et K dans la zone des  $\alpha$ 1-globulines après l'immunofixation par Hydrashift : l'interférence du daratumumab présent dans le sérum du patient a été déplacée et l'interprétation peut se faire comme une immunofixation classique ;
- Absence d'une bande de coloration en G et K dans la zone des  $\alpha$ -globulines après l'analyse du sérum par Hydrashift :
  - Le daratumumab n'est pas présent dans le sérum de patient,
  - Le daratumumab est présent à une concentration plus faible que la sensibilité de la technique.

## 2.2. La recherche d'anticorps irréguliers

### 2.2.1. Principe de la technique

La recherche des anticorps irréguliers (RAI) a pour but de mettre en évidence, dans le sérum des patients, des anticorps anti-érythrocytaires autres que ceux des systèmes ABO (anti-A et anti-B). Les plus importants en pratique transfusionnelle sont les allo-anticorps, ceux-ci résultant d'une immunisation par la transfusion ou la grossesse. La RAI est réalisée lors des tests pré-transfusionnels avant la délivrance des poches de sang et lors du suivi de la grossesse chez les femmes enceintes en prévention de la maladie hémolytique du nouveau-né.

Plusieurs techniques sont utilisées. En routine, la technique est effectuée sur des cartes en milieu LISS/Coombs avec des hématies-test (trois cellules) commercialisées par la firme BIO-RAD®. Ce sont des globules rouges de groupe O, qui ont été sélectionnés de telle sorte qu'ils expriment à leur surface tous les antigènes dont les anticorps sont importants en transfusion. Les globules rouges utilisés pour la RAI doivent au moins comporter une cellule homozygote « Fy<sup>a</sup> », une cellule homozygote « Jk<sup>a</sup> », une cellule homozygote « S » et une cellule homozygote « s », de manière à dépister les anticorps les plus cliniquement significatifs.

Les cartes-ID BIO-RAD® comportent six puits (Figure 15) dans lesquels se trouve un gel. En plus de ce gel, les microtubes contiennent le réactif ou l'antisérum approprié à l'analyse à exécuter (dans ce cas-ci, de l'antiglobuline humaine). Des volumes précis de globules rouges commerciaux dilués et de sérum du patient sont ajoutés dans le haut du puit. Après 15 minutes d'incubation à 37 °C, les cartes sont centrifugées durant 10 minutes. Les globules rouges non-agglutinés traversent le gel tandis que ceux sensibilisés par les anticorps restent dans la partie supérieure du gel et ce, dû à l'encombrement stérique du complexe antigène-anticorps.

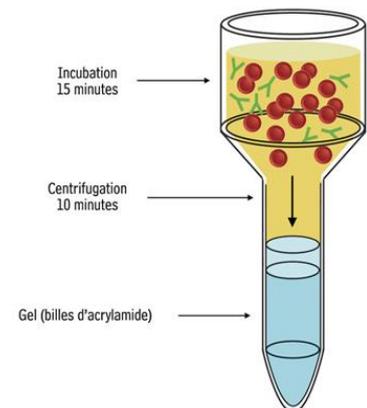


Figure 15 - Puit pour RAI (L'italien, 2008)

Dans les puits LISS/Coombs, le réactif de Coombs (réactif à l'antiglobuline humaine) a été incorporé dans le gel. Il est constitué d'anticorps dirigés contre les immunoglobulines humaines (Ig G) et de certaines fractions du complément (C3c, C3d). Lorsqu'il est mis en présence de globules rouges sensibilisés *in vivo* par des immunoglobulines, le réactif de Coombs provoque une agglutination visible macroscopiquement, ce qui permet de déceler la sensibilisation.

La réaction d'agglutination est la base de la détermination des groupes sanguins. Elle sert à détecter la réaction entre les antigènes érythrocytaires et les anticorps correspondants. La force avec laquelle l'anticorps agglutine les globules rouges influence la stabilité du complexe [Ag-Ac] et par conséquent la stabilité de l'agglutinat.

Trois étapes lors de l'agglutination :

- Fixation sur les globules rouges des anticorps spécifiques ;
- Adhérence les uns aux autres des globules rouges recouverts d'anticorps (formation d'un réseau) qui peut être facilitée par des conditions expérimentales adéquates (Enzyme, LISS, Coombs, etc.) ;
- Après la centrifugation, l'agglutination éventuelle est visible.

Contrairement à une RAI classique dont les tests s'effectuent sur des globules rouges natifs, la réalisation de RAI utilisant des globules rouges traités au DTT permet d'éliminer l'interférence du daratumumab grâce à la dénaturation du CD38 présent en faible quantité sur les hématies.

Le pH des solutions étant un des facteurs décisifs pour mener à bien la technique, des PBS *home made* plutôt que du PBS de firmes ont été préparés afin d'obtenir des tampons dont le pH a été rigoureusement respecté.

Afin de s'assurer du maintien de l'expression des antigènes érythrocytaires sur les cellules traitées au DTT, un contrôle positif a été introduit lors de chaque *run* (validité et étude de stabilité). Ce dernier consiste en la réalisation d'une RAI sur les hématies traitées mises en présence d'un sérum d'un patient sous anti-CD38 auquel a été ajouté (volume à volume) un anticorps anti-Fy<sup>a</sup> de faible titre (1/2). Les résultats attendus étant des positivités avec les différentes cellules (Fy<sup>a+</sup>) assurant la non-destruction des antigènes Fy<sup>a</sup> à la surface des globules rouges lors du traitement par le DTT.

### 2.2.2. Échantillonnage

Les échantillons ont été sélectionnés selon deux critères : patients atteints de myélome multiple et sous traitement anti-CD38 endéans 6 mois avant le prélèvement. Les analyses peuvent être effectuées avec du sérum ou du plasma.

% H/F des échantillons : 30 % Hommes– 70 % Femmes

Âge moyen : 62 ± 12 ans

#### a) Validation de la méthode de traitement des globules rouges au DTT

10 échantillons de patients sous daratumumab (ou dont le traitement a été stoppé il y a moins de 6 mois) ont été utilisés pour la réalisation de RAI sur des hématies natives et des RAI sur des hématies fraîchement traitées.

#### b) Étude de la stabilité des globules rouges traitées au DTT

2 échantillons de patients sous daratumumab ont été testés durant 11 jours en utilisant les hématies traitées au DTT le jour n°1.

### 2.2.3. Matériel et réactifs

La recherche des anticorps irréguliers s'effectue en méthode manuelle. Divers matériels et réactifs sont requis pour réaliser ces analyses.

#### 2.2.3.1. Appareillage

- Centrifugeuse à cartes « ID-Centrifuge 12 S II » ;
- Centrifugeuse à tubes « DiaCent-12 » ;
- Incubateur à cartes ;
- pH-mètre ;
- Balance.

#### 2.2.3.2. Réactifs commerciaux

- Globules rouges traités par de la papaïne (enzyme) dont le phénotype est connu ;
- Globules rouges « normaux » suspendus en LISS dont le phénotype est connu ;
- Globules rouges « normaux » traités par du DTT resuspendus en LISS et dont le phénotype est connu ;
- ID-Diluent 2 LISS ;
- Carte-ID BIO-RAD® « Reverse Grouping with Antibody Screening » (Figure 16) ;
- Carte-ID BIO-RAD® « LISS/Coombs » (Figure 17).



Figure 16 - ID-Card Reverse Grouping with Antibody Screening (BIO-RAD®).

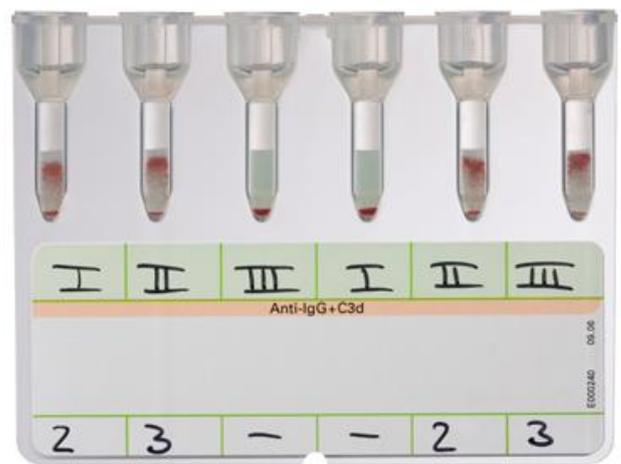


Figure 17 - ID-Card LISS/Coombs (BIO-RAD®).

#### 2.2.3.3. Réactifs préparés en laboratoire

- Solution de Dithiothréitol (DTT) à 0,2 mol/L ;
- Solution saline de Phosphate Buffered Saline (PBS) à pH 7,3 ;
- Solution saline de Phosphate Buffered Saline (PBS) à pH 8,0 ;
- Sérum témoin positif préparé volume à volume à partir d'un sérum de patient sous daratumumab et d'un sérum avec un anticorps anti-Fy<sup>a</sup> de faible titre.

## 2.2.4. Protocole expérimental

### 2.2.4.1. Préparation des solutions tampons de Phosphate Buffered Saline (PBS)

#### a) Préparation des différentes solutions

Solution A	Solution B	Solution C
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,1M	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,1M	Solution saline à 0,85%

- Ajouter la quantité appropriée de substance sèche dans chaque berlin de 2 L ;
  - o Solution A : 14,2 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>,
  - o Solution B : 13,6 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,
  - o Solution C : 17 g de NaCl ;
- Ajouter 1 L d'eau désionisée à chaque réactif en cours de préparation ;
- Agiter jusqu'à dissolution.

#### b) Préparation des solutions de PBS

- Mélanger les quantités nécessaires de Solutions A, B et C (Tableau 10) pour chaque pH en utilisant le tableau ci-dessous ;

Tableau 10 - Préparation des PBS.

<b>PBS (pH)</b>	<b>Solution A (mL)</b>	<b>Solution B (mL)</b>	<b>Solution C (mL)</b>	<b>Volume Totale (mL)</b>
5,4	3,5	96,5	900	1000
6,5	60	140	900	1000
7,3	78	22	900	1000
8,0	190	10	900	1000

- Vérifier le pH de chaque solution avec un pH-mètre. Ajuster le pH si nécessaire par addition de la solution A pour basifier ou par addition de la solution B pour acidifier la solution ;
- Fermer chaque bouteille et les stocker dans le réfrigérateur.

#### 2.2.4.2. Traitement des globules rouges par le DTT

##### a) Préparation du DTT 0,2 M

- Dans un erlenmeyer, ajouter 1 g de DTT et 32 mL de PBS pH 8,0 sous la hotte ;
- Bien agiter ;
- Ajouter approximativement 1 mL de DTT dans chaque tube pour aliquot ;
- Fermer les tubes et les stocker au congélateur (-25 °C) pendant 1 an maximum.

##### b) Traitement des globules rouges

- Décongeler le DTT à température ambiante. 1 tube congelé de DTT est nécessaire pour chaque cellule traitée ;
- Bien agiter une fois le DTT décongelé ;
- Étiqueter un tube à essai pour chaque cellule ;
- Ajouter 1 mL d'une suspension de 0,8 % de globules rouges appropriée à chaque tube ;
- Laver chaque tube manuellement 4 fois avec du PBS pH 7,3 ;
  - o Remplir chaque tube avec du PBS pH 7,3 en laissant 1 cm de vide,
  - o Homogénéiser délicatement la solution,
  - o Centrifuger chaque tube durant 1 minute à 500 g,
  - o Enlever le surnageant à l'aide d'une pompe à eau ;
- Ajouter 400 µL de DTT 0,2 M à chaque tube ;
- Bien mélanger et incuber à 37 °C pendant 30 minutes. Mélanger doucement par retournement 3-4 fois pendant l'incubation ;
- Immédiatement après l'incubation, laver à nouveau manuellement les cellules dans chaque tube 4 fois avec du PBS pH 7,3 ;
- Suspendre chaque cellule dans 200 µL de LISS (ID-Diluent 2 LISS).

##### c) Préparation du sérum témoin positif

- Ajouter 400 µL de sérum QC contenant un anti-Fy<sup>a</sup> (titre : 1/8) dans un tube ;
- Ajouter 800 µL de PBS pH 7 au tube contenant le sérum QC ;
- Homogénéiser le mélange sérum QC-PBS afin d'obtenir un sérum QC de faible titre (titre : 1/2) ;
- Ajouter 500 µL de sérum de patient sous anti-CD38 dans un nouveau tube ;
- Ajouter 500 µL de sérum QC dilué au sérum du patient sous anti-CD38 ;
- Bien mélanger et conserver le sérum témoin positif au réfrigérateur.

#### 2.2.4.3. RAI : méthode manuelle en GEL (avant traitement au DTT)

- Les échantillons de sang sont recueillis dans des tubes EDTA et centrifugés au laboratoire pendant 6 minutes à 3 500 tours par minute afin de récupérer le sérum ;
- Marquer une carte-ID « Reverse Grouping with Antibody Screening » en identifiant le patient sur le dos de celle-ci ;
- Décoller la languette d'aluminium présent sur la carte en tenant la carte en position verticale ;
- Avant l'emploi, laisser les échantillons de sérum et les hématies-test revenir à température ambiante ;
- Bien remettre les hématies-test en suspension dans les différents contenants ;
- Ajouter 50 µL des hématies-test papainisées aux puits « Enzymes » ;
- Ajouter 50 µL des hématies-test LISS aux puits « Coombs » ;
- Ajouter 25 µL de sérum du patient dans chaque puits ;
- Incuber 15 minutes à 37 °C ;
- Centrifuger 10 minutes ;
- Lire les résultats.

#### 2.2.4.4. RAI : méthode manuelle en GEL (après traitement au DTT)

- Les échantillons de sang sont recueillis dans des tubes EDTA et centrifugés au laboratoire pendant 6 minutes à 3 500 tours par minute afin de récupérer le sérum ;
- Marquer une carte-ID « LISS/Coombs » en identifiant le patient sur le dos de celle-ci ;
- Décoller la languette d'aluminium présent sur la carte en tenant la carte en position verticale ;
- Avant l'emploi, laisser les échantillons de sérum et les hématies-test revenir à température ambiante ;
- Bien remettre les hématies-test en suspension dans les différents contenants ;
- Ajouter 50 µL des hématies-test LISS traitées au DTT aux puits « Coombs » ;
- Ajouter 25 µL de sérum du patient 1 dans les 3 premiers puits ;
- Ajouter 25 µL de sérum du patient 2 dans les 3 derniers puits ;
- Incuber 15 minutes à 37 °C ;
- Centrifuger 10 minutes ;
- Lire les résultats.

#### 2.2.4.5. RAI : méthode manuelle en GEL (témoin positif)

- Les échantillons de sang sont recueillis dans des tubes EDTA et centrifugés au laboratoire pendant 6 minutes à 3 500 tours par minute afin de récupérer le sérum ;
- Marquer une carte-ID « LISS/Coombs » en identifiant le patient sur le dos de celle-ci ;
- Décoller la languette d'aluminium présent sur la carte en tenant la carte en position verticale ;
- Avant l'emploi, laisser le sérum et les hématies-test revenir à température ambiante ;
- Bien remettre les hématies-test en suspension dans les différents contenants ;
- Ajouter 50 µL des hématies-test LISS traitées au DTT aux puits « Coombs » ;
- Ajouter 25 µL de sérum témoin positif dans les 3 premiers puits ;
- Incuber 15 minutes à 37 °C ;
- Centrifuger 10 minutes ;
- Lire les résultats.

## 2.2.5. Analyse des données

### 2.2.5.1. Interprétation des résultats

Lors de la lecture des cartes, les résultats obtenus sont notés selon le « score d'agglutination » (Figure 18). Si un seul des puits de la RAI montre un résultat positif, la RAI sera dite « positive ».

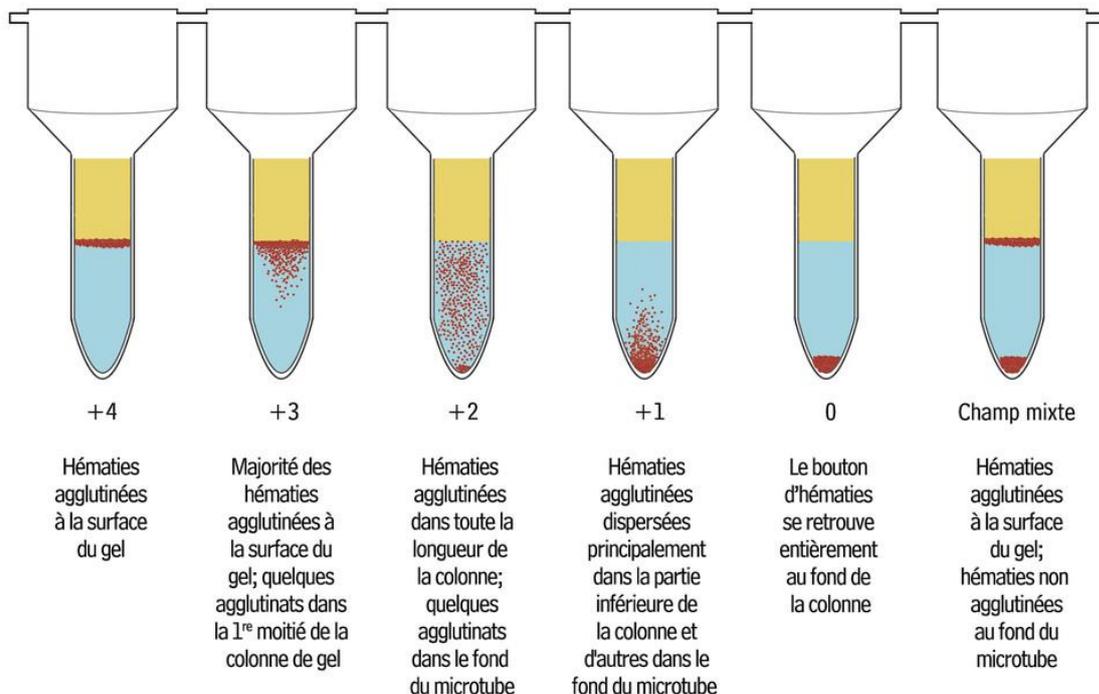


Figure 18 - Score d'agglutination (L'italien, 2008).

Sur les globules rouges natifs, en cas de RAI positive il est impossible de déterminer si l'agglutination observée est le résultat d'allo-anticorps ou de l'agglutination des anti-CD38 sur le CD38 exprimé à la surface des globules rouges. Seules les données obtenues après le traitement des globules rouges par le DTT comparé à ceux obtenus avant le traitement permettent l'interprétation des résultats par le biologiste :

- RAI négative avant et après le traitement des hématies au DTT : absence d'allo-anticorps et absence de daratumumab dans le sérum du patient ;
- RAI positive avant et après le traitement des hématies au DTT ;
  - o Le traitement des globules rouges au DTT n'a pas fonctionné,
  - o Présence d'allo-anticorps ;
- RAI positive avant et négative après le traitement des hématies au DTT : la positivité de la RAI s'explique uniquement par le traitement au daratumumab et des allo-anticorps additionnels ont pu être exclus à l'exception de ceux dont les antigènes ont été détruits lors du traitement au DTT (Kell, Landsteiner-Wiener, Dombrock, Indian, John Milton Hagen, Knops, etc.).

### 3. Résultats

#### 3.1. L'immunofixation

Les immunofixations sur gel sont regroupées dans l'annexe n°1. La figure 19 montre le déplacement du complexe daratumumab – anti-daratumumab lors de l'analyse avec Hydrashift.

Tableau 11 - Immunofixations avec et sans hydrashift.

Échantillons	Hydrasys	Hydrashift
1	Bande monoclonale en G et K	Bande monoclonale en G et K
2	Bande biclonale en G et K	Bande monoclonale en G et K Bande diffuse en G et K au niveau des $\alpha$ 1-globulines
3	Bande biclonale en G et K	Bande monoclonale en G et K Bande diffuse en G et K au niveau des $\alpha$ 1-globulines
4	Bande monoclonale en G et K Bande monoclonale en A et L	Bande diffuse en G et K au niveau des $\alpha$ 1-globulines Bande monoclonale en A et L
5	Bande monoclonale en G et L	Bande monoclonale en G et L
6	Bande monoclonale G et L Bande monoclonale G et K	Bande diffuse en G et K au niveau des $\alpha$ 1-globulines Bande monoclonale G et L
7	Bande monoclonale en G et K	Bande diffuse en G et K au niveau des $\alpha$ 1-globulines
Témoin +	Bande monoclonale G et K	Bande diffuse en G et K au niveau des $\alpha$ 1-globulines

▶ Bande monoclonale

▶ Complexe daratumumab/anti-daratumumab

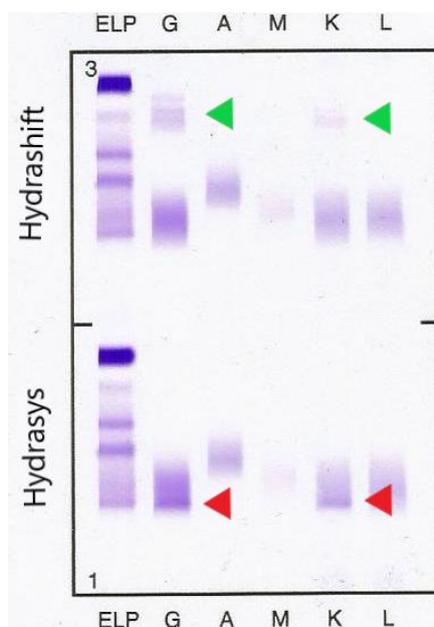


Figure 19 - Immunofixation avec et sans Hydrashift.

### 3.2. La recherche d'anticorps irréguliers

Les RAI effectuées pour la validation de la méthode et pour l'étude de stabilité des globules rouges traités sont regroupées dans l'annexe n°2. La figure 20 illustre les résultats à obtenir lors d'une RAI utilisant les globules rouges traités.

#### 3.2.1. Validation de la méthode de traitement des globules rouges au DTT

Tableau 12 - RAI avant et après le traitement au DTT.

Échantillons	Résultats de RAI sur GR natifs						Résultats de RAI sur GR traités		
	Enzyme			LISS/Coombs			LISS/Coombs		
	I	II	III	I	II	III	I	II	III
1	-	-	-	2+	2+	1+	-	-	-
2	-	-	-	2+	2+	2+	-	-	-
3	-	-	-	1+	2+	1+	-	-	+/-
4	-	-	-	1+	1+	1+	-	-	-
5	-	-	-	2+	2+	2+	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	2+	2+	1+	-	-	-
8	-	-	-	2+	2+	1+	-	-	-
9	-	-	-	2+	2+	2+	-	-	-
10	-	-	-	2+	2+	2+	-	-	-
Témoins +	-	-	-	2+	2+	2+	-	2+	2+

#### 3.2.2. Étude de la stabilité des globules rouges traitées au DTT

Tableau 13 - Étude de stabilité des globules rouges traités au DTT.

Jours	Résultats de RAI sur GR traités								
	Échantillons 1			Échantillons 2			Témoins +		
	LISS/Coombs			LISS/Coombs			LISS/Coombs		
	I	II	III	I	II	III	I	II	III
1	-	+/-	+/-	-	+/-	+/-	+/-	2+	2+
4	-	-	+/-	-	+/-	+/-	+/-	1+	1+
5	-	-	+/-	-	+/-	+/-	+/-	1+	1+
6	-	+/-	+/-	-	+/-	+/-	-	1+	1+
7	-	+/-	+/-	-	-	+/-	-	1+	1+
8	-	-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	1+	1+
11	-	-	-	+/-	+/-	+/-	+/-	2+	2+

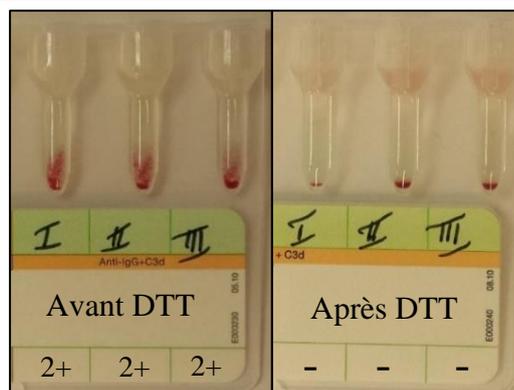


Figure 20 - RAI avant et après traitement au DTT.

## 4. Discussion

### 4.1. L'immunofixation

Les immunofixations sont des analyses régulièrement pratiquées dans les laboratoires de chimie clinique, en particulier pour le diagnostic et le suivi des gammopathies monoclonales. C'est une technique semi-automatisable, assez simple, mais qui nécessite une certaine dextérité de la part de l'opérateur afin d'obtenir des gels de bonne qualité.

La méthode « DIRA » a prouvé son efficacité et sa reproductibilité pour atténuer l'interférence du daratumumab. La commercialisation du kit hydrashift par la firme SEBIA® compatible avec l'appareil HYDRASYS 2 de SEBIA® permet aux laboratoires concernés de s'affranchir de l'interférence simplement en adaptant leur technique d'immunofixation. Afin de mettre en place l'analyse dans le laboratoire de biochimie spécialisée du CHU de Liège, nous avons testé plusieurs échantillons de patients et comparé les résultats obtenus avec et sans l'utilisation d'Hydrashift.

Les performances de la technique, évaluées par la firme SEBIA®, démontrent d'excellents résultats de répétabilité, reproductibilité et d'exactitude. La sensibilité a été mesurée à 0,2 g/L.

Le faible nombre d'échantillons est la conséquence non seulement de la récente mise sur le marché du daratumumab, mais également de son indication. Ce médicament étant prescrit en deuxième ligne dans le traitement du myélome multiple, peu de patients bénéficient actuellement de cette thérapie. De plus, les échantillons de sang arrivent au laboratoire aléatoirement, selon l'hospitalisation ou le besoin des patients.

7 échantillons de sérum de patients sous daratumumab ont été analysés : tous les gels présentaient une bande monoclonale dans la zone des  $\gamma$ -globulines, d'intensité plus ou moins forte. Dans 5 cas, le complexe daratumumab – anti-daratumumab a migré hors de la zone des  $\gamma$ -globulines et peut être visualisé au niveau des  $\alpha$ 1-globulines.

- Lors de l'analyse des échantillons n°2, 3, 4, 6 et 7, on observe une bande diffuse en G et K de faible intensité au niveau de la zone des  $\alpha$ 1-globulines correspondant à la migration du complexe daratumumab – anti-daratumumab. En effet, L'anti-daratumumab migre, selon sa charge, plus rapidement que le daratumumab et un complexe se forme après l'interaction des deux. Ce *shift* permet le déplacement de la bande interférente présente lors de l'analyse classique dans une zone différente de celle où l'on trouve habituellement les immunoglobulines monoclonales du patient.
- Le sérum témoin fourni par SEBIA® contient une concentration inconnue de daratumumab. En plus d'assurer le succès de l'Hydrashift avec la présence d'une bande monoclonale en G et K mimant une immunoglobuline monoclonale endogène qui disparaît complètement au profit d'une bande diffuse en G et K au niveau des  $\alpha$ 1-globulines, son analyse démontre l'importance de pouvoir éliminer l'interférence du

daratumumab lors de la présence d'une seule bande monoclonale en G et K, ou lors d'une co-migration daratumumab – immunoglobuline monoclonale du patient.

En effet, il est impossible de faire la distinction entre un anticorps monoclonal endogène (produit par le patient) et un anticorps monoclonal exogène (le médicament) lors d'une immunofixation classique. Le stade la « réponse complète » ne peut dès lors jamais être atteint.

- La présence de bandes monoclonales après l'analyse avec Hydrashift correspond toujours aux immunoglobulines monoclonales du patient. Les bandes monoclonales autres que celles du daratumumab ne sont pas influencées par l'analyse avec Hydrashift.
- L'absence de bande diffuse en G et K au niveau des  $\alpha$ 1-globulines, malgré la présence d'une bande monoclonale de forte intensité chez les échantillons n°1 et n°5 après l'analyse avec hydrashift conduits à deux hypothèses :
  - o Le délai entre la dernière perfusion de daratumumab et le prélèvement de l'échantillon étant trop éloigné, la concentration de daratumumab dans le sérum du patient est devenue inférieure à la limite de détection de la technique, le médicament est indétectable, son interférence peut être exclue ;
  - o Le délai entre la dernière perfusion et le prélèvement n'est pas éloigné, mais le daratumumab n'est tout de même pas détecté. Dès lors, la question se pose de savoir si l'absence de migration du complexe daratumumab – anti-daratumumab est due à une élimination trop rapide du médicament ou bien à une fixation importante de celui-ci sur le CD38 des cellules myélomateuses, le rendant indétectable.

L'association de l'Hydrashift à une immunofixation classique, a montré d'excellents résultats sur les huit échantillons. L'élimination de l'interférence du daratumumab est surtout essentielle lors d'une co-migration en G et K de l'immunoglobuline monoclonale du patient et du médicament, car il n'est alors plus possible de suivre l'évolution de la maladie ni la réponse du patient au traitement, la présence de la bande interférente empêchant toujours d'atteindre le stade de la « réponse complète ». Dans certains cas particuliers, l'apparition de nouvelles bandes à l'immunofixation peut être engendrée par une évolution de la maladie et l'utilisation de l'Hydrashift peut s'avérer utile pour faire la distinction entre une immunoglobuline endogène ou exogène. Cependant, le coût de l'analyse associé au très faible nombre de patients concernés par une co-migration sont des inconvénients qui ne rendent pas l'utilisation d'Hydrashift indispensable en routine. En effet, la mise en évidence du daratumumab lors d'une immunofixation peut tout de même se faire grâce aux antécédents d'analyses, à l'apport d'informations venant des hématologues et la consultation du dossier médical du patient.

## 4.2. La recherche d'anticorps irréguliers

La technique de traitement des globules rouges par le DTT utilisée au laboratoire d'immunohématologie du CHU de Liège ne donnant pas de résultats satisfaisants, nous avons voulu optimiser la méthode utilisée via le respect strict du pH des solutions de PBS, ce facteur étant primordial pour l'activité du DTT. De plus, cette technique étant longue et fastidieuse, nous avons testé la stabilité des cellules traitées afin d'évaluer la durée de conservation de ces dernières, ce qui permettrait d'éviter la préparation quotidienne de nouvelles solutions.

Les interférences provoquées par le daratumumab peuvent être de différentes intensités donnant des scores d'agglutinations plus ou moins élevés et ce en fonction de la concentration en anti-CD38 présente dans les échantillons. L'interférence étant toujours présente jusqu'à six mois après la dernière perfusion, le délai entre le prélèvement de l'échantillon et la dernière perfusion est un des paramètres qui influence l'intensité des interférences.

La concentration en daratumumab dans le sérum des patients étant inconnue, il est impossible de prévoir le dénouement de l'analyse. La distinction entre l'interférence de l'anti-CD38 et la présence d'un allo-anticorps se fait grâce à la réalisation de deux RAI consécutivement, une RAI utilisant des globules rouges non traités (natifs) suivie d'une RAI utilisant des globules rouges traités au DTT. Seule une RAI strictement négative, c'est-à-dire dont les scores d'agglutinations sont tous « négatifs », permet d'exclure la présence d'allo-anticorps dans le sérum du patient, à l'exception de ceux dont les antigènes ont été détruits lors du traitement au DTT (Kell, Landsteiner-Wiener, Dombrock, Indian, John Milton Hagen, Knops, etc.).

Le faible nombre d'échantillons analysés s'explique par l'effectif réduit de patients sous ce traitement, le daratumumab ayant été mis sur le marché récemment et ayant des indications restreintes. De plus, les échantillons de sang arrivent au laboratoire aléatoirement, selon l'hospitalisation ou le besoin des patients.

### 4.2.1. Validation de la méthode de traitement des globules rouges au DTT

10 sérums de patients sous daratumumab ont été analysés : dans 9 cas, la RAI était positive sur les globules rouges natifs (de 1+ à 2+) et 1 patient a présenté une RAI négative. Après le traitement préalable des globules rouges au DTT, 8 RAI ont rendu un résultat négatif, alors que 1 était toujours très faiblement positif. Seule la recherche d'anticorps en milieu « LISS/Coombs » est sensible au anticorps anti-CD38, la RAI en milieu enzymatique étant négative chez tous les patients.

- Les 8 échantillons (n°1, 2, 4, 5, 7, 8, 9, 10) témoignent de l'importance d'effectuer une RAI avec des globules rouges traités chez ce type de patient, afin de mettre en évidence la présence de résultats faussement positifs. Malgré les différents inconvénients, cette méthode s'est avérée efficace et la meilleure pour éliminer l'interférence. Un résultat positif implique la réalisation d'un panel d'identification avant de pouvoir délivrer une poche de sang et il est essentiel de distinguer un résultat faussement positif afin d'éviter la perte de temps et des manipulations superflues.

- Les résultats obtenus avec le sérum témoin positif permettent de valider la méthode. Celle-ci préserve les antigènes Fy<sup>a</sup> des cellules, la détection d'anticorps de faible titre n'étant pas altérée par le DTT. Les positivités observées dans les puits II et III sont dues à la réaction des anti-Fy<sup>a</sup> avec les antigènes Fy<sup>a+</sup> présents sur ces deux cellules, le DTT ayant dénaturé le CD38.
- Sur le puit III de l'échantillon n°3, on observe la présence d'une double population (globules rouges présents à la surface du gel et au fond du puit). L'origine de cette trace dans le haut du puit peut être diverse : la présence d'un allo-anticorps chez le patient, un artefact dû à une dénaturation incomplète du CD38 sur les globules rouges ou la présence de fibrine. Dans ce cas, l'image du gel oriente plutôt vers une dénaturation incomplète. Le traitement des globules rouges au DTT n'est pas simple à réaliser, il nécessite de la rigueur, de la précision, des lavages délicats et un bon entraînement.
- Les résultats négatifs (échantillon n°6) observés avec les RAI utilisant des globules rouges natifs et des globules rouges traités permettent de conclure à l'absence d'interférence de l'anti-CD38, mais également à l'absence d'allo-anticorps (à l'exception de ceux non détectés après le traitement au DTT). Le sang du patient ne contient plus le médicament ou bien il se retrouve en quantité insuffisante pour être détecté. Cet échantillon démontre l'absence d'interférence lorsque le délai entre la dernière perfusion et le prélèvement est élevé. Lorsqu'un résultat est négatif, il n'est pas nécessaire de confirmer l'analyse par une deuxième RAI avec des hématies traitées au DTT.
- Les échantillons n°7 et n°8 correspondent au même patient, prélevés à des moments différents. On observe des résultats strictement identiques, malgré des concentrations en anti-CD38 différentes.

Bien que la présence d'un résidu dans l'un des puits de l'échantillon n°3 démontre le manque de reproductibilité de la méthode, les résultats observés avec les globules rouges fraîchement traités permettent très souvent d'éliminer l'interférence de l'anti-CD38. Le témoin positif permet de vérifier que la dénaturation du CD38 n'altère pas les antigènes servant à la détection des anticorps, même de faible de titre. Cependant, la méthode n'est pas simple à réaliser et demande un certain temps, il n'est donc pas possible de traiter quotidiennement des globules rouges au vu de l'urgence à laquelle on peut être confronté en transfusion.

#### 4.2.2. Étude de la stabilité des globules rouges traités au DTT

En plus du pH des solutions, la stabilité des globules rouges traités est un des facteurs-clés pour le succès de l'analyse. Celle-ci a dès lors été évaluée pour définir la durée de validité des cellules après le traitement au DTT. Pour ce faire, une quantité importante de globules rouges ont été traités simultanément dans le but de diminuer au maximum les variations. Ensuite, ces globules rouges traités ont été mis en présence des sérums n°9 et n°10 ainsi que du sérum témoin positif (sérum de patient sous daratumumab avec un allo-anticorps anti-Fy<sup>a</sup>). Les RAI ont été réalisées durant 11 jours avec les cellules préparées et répétées selon la même procédure.

Avant chaque analyse, l'aspect des suspensions globulaires a été examiné afin de repérer des globules rouges hémolysés. De légères positivités ont été observées avec les deux échantillons de patients testés, majoritairement avec les cellules II et III. Ces résultats résultent probablement d'une activité du CD38 persistante à la surface des hématies-test consécutive à un mauvais lavage des cellules. Les cellules I semblent quant à elle avoir été efficacement traitées au DTT. Ces inconvénients étant d'autant plus marqués lors du traitement d'un volume important de cellules.

Le résultat des sérums n°9 et n°10 obtenus précédemment avec des globules rouges fraîchement traités était strictement négatif, la présence d'allo-anticorps dont les antigènes ne sont pas détruits par le DTT peut donc être exclu. L'analyse du témoin positif effectué en parallèle permet de s'assurer de la détection d'anticorps de faible titre présent dans le sérum du patient. L'augmentation des positivités du témoin au 11<sup>e</sup> jour, malgré la diminution générale obtenue les jours précédents montre le manque de reproductibilité des résultats.

Au 11<sup>e</sup> jour, les cellules paraissent bien hémolysées lors de l'observation macroscopique des suspensions globulaires, dans le puit I du témoin, on observe une très faible agglutination, absente les jours précédents. La durée de validité des globules rouges traités au DTT semble donc être de maximum 8 jours. Dès lors, il serait tout à fait envisageable de prévoir à l'avenir le traitement hebdomadaire d'un stock plus ou moins important de globules rouges au laboratoire afin d'éviter la perte du temps que requiert un traitement quotidien. Cependant, la méthode étant peu reproductible, il est évidemment plus compliqué de traiter un volume plus élevé de cellules. Les globules rouges peuvent être plus vite hémolysés et des traces dans le haut du puit peuvent se manifester, rendant la lecture et l'interprétation des résultats parfois difficile. Il est dès lors important de réaliser des aliquotes afin de traiter de faibles volumes de cellules.

## 5. Conclusion et perspectives

Les progrès technologiques en sciences pharmaceutiques et médicales ont grandement contribué à la découverte de nouveaux traitements. Ceux-ci permettent désormais de soigner des maladies, comme le myélome multiple, autrefois incurable. Ces nouveaux médicaments ont manifesté un intérêt particulier dans les thérapies de cancers grâce à leur spécificité et leur efficacité. Les tumeurs peuvent ainsi être ciblées et les effets indésirables réduits. L'efficacité et la sécurité du daratumumab pour traiter les patients atteints d'un myélome multiple récidivant et réfractaire ont été prouvées par plusieurs études. Cependant, il n'existe aucun traitement parfait. Bien que la thérapie par anti-CD38 présente de nombreux avantages, il est important de tenir compte de ses inconvénients. En effet, la structure d'anticorps monoclonale (Ig G  $\kappa$ ) ainsi que la cible (CD38) du médicament induisent des interférences dans plusieurs tests utilisés dans les laboratoires de biologie clinique. Afin de garantir la validité des résultats, il est nécessaire que les laboratoires puissent se prémunir face aux interférences en adaptant leurs analyses.

Tout d'abord, l'utilisation du kit Hydrashift de SEBIA® pour éliminer l'interférence du médicament lors des immunofixations sur sérum a montré de très bons résultats lors du test des huit échantillons. La simple addition d'un applicateur supplémentaire avec l'anti-daratumumab lors de l'immunofixation classique sur les appareils déjà présents au laboratoire facilite grandement l'utilisation de cette analyse. De plus, la bonne reproductibilité de la méthode permet de toujours obtenir des résultats satisfaisants. Cependant, le coût du kit associé au très faible nombre de patients concernés par une co-migration constitue un frein à l'utilisation d'Hydrashift. Cette analyse peut être nécessaire dans certains cas, notamment lors d'une co-migration, où l'on ne peut jamais atteindre le stade de la « réponse complète », mais bien souvent la présence du daratumumab peut être déduite avec l'aide d'informations supplémentaires pouvant être apportées par les hématologues.

Ensuite, l'optimisation de la technique de traitement des globules rouges au DTT grâce à la préparation de PBS *home made*, dont le pH a été strictement contrôlé et vérifié, a montré des résultats intéressants. Cependant, le manque de reproductibilité de la méthode peut induire dans certains cas l'hémolyse des globules rouges traités et l'apparition de légères positivités, d'autant plus si le volume de cellules traitées est important, rendant le résultat difficilement interprétable par le biologiste. Dans le but d'éviter la perte de temps que requiert le traitement quotidien des globules rouges, l'étude de la stabilité des hématies traitées au DTT a permis de définir la durée de validité des cellules. La connaissance de celle-ci est essentielle afin d'envisager un traitement non plus quotidien, mais hebdomadaire de globules rouges. Il n'est pas rare d'être confronté à une urgence en transfusion, il serait donc très intéressant d'avoir à disposition au laboratoire des cellules préalablement traitées.

Enfin, les patients du CHU de Liège concernés par l'interférence du daratumumab ne sont pas encore très nombreux. Néanmoins, la place de ce médicament dans le traitement du myélome multiple risque d'évoluer tandis que le développement de thérapie à base d'anticorps monoclonaux ne cesse d'augmenter. Dès lors, il est tout à fait probable que les laboratoires soient confrontés, à l'avenir, à d'autres cas d'interférences, provenant soit de la croissance du nombre de patients concernés, soit de l'apparition de nouveaux traitements.

## 6. Bibliographie

- Affi, S., Michael, A. and Lesokhin, A. (2016) 'The new era of immunotherapy in multiple myeloma: daratumumab and elotuzumab', *Ann Pharmacother*, 50(7), pp. 555–568. doi: 10.1177/1060028016642786.The.
- Bataille, R. and Harousseau, J. L. (1997) 'Monoclonal gammopathy of undetermined significance and the natural history of multiple myeloma', *New England Journal of Medicine*, pp. 1657–1664.
- Bosseboeuf, A. *et al.* (2017) 'Monoclonal IgG in MGUS and multiple myeloma targets infectious pathogens.', *JCI insight*, 2(19), pp. 1–18. doi: 10.1172/jci.insight.95367.
- Brand, A. (2016) 'Immunological complications of blood transfusions', *Presse Medicale*. Elsevier Masson SAS, 45(7–8), pp. e313–e324. doi: 10.1016/j.lpm.2016.06.024.
- Caers, J. *et al.* (2014) 'Gammopathie monoclonale de signification indéterminée : Information destinée aux médecins référents', *Revue Medicale de Liege*, 69(1), pp. 41–46.
- Le carrer, D. (2005) *Électrophorèse et Immunofixation des Protéines sériques - Interprétations illustrées*. FM-BIO. Edited by S. Laboratoire. Vanves.
- Cejalvo, M. J., Ribas, P. and de la Rubia, J. (2017) 'The safety of daratumumab for the treatment of multiple myeloma', *Expert Opinion on Drug Safety*. Taylor & Francis, 16(6), pp. 753–760. doi: 10.1080/14740338.2017.1328053.
- Chabrières, C. (2006) 'Recherche des anticorps anti-érythrocytaires', *Spectra Biologie*, 151, pp. 48–54.
- Chapuy, C. I. *et al.* (2016) 'International validation of a dithiothreitol (DTT)-based method to resolve the daratumumab interference with blood compatibility testing', *Transfusion*, 56(12), pp. 2964–2972. doi: 10.1111/trf.13789.
- Cohen-Bacrie, S. *et al.* (2014) 'La recherche d'anticorps anti-érythrocytaires (RAI) : un examen au cœur de la réforme de la biologie médicale', *Revue Francophone des Laboratoires*. Elsevier, 2014(467), pp. 37–44. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S1773-035X\(14\)72747-9](http://dx.doi.org/10.1016/S1773-035X(14)72747-9).
- Dean, L. (2005) 'Blood Groups and Red Cell Antigens', *Blood Groups and Red Cell Antigens*, (Md). doi: 10.1160/TH04-04-0251.
- Delaney, M. *et al.* (2016) 'Transfusion reactions: prevention, diagnosis, and treatment', *The Lancet*. Elsevier Ltd, 388(10061), pp. 2825–2836. doi: 10.1016/S0140-6736(15)01313-6.
- Dimopoulos, M. A. *et al.* (2016) 'Daratumumab, Lenalidomide, and Dexamethasone for Multiple Myeloma', *New England Journal of Medicine*, 375(14), pp. 1319–1331. doi: 10.1056/NEJMoa1607751.
- Durie, B. G. M. and International Myeloma Foundation (2016) 'Revue concise de la maladie et des options thérapeutiques'.
- European Medicines Agency (2017) *Darzalex - Résumé des caractéristiques du produit*. Londres. Available at: [http://www.ema.europa.eu/docs/fr\\_FR/document\\_library/EPAR\\_-\\_Product\\_Information/human/004077/WC500207296.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/fr_FR/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/004077/WC500207296.pdf).

Frazier, S. K. *et al.* (2017) 'Adverse Reactions to Transfusion of Blood Products and Best Practices for Prevention', *Critical Care Nursing Clinics of North America*, 29(3), pp. 271–290. doi: 10.1016/j.cnc.2017.04.002.

Gerard, C. (2010) *Petit manuel d'immuno-hématologie*. Liège.

International Myeloma Working Group (2003) 'Criteria for the classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related disorders: a report of the International Myeloma work group.', *British Journal of Hematology*, (121), pp. 749–757.

Jung, S.-H. *et al.* (2017) 'Immunotherapy for the treatment of multiple myeloma', *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. Elsevier Ireland Ltd, 111, pp. 87–93. doi: 10.1016/j.critrevonc.2017.01.011.

Kindt, T. J., Goldsby, R. A. and Osborne, B. A. (2008) *Immunologie: Le cours de Janis Kuby avec questions de révision*. 6e édition. Edited by Dunod. Paris.

Kumar, S. *et al.* (2016) 'International Myeloma Working Group consensus criteria for response and minimal residual disease assessment in multiple myeloma', *The Lancet Oncology*. Elsevier Ltd, 17(8), pp. e328–e346. doi: 10.1016/S1470-2045(16)30206-6.

Kyle, R. a. and Rajkumar, S. V. (2008) 'Multiple Myeloma', *Blood*, 111(6), pp. 2962–2972. doi: 10.1182/blood-2007-08-078139.

Landgren, O. and Rajkumar, S. V. (2016) 'New developments in diagnosis, prognosis, and assessment of response in multiple myeloma', *Clinical Cancer Research*, 22(22), pp. 5428–5433. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-16-0866.

Lokhorst, H. M. *et al.* (2015) 'Targeting CD38 with Daratumumab Monotherapy in Multiple Myeloma', *New England Journal of Medicine*, 373(13), pp. 1207–1219. doi: 10.1056/NEJMoa1506348.

Long, B. and Koyfman, A. (2016) 'Red Blood Cell Transfusion in the Emergency Department', *The Journal of Emergency Medicine*. Elsevier Inc, 51(2), pp. 120–130. doi: 10.1016/j.jemermed.2016.04.010.

Lonial, S. *et al.* (2016) 'Daratumumab monotherapy in patients with treatment-refractory multiple myeloma (SIRIUS): An open-label, randomised, phase 2 trial', *The Lancet*, 387(10027), pp. 1551–1560. doi: 10.1016/S0140-6736(15)01120-4.

McCudden, C. *et al.* (2016) 'Monitoring multiple myeloma patients treated with daratumumab: Teasing out monoclonal antibody interference', *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 54(6), pp. 1095–1104. doi: 10.1515/cclm-2015-1031.

McCudden, C. R. *et al.* (2017) 'Synoptic reporting for protein electrophoresis and immunofixation', *Clinical Biochemistry*. Elsevier Inc. on behalf of The Canadian Society of Clinical Chemists. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2017.09.020.

Murata, K. *et al.* (2016) 'Treatment of multiple myeloma with monoclonal antibodies and the dilemma of false positive M-spikes in peripheral blood', *Clinical Biochemistry*. The Canadian Society of Clinical Chemists. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2016.09.015.

Nau, K. C. and Lewis, W. D. (2008) 'Multiple Myeloma: Diagnosis and Treatment', *American Family Physician*, 78(7), pp. 853–859.

Rajkumar, S. V. *et al.* (2014) 'International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma', *The Lancet Oncology*. Elsevier Ltd, 15(12), pp. e538–e548. doi: 10.1016/S1470-2045(14)70442-5.

Rajkumar, S. V., Landgren, O. and Mateos, M. V. (2015) 'Smoldering multiple myeloma', *Blood*, 125(20), pp. 3069–3075. doi: 10.1182/blood-2014-09-568899.

Sanchez, L. *et al.* (2016) 'Daratumumab: a first-in-class CD38 monoclonal antibody for the treatment of multiple myeloma', *Journal of Hematology & Oncology*. Journal of Hematology & Oncology, 9(1), p. 51. doi: 10.1186/s13045-016-0283-0.

Savage, W. J. (2016) 'Transfusion Reactions', *Hematology/Oncology Clinics of North America*. Elsevier Inc, 30(3), pp. 619–634. doi: 10.1016/j.hoc.2016.01.012.

Smith, J., Raines, G. and Schneider, H. (2017) 'A comparison between high resolution serum protein electrophoresis and screening immunofixation for the detection of monoclonal gammopathies in serum', *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*.

The Binding Site (2015) *Serum Free Light Chain Analysis Plus Hevylite*. 7th editio. Edited by T. B. S. G. Ltd.

Touzeau, C. and Moreau, P. (2017) 'Daratumumab for the treatment of multiple myeloma', *Expert Opinion on Biological Therapy*. Taylor & Francis, 17(7), pp. 887–893. doi: 10.1080/14712598.2017.1322578.

Van De Donk, N. W. C. J. *et al.* (2016) 'Interference of daratumumab in monitoring multiple myeloma patients using serum immunofixation electrophoresis can be abrogated using the daratumumab IFE reflex assay (DIRA)', *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 54(6), pp. 1105–1109. doi: 10.1515/cclm-2015-0888.

de Weers, M. *et al.* (2011) 'Daratumumab, a Novel Therapeutic Human CD38 Monoclonal Antibody, Induces Killing of Multiple Myeloma and Other Hematological Tumors', *The Journal of Immunology*, 186(3), pp. 1840–1848. doi: 10.4049/jimmunol.1003032.

Site de l'Université Médicale Virtuelle Francophone, consulté le 20/10/2017 à partir du lien [http://campus.cerimes.fr/hematologie/enseignement/hematologie\\_166/site/html/1.html](http://campus.cerimes.fr/hematologie/enseignement/hematologie_166/site/html/1.html)

Site de Absolute Antibody, consulté le 19/10/2017 à partir du lien <http://absoluteantibody.com/antibody-resources/antibody-overview/antibody-isotypes-subtypes/>

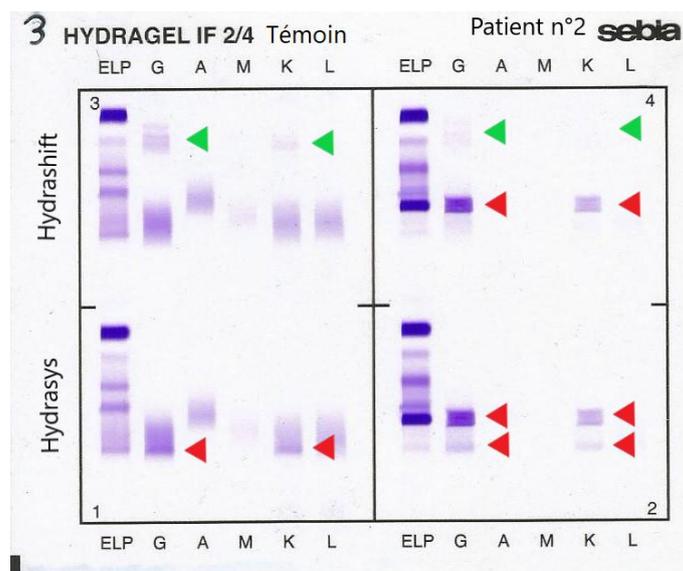
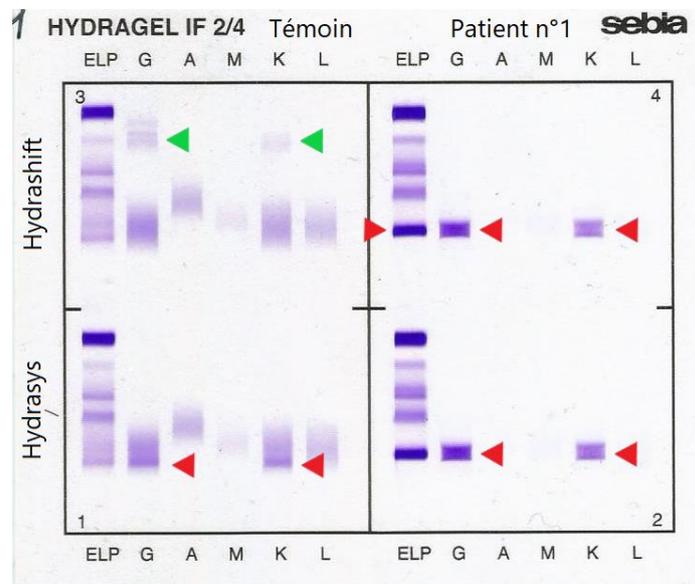
# 7. Annexes

## Annexe n°1 : immunofixations

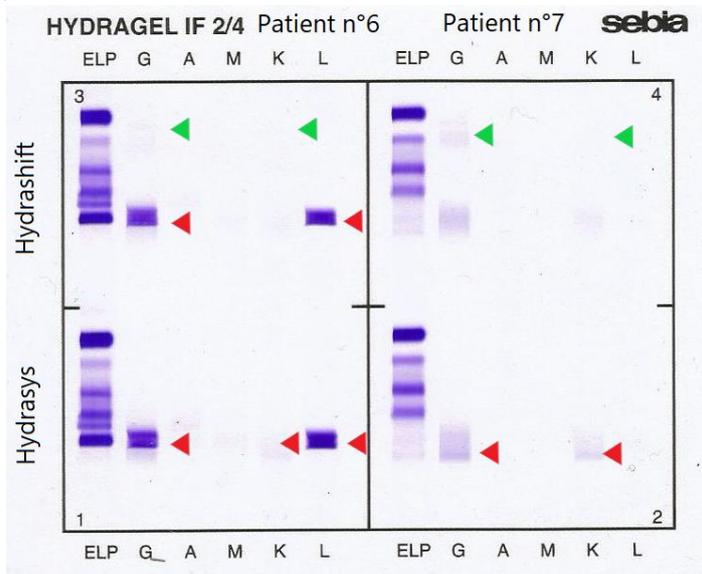
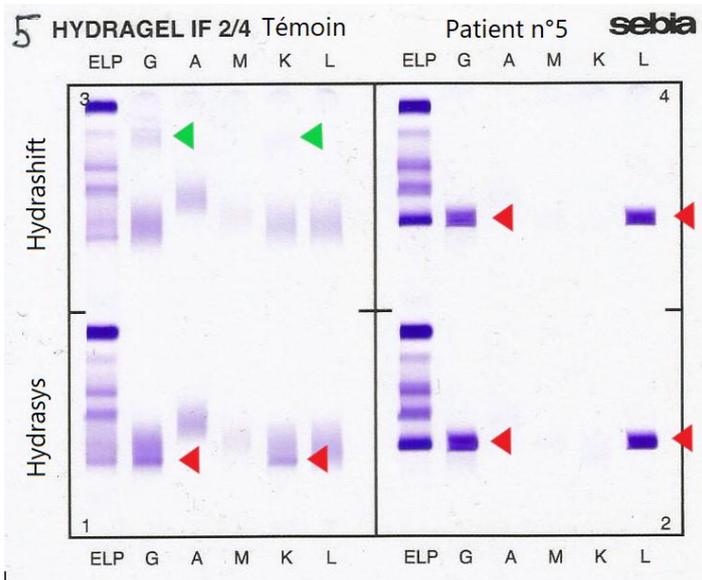
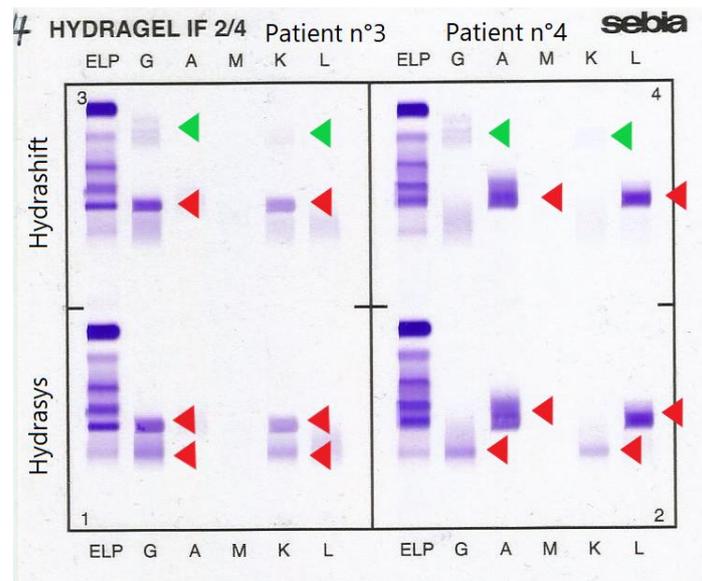
▶ Bande monoclonale

▶ Complexe daratumumab/anti-daratumumab

Échantillons n°1, 2 et témoin



Échantillons n°3, 4, 5, 6 et 7



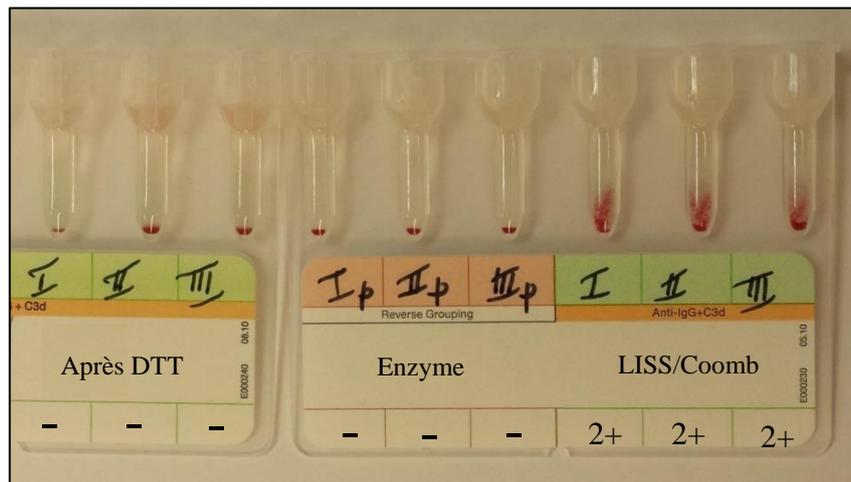
Annexe 2 : recherche d'anticorps irréguliers

1) Validation de la méthode de traitement des hématies au DTT

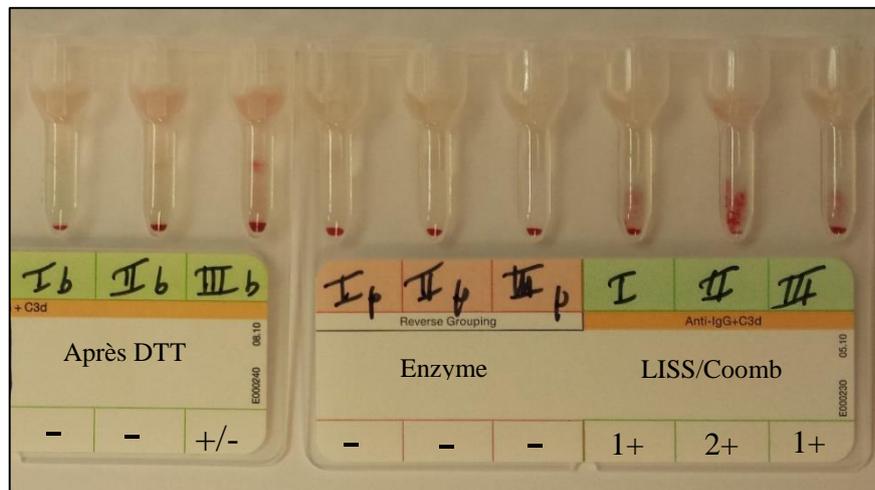
Échantillon n°1



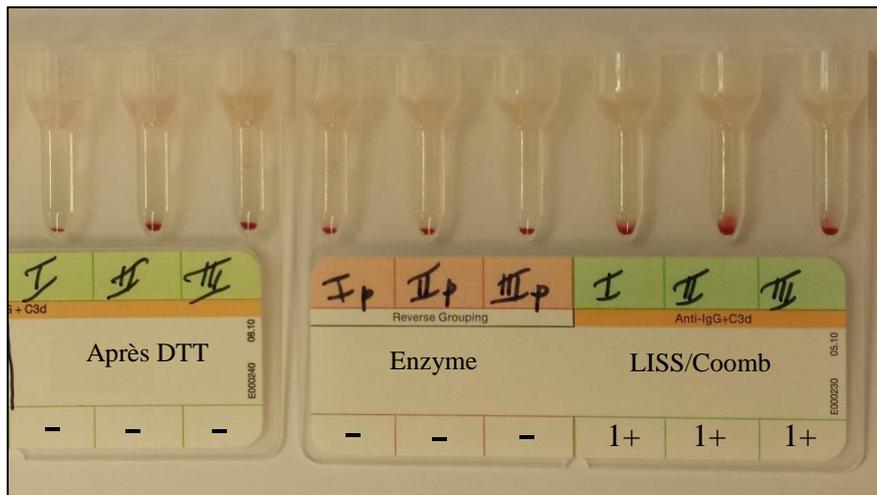
Échantillon n°2



Échantillon n°3



Échantillon n°4



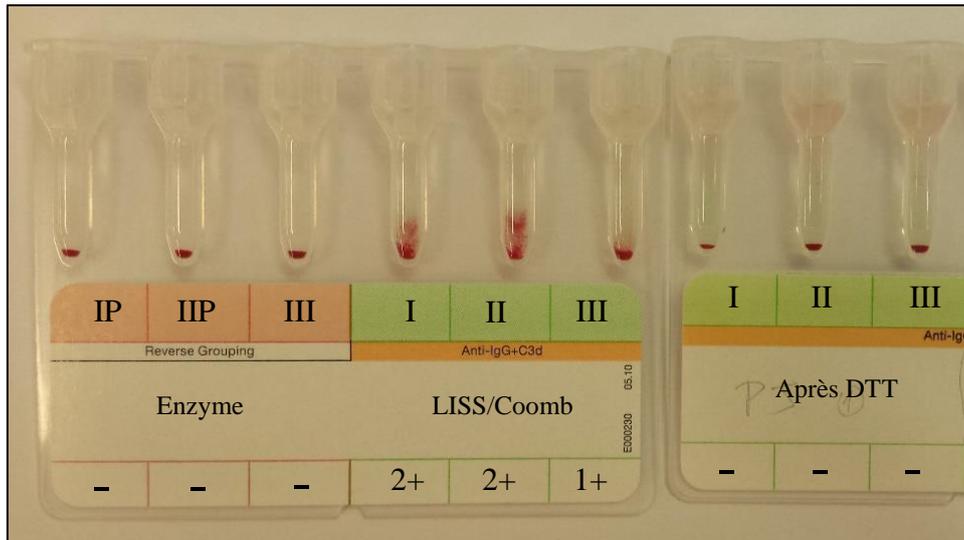
Échantillon n°5



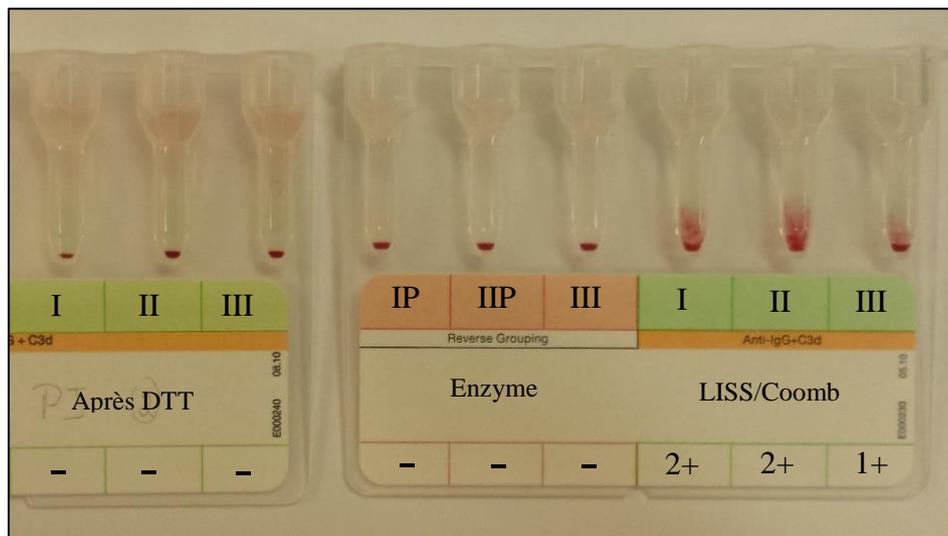
Résultat n°6



Résultat n°7



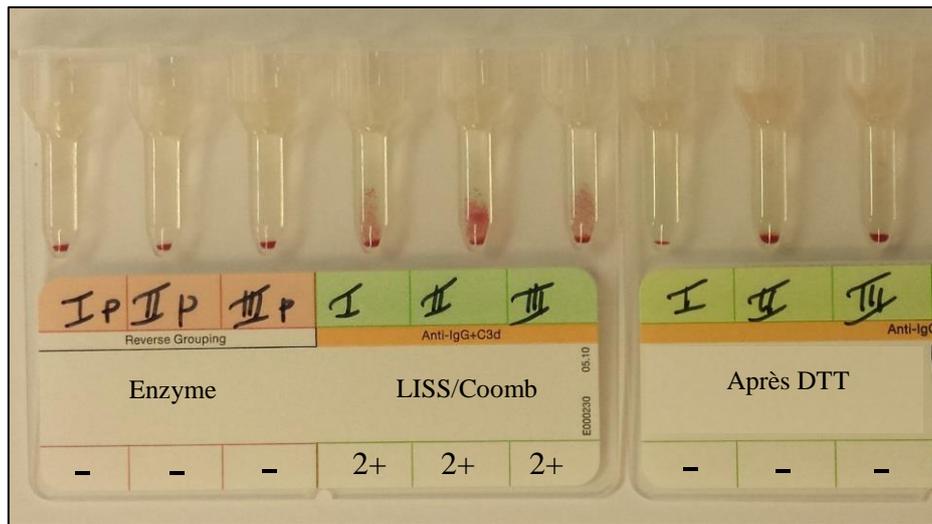
Résultat n°8



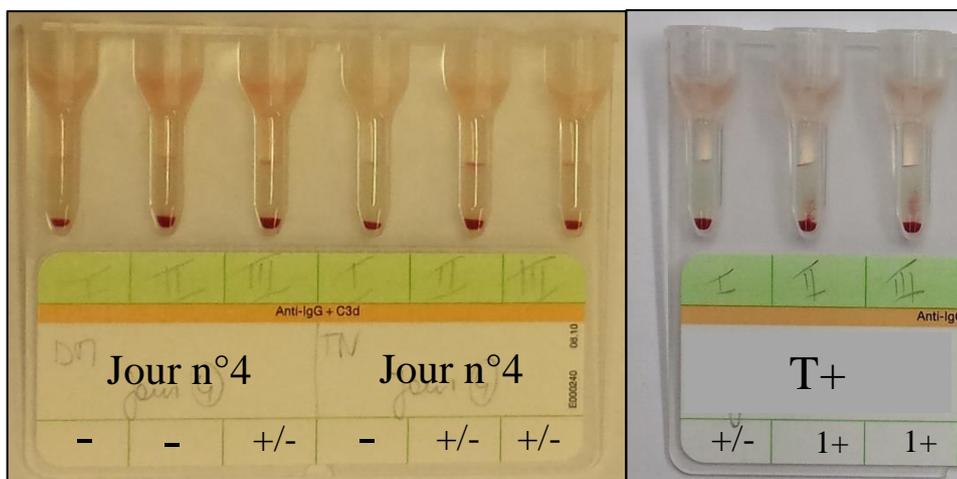
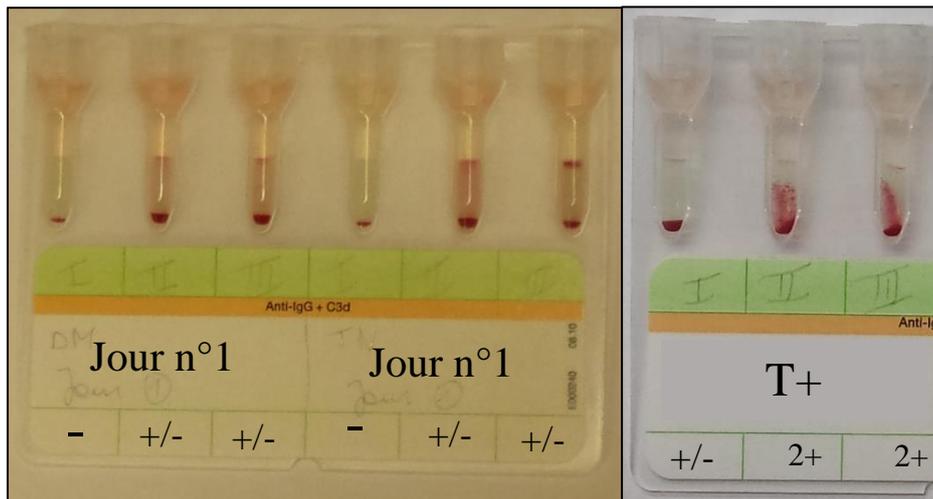
Résultat n°9

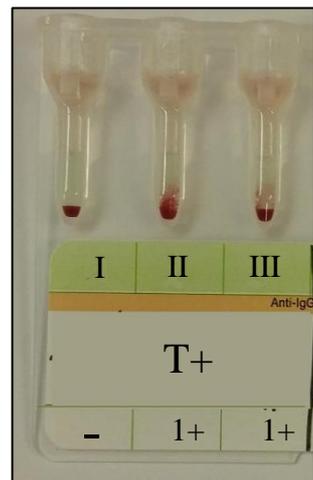
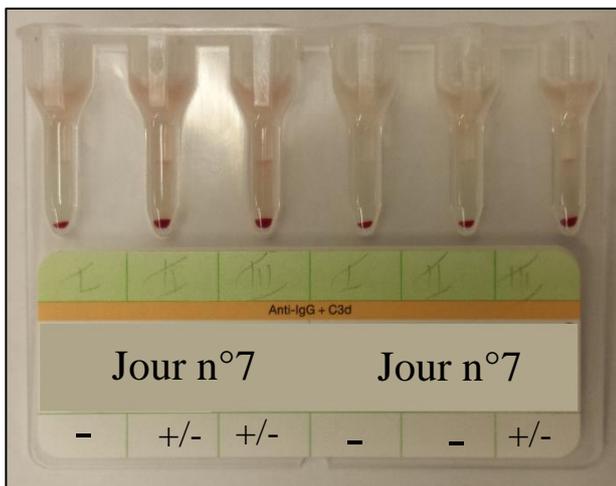
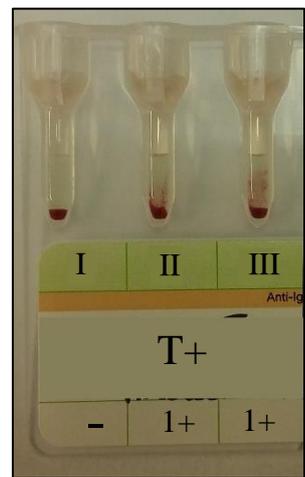
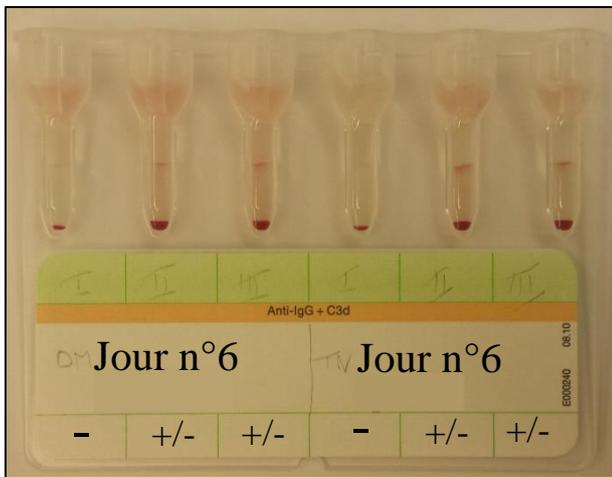
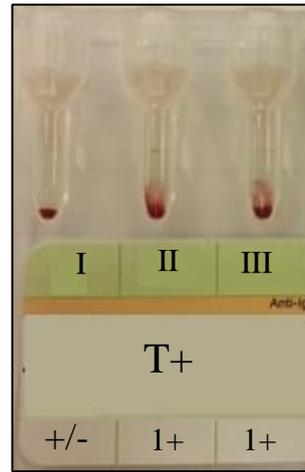
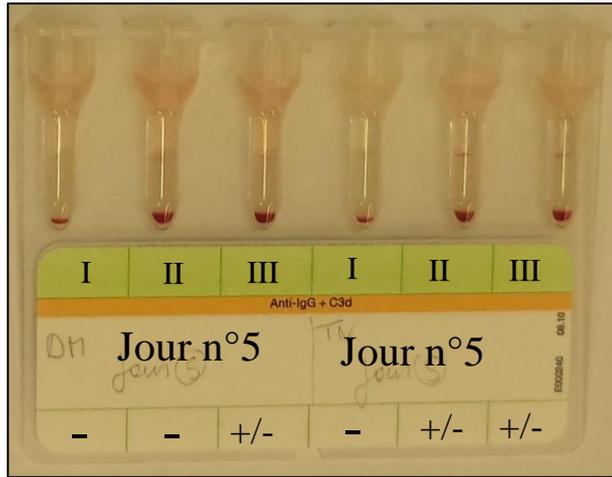


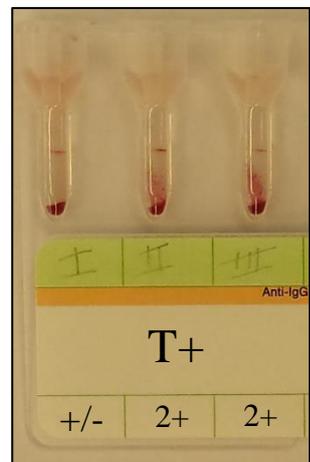
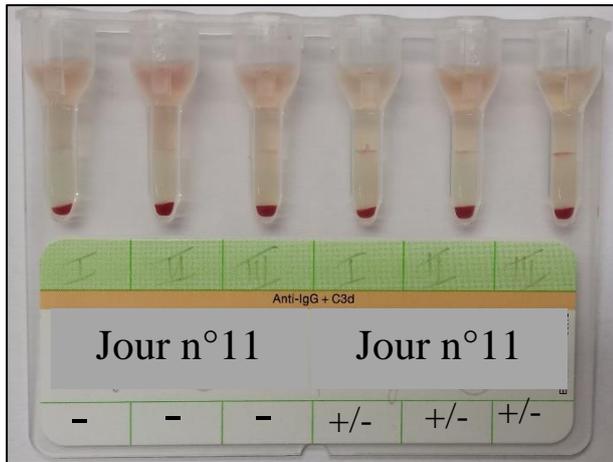
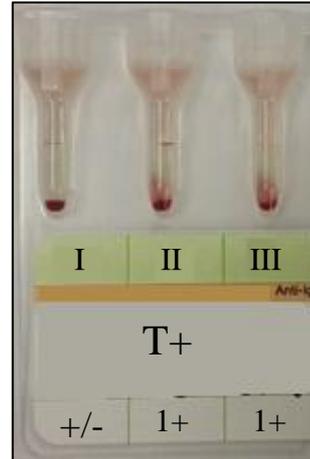
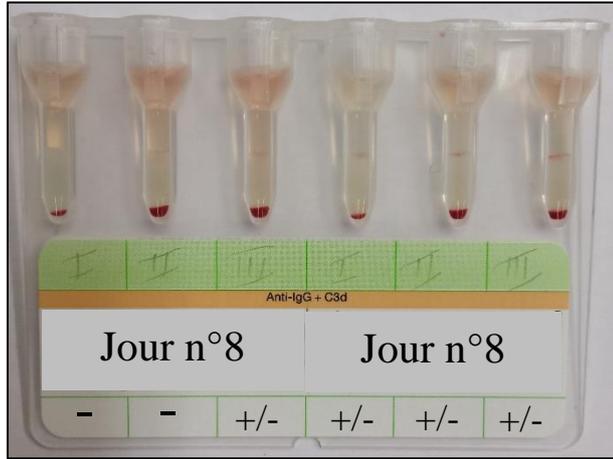
Résultat n°10



2) Étude de la stabilité des hématies dans le temps







## **Les interférences du daratumumab dans le suivi du myélome multiple et en transfusion sanguine**

### **RÉSUMÉ**

Le myélome multiple fait partie des cancers hématologiques les plus courants, en particulier chez les personnes âgées. Autrefois incurable, des nouveaux traitements ont vu le jour et la survie des patients a pratiquement doublé. Parmi ceux-ci, le daratumumab, récemment arrivé sur le marché, est utilisé pour traiter le myélome récidivant et réfractaire aux traitements classiques. Cependant, sa structure d'anticorps monoclonal (Ig G  $\kappa$ ) et sa cible (le CD38) provoque l'apparition d'interférences, d'une part lors de l'immunofixation des protéines sériques et d'autre part lors de la recherche d'anticorps anti-érythrocytaires irréguliers.

Afin d'éliminer les interférences du médicament, la méthode « *Daratumumab Immunofixation Reflex Assay* (DIRA) », commercialisée par SEBIA® sous le nom d'Hydrashift et ajoutée lors de l'immunofixation, déplace le complexe daratumumab – anti-daratumumab hors de la zone des  $\gamma$ -globulines. Concernant la recherche d'anticorps irréguliers, le traitement des hématies-test au DTT dénature le CD38 à la surface des globules rouges, empêchant la fixation du médicament. Cependant, la méthode étant longue, fastidieuse et peu reproductible, l'optimisation de celle-ci via la préparation de solutions *home made* dont le pH a été rigoureusement respecté et l'étude de stabilité des cellules traitées se sont avérées être nécessaires.

Les bons résultats obtenus avec l'analyse Hydrashift démontrent les performances intéressantes de la technique. Son utilisation peut parfois être nécessaire, néanmoins le coût de l'analyse et le faible nombre de patients concernés par cette interférence constituent un frein à son utilisation en routine. En transfusion, l'utilisation de globules rouges traités au DTT lors de la recherche d'anticorps irréguliers permet très souvent d'éliminer les positivités dues au médicament. Cependant, le manque de reproductibilité de celle-ci peut conduire à une dénaturation partielle du CD38 à la surface des globules rouges, rendant la lecture et l'interprétation des résultats difficiles. Les cellules traitées ayant montré une stabilité de huit jours, la préparation d'un stock de globules rouges traités de façon hebdomadaire plutôt que quotidienne permet dès lors de se prémunir face aux éventuelles urgences.

**Mots-clés :** Myélome Multiple, Daratumumab, Anti-CD38, Immunofixation, Recherche d'Anticorps Anti-Érythrocytaires Irréguliers, Interférences Antiglobuline