

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

Ministère de l'Enseignement
Supérieur et de la Recherche
Scientifique

Université de Mouloud Mammeri
Faculté de médecine
Tizi-Ouzou

Département de Pharmacie



وزارة التعليم العالي
والبحث العلمي

جامعة مولود معمري
كلية الطب
تيزي وزو

PROJET DE FIN D'ÉTUDES

N° D'ORDRE :

Présenté et soutenu

Le : 16 juillet 2019

En vue de l'obtention du diplôme de Docteur en Pharmacie

Thème

Etude comparative de la sensibilité du test direct à l'antiglobuline, entre la technique sur carte gel et sur tube et la corrélation des résultats avec la clinique.

Réalisé Par :

-CHAYEB Samia -FEKHART Nassima -SALMI Fatma

Encadré par : Dr. SI-SMAIL Nedjma

Co-promotrice : Dr. TAIB Karima

Composition du jury :

-Dr. KESSAL Fatma	MAHU	UMMTO	Présidente
-Dr. TOUDERT Amar	MAHU	UMMTO	Examineur
-Dr. HADJ-ARAB Dehbia	Assistante	CHUTO	Examinatrice

ANNÉE UNIVERSITAIRE : 2018/2019

REMERCIEMENTS

Au terme de la rédaction de ce mémoire, nous remercions ALLAH le tout puissant et miséricordieux qui nous a guidé et donné la force, le courage et la volonté pour réaliser ce travail.

Nous dédions ce travail :

A nos parents, nos frères et sœurs qui nous ont aidés, encouragés et soutenus dans les moments difficiles car c'est grâce à eux qu'on a pu surmonter tous les obstacles que nous avons rencontrés.

*Il nous est très agréable d'exprimer notre gratitude, et reconnaissance et nos sincères remerciements à notre promotrice **Dr SI-SMAIL.Nedjma** Maitre assistante en hématologie et transfusion sanguine qui nous a transmis de précieux conseils et pour la qualité de son suivi et de la confiance qu'elle a bien voulu nous accorder.*

Nous remercions :

*Au **Dr.TAIB Karima**, notre co-promotrice, Résidente en Epidémiologie et médecine préventive au CHU de Tizi-Ouzou, pour ses conseils judicieux, sa gentillesse, sa patience et pour les efforts qu'elle a déployés pour notre formation.*

*Au **Dr. KESSAL Fatma**, Maitre assistante en Hématologie au CHU de Tizi-Ouzou. Nous sommes très touchés par l'honneur que vous nous faites de bien vouloir présider le jury de notre soutenance, nous vous prions d'accepter notre profond respect.*

*Au **Dr. TOUDERT**, Maitre-assistant en Immunologie au CHU de Tizi-Ouzou, Vous nous avez honorés d'accepter avec grande sympathie de siéger parmi notre jury de ce mémoire, Veuillez trouver ici l'expression de notre grand respect et nos vifs remerciements.*

*Au **Dr. HADJ-ARAB Dehbia** Assistante en Hématologie au CHU de Tizi-Ouzou, veuillez accepter nos sincères remerciements de bien vouloir juger ce travail et être présente parmi le jury de ce mémoire.*

Nos remerciements vont enfin à toute personne qui, de près ou de loin, a contribué à l'élaboration de ce modeste travail.

Dédicaces

À mes très chers parents

Tous les mots du monde ne sauraient exprimer l'immense amour que je vous porte, ni la profonde gratitude que je vous témoigne pour tous les efforts et les sacrifices que vous n'avez jamais cessé de consentir pour mon instruction et mon bien-être. Que ce travail puisse être le fruit de vos efforts et le début de mes récompenses envers vous que Dieu vous garde et vous procure santé, bonheur et longue vie pour que vous demeuriez le flambeau illuminant le chemin de vos enfants.

À mes chères sœurs Kahina, Kamelia et Kenza et mon cher frère Rayane, merci, pour votre soutien, pour votre amour dévoué et d'avoir toujours été à mes côtés. J'espère que ce travail vous serve d'exemple.

À ma sœur Kahina et à son mari Redouen.

À mon neveu Soen, que Dieu le garde.

À la mémoire de mes grands-parents, que Dieu les accueille dans son vaste paradis.

À ma grand-mère et à tous mes cousins, cousines, tantes et oncles,

Je tiens à tous vous exprimer ma profonde gratitude.

À mes consœurs : Samia et Fatma, merci pour votre patience, votre tolérance et pour tous les moments qu'on a partagé ensemble afin de donner naissance à ce travail.

À Lydia. CH, Sabrina. A, Sabrina. Ch, Sabrina. B et Kahina. B, merci pour tous les souvenirs pendant toutes ces années.

À tous mes enseignants qui m'ont formé tout au long de mon cursus et à tous ceux et celles qui me sont chers et qui j'ai involontairement omis de citer, merci.

Nassima

Dédicaces

À mes chers parents.

*Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être.
Votre amour, Vos encouragements et vos prières m'ont été d'un grand soutien au cours de ce long parcours.*

Vous m'avez toujours incité à aller de l'avant.

Que ce travail puisse être le fruit de vos efforts et le début de mes récompenses envers vous.

Puisse Dieu vous procure santé, bonheur et longue vie.

À mes sœurs, Nassima, Malika, Melissa et mon cher frère Sofiane merci pour votre soutien, votre amour dévoué, vos conseils et vos encouragements. Je vous souhaite une vie heureuse, pleine de bonheur et de réussite.

À mon cher futur mari Mohammed, je ne pourrai jamais exprimer l'amour que j'ai pour toi, t'es grandes attentions ta disponibilité et tes conseils ont été d'une grande aide pour moi. C'est un cadeau de t'avoir dans ma vie, merci.

À mes chers grands-parents maternels et paternels, merci pour vos encouragements, que Dieu vous donne la santé et vous accorde une longue vie.

À mes beaux-parents, mes belles sœurs et mon beau-frère ; En témoignage de ma profonde affection et mon grand respect.

À mes tantes et mes oncles.

À tous mes cousins et cousines.

À mes consœurs : Nassima et Fatma merci pour votre patience, votre tolérance et pour tous les moments qu'on a partagé ensemble afin de donner naissance à ce travail.

À Sabrina A, Sabrina Ch, Sabrina B, Kahina, Lydia, Samira, Nadia et Sonia. Je vous remercie pour tous les moments qu'on a passés ensemble, et je vous souhaite une vie pleine de succès et de bonheur.

À tous mes enseignants qui m'ont formé tout au long de mon cursus, merci

À tous ceux qui me sont chers

Samia

Dédicaces

Je dédie ce travail

A l'homme de ma vie, mon exemple éternel, mon soutien moral et source de joie et de bonheur, celui qui s'est toujours sacrifié pour me voir réussir, que dieu vous garde pour nous, à vous mon père.

A la lumière de mes jours, la source de mes efforts, la flamme de mon cœur, ma vie et mon bonheur, maman que j'adore.

A ma sœur Samira pour ces conseils, aide et encouragement.

A mes cousins et cousines.

A mon amie A. Fatma.

A mes binômes Samia et Nassima.

Et à tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin.

Fatma

SOMMAIRE

Liste des abréviations	i
Liste des tableaux	iv
Liste des figures	vi

INTRODUCTION GENERALE ET PROBLEMATIQUE.

PARTIE THEORIQUE :

CHAPITRE I : généralités sur le globule rouge

1-Définition du globule rouge	01
2-synthèse.....	01
3-contenu.....	02
4-Structure de la membrane érythrocytaire	03
4-1- Les lipides.....	03
4-2- Les protéines membranaires	05
4-2-1-es protéines extrinsèques=squelette membranaire	06
4-2-1-1- Spectrine	06
4-2-1-2- Le complexe de jonction	07
4-2-1-2- a- L'actine	07
4-2-1-2- b- La protéine 4-1.....	07
4-2-1-2- c- La protéine 4-9 ou dématine	07
4-2-1-2- d- L'adducine	07
4-2-1-2- e- La tropomyosine	07
4-2-1-2- f- La tropomoduline	07
4-2-1-2- g- L'ankyrine	08
4-2-2- Les Protéines intrinsèques: transmembranaires = intégrales.....	08
4-2-2-1- La protéine 3	08
4-2-2-2- Les Glycophorines	09
5- Propriétés et rôle de la membrane.....	10
5-1- Déformabilité	10
5-2- Rétention des molécules de l'hémoglobine	10
5-3- Les échanges transmembranaires	10
5-4-La fonction support : Les antigènes membranaires	10
6-Les fonctions de l'hémoglobine.....	11

7- Hémolyse physiologique.....	11
7-1- Définition.....	11
7-2- Hémolyse intratissulaire (extravasculaire)	12
7-3- Hémolyse intravasculaire	14
8- L'hémolyse pathologique ou hyper-hémolyse.....	16
8-1- Définition.....	16
8-2- L'hémolyse d'origine corpusculaire (L'hémolyse extravasculaire).....	16
8-3- L'hémolyse extra-corpusculaire (L'hémolyse intra-vasculaire)	17

CHAPITRE II : Les groupes sanguins érythrocytaires

1-Rappels immunologiques.....	19
1-1-Les antigènes	19
1-2- Les anticorps.....	19
1-2-1 -Définition	19
1-2-2 -Structure	19
1-2-3- Les classes des anticorps	20
1-2-4 -Fonctions des Immunoglobulines.....	22
1-2-4-1- Fonction de reconnaissance	22
1-2-4-2- Fonctions effectrices	22
1-3- La réaction antigène-anticorps.....	26
1-3-1- Définition	26
1-3-2 -Caractéristique générales de la réaction Ac-Ag	26
1-3-3- Classification.....	27
2- Groupes sanguins érythrocytaires	29
2-1-Définition.....	29
2-2-Le système ABO.....	29
2-3-Le système rhésus	32
2-4-Le système Kell	32
2-5- Les autres systèmes	32

CHAPITRE III : les anémies hémolytiques

1- Définition des anémies hémolytiques	34
2- Classification.....	34
2-1-Les anémies hémolytiques corpusculaires.....	34

2-1-1-Les hémoglobinopathies.....	34
2-1-2-Les anomalies enzymatiques	35
2-1-3-Les anomalies de la membrane érythrocytaire	35
2-2-Les anémies hémolytiques extracorporelles.....	36
3-Les anémies hémolytiques immunologiques	36
3-1-Les anémies hémolytiques allo-immunes.....	36
3-1-1-Définition	36
3-1-2-L'incompatibilité fœto-maternelle	36
3-1-2-1-Physiopathologie.....	37
3-1-2-2-Classification.....	38
3-1-2-2-1-Les incompatibilités Rhésus D	38
3-1-2-2-2-Les incompatibilités ABO	39
3-1-2-2-3-Les autres incompatibilités	39
3-1-2-3-Diagnostic biologique	40
3-1-3-L'incompatibilité anti-érythrocytaire post transfusionnelle	40
3-1-3-1-Physiopathologie.....	41
3-1-3-2-Diagnostic biologique	42
3-1-4-Les anémies hémolytiques immuno-allergiques	42
3-1-4-1-Physiopathologie.....	42
3-1-4-2-Le diagnostic biologique	43
3-2- Les anémies hémolytiques auto-immunes.....	43
3-2-1- Définition	43
3-2-2- Classification.....	44
3-2-2-1- Classification immunologique	44
3-2-2-2- Classification étiologique.....	47
3-2-2-3- Classification évolutive.....	47
3-2-3- Physiopathologie	47
3-2-4-Diagnostic positif d'une anémie hémolytique.....	50
3-2-4-1- Diagnostic clinique	50
3-2-4-2- Diagnostic biologique	51
3-2-4-3- Diagnostic immuno-hématologique.....	51

CHAPITRE IV : teste de coombs directe

1- Définition du test de Coombs direct	55
2-Historique.....	55
3-Principe	55
4-Prélèvements	57
5-Techniques	57
5-1-Technique en tube.....	57
5-1-1- Préparation des hématies	58
5-1-2- Réactifs.....	59
5-1-3- Répartition.....	60
5-1-4- Etapes d'incubation Centrifugation	60
5-1-5- Remises en suspension des hématies	60
5-1-6- Lecture et interprétation des réactions	61
5-1-7- Contrôle du système analytique	61
5-2 -Technique sur gel	62
5-2-1- Préparation des hématies	62
5-2-2- Réactifs.....	63
5-2-3- Lecture et interprétation des résultats.....	63
5-3- Autres techniques	64
5-3-1- La technique d'immunocapture.....	64
5-3-2 - La technique d'immunoadhérence en microplaque	64
6-Indication du TCD	65
7-La positivité d'un TCD	65
8-Sensibilité et limites.....	66

PARTIE PRATIQUE

1-Rappel des objectifs	
1-1-Objectif principal.....	68
1-2-Objectifs secondaires.....	68
2- Matériels et méthodes	68
2-1-Type d'étude	68
2-2-Lieu d'étude.....	68
2-3-Population d'étude.....	68

2-4-Période d'étude	68
2-5-Moyens	68
2-5-1 Moyens humains	69
2-5-2 Moyens matériels.....	69
2-5-3 Réactifs	69
2-6-Méthodes.....	71
2-6-1- Phase pré-analytique	71
2-6-1-1- Fiche de renseignement.....	71
2-6-1-2-Prélèvement	71
2-6-1-3- Circuits des échantillons	71
2-6-1-4- Conservation et transport	71
2-6-1-5- Centrifugation	72
2-7- Phase analytique	72
2-7-1- Technique en tube	72
2-7-2- Lecture au microscope optique	73
2-7-3- Technique sur gel	74
2-7-4-Etude comparative de la sensibilité du test de Coombs directe entre la technique en tube et en gel sur des hématies tests sensibilisés in vitro.....	75
2-7-4-1-Introduction.....	75
2-7-4-2-Préparation des hématies tests	75
2-7-4-3-Dilutions de l'anti-D type IgG.....	75
2-7-4-4-Sensibilisation des hématies	77
2-7-4-5-Réalisation du TCD.....	77
2-7-4-6-Lecture.....	77
2-8- Recueil des données.....	78
2-9- Plan d'analyse	78
3-Résultats.....	80
4-Discussion	114

CONCLUSION

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ANNEXES

Liste des abréviations

2, 3 DPG : 2, 3 DiPhosphoGlycérate.

Ac :Anticorps.

ADCC : Antibody-dependent Cell-mediated Cytotoxicity.

AF : Agglutinine Froide.

Ag : antigène.

AG: acide gras.

AGH : Anti globuline humaine.

AH : anémie hémolytique.

AHAI : Anémie Hémolytique Auto-immune.

AHAic : Anémie Hémolytique Auto-immune à anticorps chaud.

AHIA : Anémie hémolytique immuno-allergique.

AMPc : adénosine monophosphate cyclique.

C : Complément.

CAM : Complexe d'attaque membranaire.

CD25+ : Cluster de différenciation 25.

CD4+ : Cluster de différenciation 4.

CIQ : Contrôle interne de qualité.

CO : monoxyde de carbone.

CO2 : dioxyde de carbone.

DS : Différence significative.

DNS : Différence Non significative.

EBV : Epstein Barr Virus.

EDTA :Éthylène diamine tétra-acétique.

EDC : L'épreuve directe de compatibilité au laboratoire.

Fab : Fragment variable.

FC :cytométrie en flux.

Fc : Fragment constant.

FNS : formule de numération sanguine.

Fy : Duffy.

G3PDH : la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase.

G6PD : Glucose-6-Phosphate Déshydrogénase.

GR : globule rouge.

GS : Groupe sanguin.

Hb S : hémoglobine scikle.

Hb : hémoglobine.

HPF : Hémoglobinurie Paroxystique à Frigore.

HPN : hémoglobinurie paroxystique nocturne.

IFM : incompatibilité foeto-maternelle.

Ig : Immunoglobuline.

IgG : Immunoglobuline G.

IgM : Immunoglobuline M.

IL 3 : interleukine 3.

IL 1 : interleukine 1.

Jk : kidd.

K :Kell.

KD : *Kilodalton*.

LB : Lymphocytes B.

LMNH : Lymphome Malin Non Hodgkinien.

LT : Lymphocytes T.

MAF : Maladie des Agglutinines Froides.

Mb : Membrane.

MCAF : Maladie Chronique des Agglutinines Froides.

Na⁺ /K⁺ : Sodium /Potassium.

Nk : Natural Killer.

Nné : Nouveau –né.

NO : monoxyde d'azote.

O2 : dioxygène.

PAS : acide périodique schiff.

PCM : Pâleur cutanéomuqueuse.

PCO2 : pression partielle de gaz carbonique.

PFK : phosphofructokinase.

PGDF :platelet-derivedgrowth factor (facteur de croissance des plaquettes).

pH : potentiel hydrogène.

PM : poids moléculaire.

RAI : La recherche d'agglutinines irrégulières.

RhD :RhésusD.

Rh : Rhésus.

SDS : Dodécysulfate de sodium.

SH :Sulfhydryle.

SPM : Splénomégalie.

TCD : Test de Coombs Direct.

TDA : Test Direct à l'Antiglobuline.

Th1 /Th2 : T helper / T helper 2.

Liste des tableaux

Tableau 1 : Les classes des immunoglobulines.....	21
Tableau 2 : Principales caractéristiques des différents types d’AHAI	46
Tableau 3 :Répartition de la population d’étude selon le sexe, CHU Tizi-Ouzou	80
Tableau 4 : Répartition de la population d’étude selon les tranches d’âge, CHU Tizi-Ouzou	81
Tableau 5 : Répartition de la population d’étude selon le service, CHU Tizi-Ouzou.....	82
Tableau 6 : Répartition de la population d’étude selon le groupe sanguin ABO, CHU Tizi-Ouzou	83
Tableau 7 : Répartition de la population d’étude selon le Rhésus D, CHU Tizi-Ouzou	84
Tableau 8 : Répartition de la population d’étude selon le phénotype, CHU Tizi-Ouzou.....	85
Tableau 9 : Résultats du RAI, CHU Tizi-Ouzou, Décembre.....	86
Tableau 10 : Les antécédents transfusionnels de la population d’étude, CHU Tizi-Ouzou	87
Tableau 11 : Répartition de la population selon le nombre de grossesse, CHU Tizi-Ouzou	87
Tableau 12 : Répartition de la population selon les antécédents pathologiques.....	88
Tableau 13 : Les antécédents pathologiques retrouvés chez les patients, CHU Tizi-Ouzou.....	89
Tableau 14 : Répartition de la population selon le motif d’hospitalisation, CHU Tizi-Ouzou	90
Tableau 15 : Répartition de la population d’étude selon la présence des signes cliniques d’hémolyse	91
Tableau 16 : Répartition de la population selon les signes cliniques d’hémolyse, CHU Tizi-Ouzou	92
Tableau 17 : Le Taux de l’hémoglobine chez la population d’étude, CHU Tizi-Ouzou.....	93
Tableau 18 : Le Taux de VGM chez la population d’étude, CHU Tizi-Ouzou.....	94
Tableau 19 : Le Taux de TGMH chez la population d’étude, CHU Tizi-Ouzou	95
Tableau 20 : Le Taux de CCMH chez la population d’étude, CHU Tizi-Ouzou	96
Tableau 21 : Le taux de réticulocytes chez la population d’étude, CHU Tizi-Ouzou	97
Tableau 22 : Le Taux des plaquettes chez la population d’étude, CHU Tizi-Ouzou	98
Tableau 23 : Le Taux des globules blancs chez la population d’étude, CHU Tizi-Ouzou.....	99
Tableau 24 : Le taux de la bilirubine totale chez la population d’étude, CHU Tizi-Ouzou	100
Tableau 25 : Le taux de la bilirubine directe chez la population d’étude, CHU Tizi-Ouzou	100
Tableau 26 : Le taux de LDH chez la population d’étude, CHU Tizi-Ouzou	101
Tableau 27 : Le Taux de la ferritine chez la population d’étude, CHU Tizi-Ouzou	102
Tableau 28 : Répartition de la population d’étude selon le frottis sanguin, CHU Tizi-Ouzou.....	102
Tableau 29 : Résultats du TCD effectué sur tube, CHU Tizi-Ouzou	103
Tableau 30 : Résultats du TCD effectué sur microscopeoptique, CHU Tizi-Ouzou.....	104

Tableau 31 : Résultats du TCD effectué sur carte gel, CHU Tizi-Ouzou.....	106
Tableau 32 : Résultats des tests de TCD effectués sur des hématies tests, CHU Tizi-Ouzou.....	107
Tableau 33 : Comparaison entre TCD sur tube et TCD sur carte gel	109
Tableau 34 : Comparaison entre TCD sur tube avec lecture au microscope et TCD sur carte gel	109
Tableau 35 : Comparaison entre TCD sur tube avec et sans lecture sur microscope	110
Tableau 36 :Sensibilité de TCD sur tube avec microscope	110
Tableau 37 :Sensibilité du TCD sans microscope.....	111
Tableau 38 : Comparaison entre les signes cliniques d'hémolyse et résultats de TCD.....	111
Tableau 39 : Comparaison entre le taux de la bilirubine total et résultats de TCD	111
Tableau 40 : Comparaison entre le taux de la bilirubine directe et les résultats de TCD	112
Tableau 41 : Comparaison entre le taux de LDH et les résultats de TCD	112
Tableau 42 :Comparaison entre l'anémie et les résultats de TCD.....	112
Tableau 43 :Comparaison entre la thrombopénie et les résultats de TCD.....	113
Tableau 44 : Comparaison entre l'hyperleucocytose et les résultats de TCD	113
Tableau 45 :Comparaison entre les avantages et les inconvénients de la technique sur tube et sur carte gel	117

Liste des figures

Figure 1 : Image de globules rouges humains.....	01
Figure 2 : Les étapes de l'érythropoïèse	02
Figure 3 : Schéma de la membrane du globule rouge	03
Figure 4 : membrane du GR: disposition tridimensionnelle des différentes protéines membranaires (A); vue en microscopie électronique (B).....	05
Figure 5 : profil électrophorétique sur gel de polyacrylamide des protéines de la membrane Erythrocytaire.....	06
Figure 6 : schéma d'hémolyse intra tissulaire.....	13
Figure 7 : Schéma d'hémolyse intra vasculaire	15
Figure 8 : Structure d'une immunoglobuline	20
Figure 9 : Les voies d'activation du complément	24
Figure 10 : complémentarité stérique.....	26
Figure 11 : Potentiel ζ	28
Figure 12 : l'incompatibilité foeto-maternelle érythrocytaire.....	37
Figure 13 : passage des hématies fœtales dans le sang maternel	38
Figure 14 : la compatibilité globulaire	41
Figure 15 : mécanisme de sensibilisation des hématies par adsorption du complexe médicament-antimédicament	43
Figure 16 : Mécanisme de destruction des hématies dans les AHAI.....	49
Figure 17 : Schéma explicatif d'un TCD positif.....	52

Figure 18 : Test de Coombs indirect	53
Figure 19 : Test direct à l'antiglobuline en tube	58
Figure 20 : Représentation schématique d'un microtubule.....	62
Figure 21 : Exemples de revêtements érythrocytaire par des IgG et C3d ou par des IgG	64
Figure 22 :Antiglobuline humaine polyvalente.....	70
Figure 23 : Anticorps anti-D type IgG	70
Figure 24 : Anticorps anti-C3d.	70
Figure 25 : Anticorps anti-IgG.....	70
Figure 26 : Test de coombs positif en tube	73
Figure 27 : Test de coombs positif sur microscope.....	74
Figure 28 : Test de coombs positif sur carte gel	75
Figure 29 : l'ID-diluant	76
Figure 30 : l'anti-D type IgG	76
Figure 31 : dilutions en série de l'anti-D	77
Figure 32 : Répartition de la population d'étude selon le sexe, CHU Tizi-Ouzou, Décembre 2018-Avril 2019.....	80
Figure 33 : Répartition de la population d'étude selon la moyenne d'âge, CHU Tizi-Ouzou, Décembre 2018-Avril 2019.....	81
Figure 34 : Répartition de la population d'étude selon les tranches d'âge, CHU Tizi-Ouzou, Décembre 2018-Avril 2019.....	82
Figure 35 : Répartition de la population d'étude selon le service, CHU Tizi-Ouzou, Décembre 2018-Avril 2019.....	83
Figure 36 : Répartition de la population d'étude selon le groupe sanguin, CHU Tizi-Ouzou, Décembre 2018-Avril 2019.....	84
Figure 37 : Répartition de la population d'étude selon le Rhésus, CHU Tizi-Ouzou,	

Décembre 2018-Avril 2019.....	85
Figure 38 : Répartition de la population d'étude selon le phénotype, CHU Tizi-Ouzou, Décembre 2018-Avril 2019.....	86
Figure 39 : Résultats du RAI, CHU Tizi-Ouzou, Décembre 2018-Avril 2019.....	86
Figure 40 : Les antécédents transfusionnels de la population d'étude, CHU Tizi-Ouzou, Décembre 2018-Avril 2019.....	87
Figure 41 : Répartition de la population d'étude selon le nombre de grossesse, CHU Tizi-Ouzou Décembre 2018-Avril 2019.....	88
Figure 42 : Répartition de la population selon les antécédents pathologiques, CHU Tizi-Ouzou Décembre 2018-Avril 2019.....	89
Figure 43 : Répartition de la population selon la présence des signes cliniques d'hémolyse, CHU Tizi-Ouzou, Décembre 2018-Avril 2019.....	91
Figure 44 : Répartition de la population selon les signes cliniques d'hémolyse, CHU Tizi-Ouzou ; Décembre 2018-Avril 2019.....	92
Figure 45 : Le Taux de l'hémoglobine chez la population d'étude, CHU Tizi-Ouzou, Décembre 2018-Avril 2019.....	93
Figure 46 : Le Taux de VGM chez la population d'étude, CHU Tizi-Ouzou, Décembre 2018-Avril 2019.....	95
Figure 47 : Le Taux de TGMH chez la population d'étude, CHU Tizi-Ouzou, Décembre 2018-Avril 2019.....	96
Figure 48 : Le Taux de CCMH chez la population d'étude, CHU Tizi-Ouzou, Décembre 2018-Avril 2019.....	97
Figure 49 : Le taux de réticulocytes chez la population d'étude, CHU Tizi-Ouzou, Décembre 2018-Avril 2019.....	97
Figure 50 : Le Taux des plaquettes chez la population d'étude, CHU Tizi-Ouzou, Décembre 2018-Avril 2019.....	98
Figure 51 : Le Taux des globules blancs chez la population d'étude, CHU Tizi-Ouzou, Décembre 2018-Avril 2019.....	99
Figure 52 : Le taux de la bilirubine totale chez la population d'étude, CHU Tizi-Ouzou,	

Décembre 2018-Avril 2019.....	100
Figure 53 : Le taux de la bilirubine directe chez la population d'étude, CHU Tizi-Ouzou, Décembre 2018-Avril 2019.....	101
Figure 54 : Le taux de LDH chez la population d'étude, CHU Tizi-Ouzou, Décembre 2018-Avril 2019.....	101
Figure 55 : Le taux de la ferritine chez la population d'étude, CHU Tizi-Ouzou, Décembre 2018-Avril 2019.....	102
Figure 56 :Résultats du TCD effectué sur tube, CHU Tizi-Ouzou.....	104
Figure 57 : Résultats du TCD effectué sur microscope, CHU Tizi-Ouzou,Décembre 2018- Avril 2019	105
Figure 58 : Résultats du TCD effectué sur carte gel, CHU Tizi-Ouzou, Décembre 2018-Avril 2019.....	106
Figure 59 : les résultats de la sensibilisation des hématies sur carte gel.....	108
Figure 60 : le résultat du TCD pour la dilution.....	108
Figure 61 : le résultat du TCD pour la dilution 1/8.....	108

INTRODUCTION GENERALE ET PROBLEMATIQUE

Le test direct à l'antiglobuline (TDA) ou test de coombs direct (TCD) est l'un des tests les plus importants en immuno-hématologie, il fait partie des tests de base. Il permet la mise en évidence la sensibilité in vivo des hématies par des anticorps et/ou des fractions du complément grâce à l'utilisation d'un réactif particulier appelé antiglobuline humaine (AGH) monospécifique ou polyspécifique reconnaissant des immunoglobulines ou des fractions du complément à la surface des hématies, ce test doit être réalisé sur un échantillon de préférence anti coagulé. Il est essentiellement utilisé lors de la recherche des anémies hémolytiques auto-immunes, ou allo-immunes par incompatibilité fœto-maternelle (maladie hémolytique du nouveau-né) ou transfusionnelle ou d'origine médicamenteuse.

Le test direct à l'antiglobuline a comme support de réaction, la technique sur tube à hémolyse et la technique sur carte gel.

Le TCD est le premier examen réalisé afin d'établir un diagnostic fiable en cas d'anémies hémolytiques immunologiques. Il a été constaté au niveau du laboratoire d'hémobiologie du CHU de Tizi-Ouzou, des discordances entre le résultat du TCD réalisé sur tube au niveau du laboratoire des urgences et celui réalisé sur carte gel au niveau d'unité immuno-hématologie du service d'hémobiologie, ce qui nous a conduit à faire une étude comparative entre ces deux techniques.

Notre objectif principal est d'évaluer deux techniques de diagnostics de l'hémolyse, test direct à l'antiglobuline sur carte gel et sur tube.

Ainsi, nous évoquerons dans un premier temps, les anémies hémolytiques, leurs physiopathologies, leurs diagnostics, le test direct à l'anti globuline humaine et ce en exposant les données actuelles de la littérature.

Dans un second temps, nous présenterons les résultats de notre étude, portée sur des hématies tests et sur des patients des différents services du CHU de Tizi-Ouzou.

Enfin, nous procéderons à la discussion et à l'analyse des résultats de notre étude.

Objectifs :

1-Objectif principal :

Evaluation de deux techniques diagnostiques de l'hémolyse, test direct à l'antiglobuline sur carte gel et sur tube.

2-objectifs secondaires :

1-Décrire les caractéristiques sociodémographiques de la population d'étude.

2-Décrire les caractéristiques cliniques et biologiques de l'hémolyse.

3- Déterminer les avantages et les inconvénients de chaque technique.

4-Etablir des recommandations concernant les deux techniques

Partie théorique

Chapitre I :

Généralités sur le

Globule rouge

1-Définition du globule rouge

Le globule rouge, appelé aussi hématie ou érythrocyte est une cellule anucléée, sa forme caractéristique est biconcave avec un diamètre de 7 à 8 μm , l'intérieur est principalement composé d'une solution d'hémoglobine. Le GR est synthétisé dans la moelle osseuse à partir des précurseurs, les érythroblastes médullaires, il est aussi produit dans la rate et le foie chez le fœtus .Il est très déformable, cette caractéristique lui permet de passer à travers les minuscules capillaires et de transporter l'oxygène des poumons vers les tissus .Sa durée de vie est de 120 jours (figure1)[1].



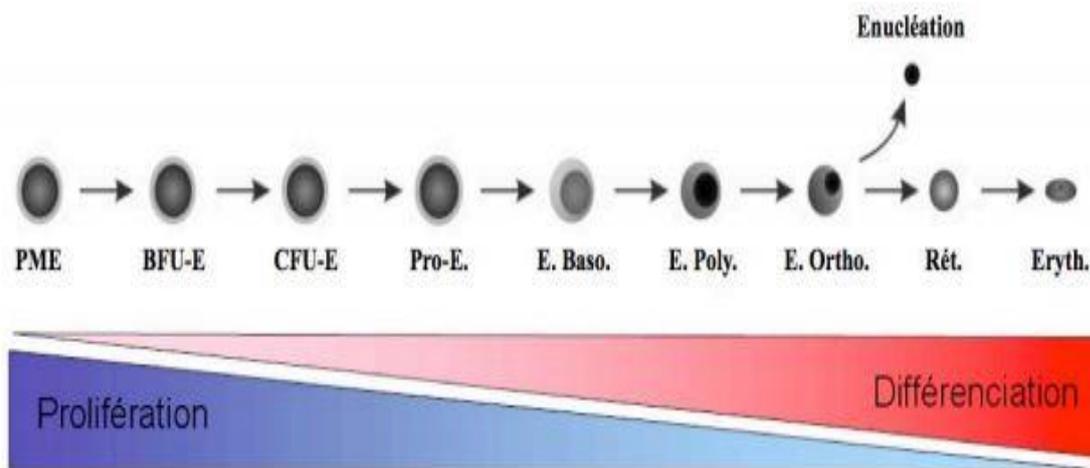
Figure 01 : Image de globules rouges humains [2].

2-La synthèse : Le processus de synthèse des globules rouges appelé érythropoïèse déroule au niveau de la moelle osseuse. Cette synthèse débute par une cellule souche pluripotente qui va subir une maturation au cours de laquelle le volume cellulaire diminue, la chromatine va se condenser et le cytoplasme basophile devient progressivement acidophile indiquant qu'il y a une production d'hémoglobine.

On distingue par ordre de maturité de croissance : Le proérythroblaste, l'érythroblaste basophile, l'érythroblaste polychromatophile, l'érythroblaste acidophile, le réticulocyte et finalement le globule rouge.

Les réticulocytes acquièrent leur maturation finale dans le sang périphérique où elles deviennent des hématies après 24 à 28 heures de leurs passages dans la circulation.

L'érythropoïétine constitue le facteur essentiel qui stimule l'érythropoïèse mais il existe d'autres facteurs : IL1, IL3, le PGDF et des facteurs exogènes qui sont aussi importants parmi eux : Le fer, la vitamine B12 et l'acide folique (figure 2) [3-4].



PME: Progéniteur Mégacaryo-Erythroïde. BFU-E: Burst Forming Units – Erythroïde. CFU-E: Colony forming units-Erythroïde. Pro-E: Proérythroblaste. E. Baso: Erythroblaste basophile. E. Ortho: Erythroblaste orthochromatophile. E. Poly: Erythroblaste polychromatophile. Eryth: Erythrocyte. Rét: Réticulocyt.

Figure 02 : Les étapes de l'érythropoïèse [5].

3-contenu

- **Hémoglobine** : est une protéine qui présente 92 % du point total du globule rouge et qui a pour rôle de transporter l'oxygène des poumons vers les tissus et le CO₂ des tissus vers les poumons. Elle est composée de 4 molécules de globine, chaque globine contient une structure centrale appelée hème.
- **Les enzymes** : le globule rouge possède à sa naissance un stock enzymatique constitué au cours de sa fabrication médullaire. Le rôle des enzymes consiste à une production d'énergie, cette énergie est produite par le catabolisme du glucose, et elle est stockée sous forme d'ATP (adénosine triple phosphate). Elle sert au maintien de l'intégrité de la membrane en préservant un contenu intra-érythrocytaire en eau et en ions différent de celui du plasma.

-Les céphalines : phosphatidyléthanolamines (28%) ;

-Les phosphatidylsérines et les phosphatidylinositols (14%).

- Les sphingolipides : on retrouve principalement la Sphingomyéline (25%)
- Les lysolecithines à 12% : ne contiennent qu'un seul acide gras lié ; leurs accumulations entraînent l'hémolyse.
- L'acide phosphatidique et polyglycérolphosphatide (1 à 2%).

Le Pole hydrophobe des phospholipides, est orienté vers l'intérieur de la membrane. Les groupements polaires hydrophiles sont orientés vers la périphérie.

Cette trame lipidique est responsable de la grande fluidité de la membrane érythrocytaire.

4.1.2. Cholestérol

Il se trouve uniquement sous forme libre non estérifié, inséré de façon régulière entre les molécules de phospholipides. Il est plus abondant dans le feuillet externe.

4.1.3. Acides gras

Les AG libres du plasma s'insèrent aux lysophospholipides en présence d'une acylase et d'ATP. Leur caractère saturé donne la conformation stérique et la perméabilité de la membrane.

3.1.4 Glycolipides

Ce sont des glycosphingolipides. Ils siègent surtout au niveau du feuillet externe de la bicouche et certains sont porteurs d'antigènes de groupes sanguins (ABO...).

4.2. Les protéines membranaires

Les protéines de la membrane érythrocytaire sont classées en deux catégories:

- Les protéines intrinsèques ou transmembranaires incérées dans la bicouche lipidique et pouvant la traverser ;
- Les protéines extrinsèques ou périphériques tapissant la face externe ou interne de la bicouche (figure 4)[6].

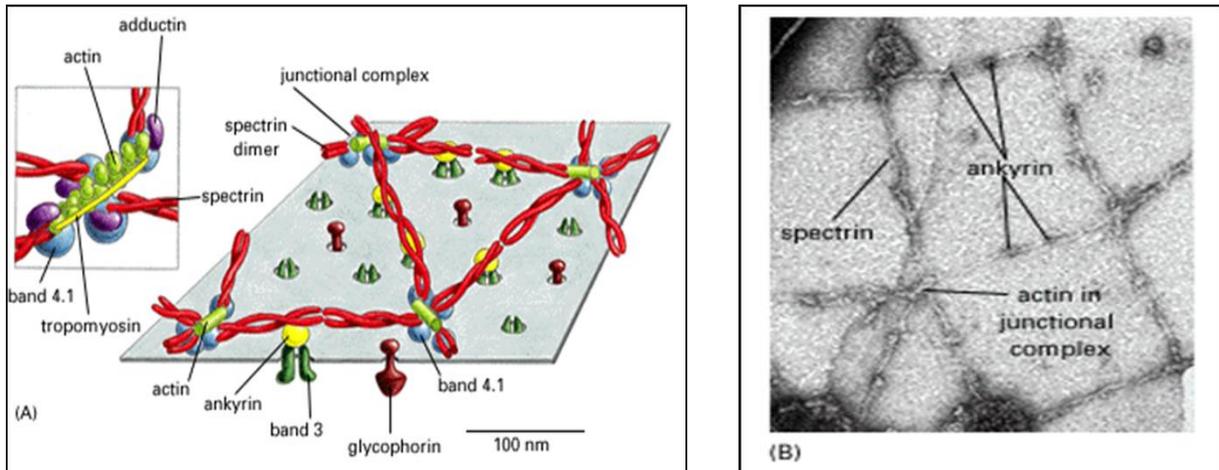


Figure 04: membrane du GR: disposition tridimensionnelle des différentes protéines membranaires (A); vue en microscopie électronique (B)[8].

Certaines de ces protéines, parfaitement isolées, ont reçu une appellation propre mais elles restent essentiellement dénommées en fonction de leur répartition électrophorétique en gel de polyacrylamide SDS selon la nomenclature internationale (figure 5).

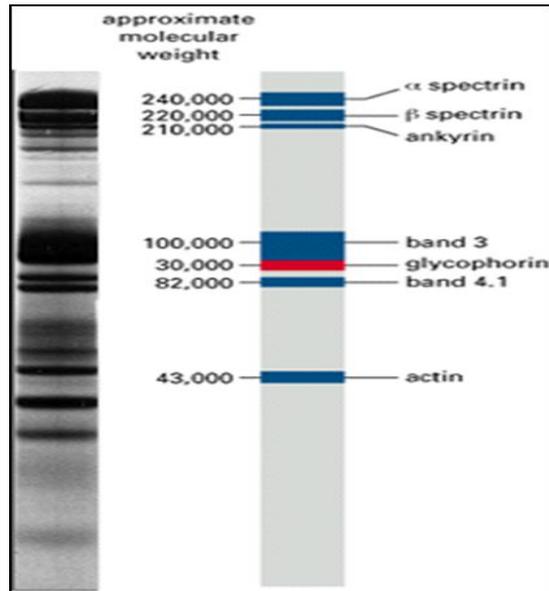


Figure 05 : profil électrophorétique sur gel de polyacrylamide des protéines de la membrane érythrocytaire[8].

4.2.1. Les protéines extrinsèques=squelette membranaire

Les principales protéines extrinsèques constituent le squelette membranaire, grillage situé à la face interne de la bicouche lipidique. Ces mailles de grillage, de forme le plus souvent hexagonale, sont formées par des tétramères de spectrine; des nœuds, appelés complexes de jonction, comprennent l'actine, les protéines 4.1 et 4.9 (dématine), l'adducine, la tropomyosine et de la tropomodulline.

4.2.1.1. Spectrine

C'est un hétérodimère avec deux hétérodimères à deux chaînes α (240 KD) et deux chaînes β (220 KD).

Les chaînes α et β correspondent aux bandes 1 et 2 à l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide SDS.

Les gènes codant pour ces chaînes α et β sont localisés respectivement sur les chromosomes 1 et 14. La spectrine permet le maintien de la forme du globule rouge et de la disposition des différentes protéines membranaires.

4.2.1.2. Le complexe de jonction

Il comporte plusieurs protéines:

a- L'actine

Protéine faisant partie des β actines, correspondant à la bande 5 à l'électrophorèse. Elle assure la constructibilité de la membrane érythrocytaire.

b- La protéine 4-1

Phosphoprotéine se séparant, en gel d'acrylamide, en deux composants 4-1a et 4-1b de structure voisine. Le gène codant pour la protéine 4-1 est situé sur le chromosome 1.

Elle se fixe vers l'extrémité COOH terminale de la chaîne β de la spectrine se qui augmente considérablement l'affinité de cette dernière pour l'actine.

c- La protéine 4-9 ou dématine

Dimère formé de deux polypeptides. Elle est fortement phosphorylable par la protéine kinase AMPc dépendante, la phosphorylation inhibant son action vis-à-vis de l'actine.

d- L'adducine

Protéine fixant la calmoduline, composée de deux sous unités α (103 KD) et β (97 KD). Elle se fixe avec une haute affinité au complexe spectrine-actine. L'adducine diminue l'affinité de la spectrine pour l'actine, action opposée à celle de la protéine 4-1.

e- La tropomyosine

Dimère de 60 KD. Elle inhibe la liaison spectrine-filaments d'actine stabilisant ainsi les filaments d'actine.

f- La tropomoduline

Polypeptide de 43 KD dont les deux molécules se fixent aux molécules de tropomyosine. Elle module l'interaction de la tropomyosine avec la β actine.

g- L'ankyrine

Protéine de 21 KD correspondant à la bande 2-1 à l'électrophorèse.

Elle permet de rattacher le squelette membranaire au reste de la membrane en se liant d'une part à la chaîne β de la spectrine et d'autre part au segment intra cytoplasmique de la protéine 3.

4.2.2. Les protéines intrinsèques: transmembranaires = intégrales

Elles traversent de part en part la double couche lipidique, leur extrémité externe est souvent glycosylée et leur extrémité interne est en contact avec le squelette membranaire.

Ce sont le plus souvent des protéines amphotères avec une partie hydrophobe dans la membrane et des extrémités hydrophiles en dehors. Elles interagissent entre elles et avec les protéines périphériques.

4.2.2.1. La protéine 3

C'est le constituant majeur des protéines membranaires (25%). Elle doit son nom à sa position dans la bande 3 à l'électrophorèse.

Elle est constituée de 3 segments:

- Un segment externe : à la partie COOH terminale, porteur des radicaux glycosidiques et de deux radicaux sulfhydriles qui sont responsables d'interaction avec le milieu extérieur du GR en particulier avec les lectines et les groupes thiols (SH) (propriété utilisée pour sa purification) ;

- Un segment médian: inclus dans la bicouche lipidique, il représente avec le segment externe le support du canal des anions qui assure l'échange chlore-bicarbonates, essentiel au transport du CO₂ ;

- Un segment cytoplasmique : porte l'extrémité NH₂ terminale. Grâce à ce domaine cytoplasmique où existe une forte concentration de résidus négativement chargés, la bande 3

occupe une position clé dans les interactions entre protéines en fixant les protéines membranaires 4-1, 4-2 et l'Ankyrine. Il possède également des sites à forte affinité pour certaines protéines cytoplasmiques telles que l'hémoglobine, l'aldolase, la glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (G3PDH) et la phosphofructokinase (PFK).

4.2.2.2. Les Glycophorines

Ce sont des sialo-glycoprotéines transmembranaires révélées sur les gels par des colorations spécifiques, principalement le PAS (acide périodique schiff). Par ordre de mobilité électrophorétique croissante, on note au voisinage immédiat de la zone 3 la bande PAS1 correspondant à la glycophorine A qui est un dimère de chaîne α (α_2). Dans la zone entre protéine 4 et 5 sont retrouvées la glycophorine B (dimère δ_2) et la glycophorine C qui est un monomère de chaîne β .

a- Glycophorine A

Principale glycophorine membranaire. C'est une protéine transmembranaire comportant 3 parties: un segment externe portant des motifs oligosaccharidiques, un segment lipophile inclus dans la bicouche lipidique et un segment cytosolique.

A l'inverse de la protéine 3, le segment externe porte l'extrémité NH₂ terminale et le segment interne l'extrémité COOH terminale. Le segment externe porte les Ag du groupe sanguin MN, les récepteurs pour les léctines et le virus de l'influenza ainsi que pour certains parasites tels que le plasmodium.

b-GlycophorineB

Elle porte les Ag du groupe sanguin Ss et N. Elle a une antigenicité commune avec la glycophorine A.

c- Glycophorine C

Elle lie la protéine 4.1, d'où l'appellation de glyconnectine. Elle renforce ainsi l'ancrage du cytosquelette au reste de la membrane. Porte l'Ag Gerbich.

5. Propriétés et rôle de la membrane**5.1. Déformabilité**

Déformabilité lors du passage des GR à travers les capillaires pour transporter l'oxygène, elle dépend des forces extérieures ainsi que des propriétés rhéologiques intrinsèques (la viscosité interne, le rapport surface /volume et les propriétés visco élastiques et moléculaires de la membrane).

5.2. Rétention des molécules de l'hémoglobine

La membrane érythrocytaire a un rôle vis-à-vis de l'hémoglobine.

5.3. Les échanges transmembranaires

-L'eau : traverse rapidement et passivement la membrane à travers les pores.

-Les anions : les chlorures et bicarbonates traversent passivement la membrane érythrocytaire mais moins vite que l'eau.

-Les cations : la pénétration nécessite un mécanisme actif, l'énergie étant fournie par l'ATP.

Les concentrations de K^+ et Na^+ intracellulaires sont maintenues grâce aux pompes Na^+/K^+ rejetant le Na^+ ayant pénétré dans le globule rouge et maintenant le K^+ à l'intérieur du GR.

-Le glucose : la pénétration du glucose est facilitée par un transporteur qui est la perméase.

-Les acides aminés : la pénétration des acides aminés est variable d'un acide aminé à un autre[6].

5-4-La fonction support : Les antigènes membranaires

Les globules rouges portent au niveau de leurs membranes les antigènes responsables de groupes sanguins érythrocytaires. Les études qui sont faites par microscopie de fluorescence, par autoradiographie ont montré la présence de nombreux déterminants antigéniques ordonnancés en mosaïque de manière régulière. Ce sont les glycoprotéines de la membrane érythrocytaire dont les composants glucidiques étant tournés vers l'extérieur de cette

membrane qui portent ces déterminants. La membrane est aussi le siège de réactions enzymatiques [9].

6-Les fonctions de l'hémoglobine

6.1. Le transport de l'oxygène

Le globule rouge assure le transport de l'oxygène des poumons vers les tissus périphériques grâce à sa contenance en hémoglobine.

Il existe plusieurs facteurs qui influencent l'affinité de l'Hb pour l'O₂ : La pression atmosphérique, la présence d'un effecteur allostérique, le 2,3 DPG, le Ph, la température et le type d'Hb (fœtale...).

6.2. Transport du CO₂

Le globule rouge assure aussi grâce à sa contenance en Hb le transport du CO₂ produit par le métabolisme cellulaire des tissus vers les poumons .La fixation du CO₂ est dépendante de la PCO₂ sanguine. .

6.3Transport d'autres gaz

L'Hb permet le transport du monoxyde d'azote (NO) et du monoxyde de carbone(CO) [10].

7-Hémolyse physiologique

7-1-Définition

L'hémolyse physiologique est le phénomène irréversible par lequel les GR sont détruits. Le GR normal vit en L'hémolyse moyenne 120 jours et meurt par vieillissement.

Le vieillissement des GR résulte de l'épuisement progressif du stock d'enzymes de la glycolyse, avec pour conséquence une hyperhydratation avec perte de leur forme biconcave et altération de la membrane.

Les hématies devenues sphériques sont piégées dans les capillaires de la moelle osseuse et du foie où les macrophages les phagocytent. La rate n'est pas un organe prépondérant de l'hémolyse physiologique.

La perte physiologique journalière est estimée entre 1 et 2 % de la masse globulaire totale. L'hémolyse physiologique est un phénomène essentiellement intratissulaire ; une faible partie est intravasculaire.

À l'état normal, la production des GR est équivalente à la quantité détruite chaque jour.

7-2-Hémolyse intratissulaire (extravasculaire)

L'hémolyse s'effectue dans 80 à 90% des cas en dehors des vaisseaux. Cette destruction des GR a lieu principalement dans la moelle osseuse et le foie où les macrophages les phagocytent.

Cette phagocytose porte sur des GR dont le vieillissement s'est traduit par :

- **Des modifications biochimiques** : diminution du contenu enzymatique, ralentissement métabolique, perte des lipides membranaires, phénomènes oxydatifs (diminution du taux d'ATP, de 2,3DPG qui diminue l'affinité de l'Hb pour l'O₂) ;
- **Des modifications morphologiques** : tendance à la sphéricité par réduction de la surface membranaire, une hyperhydratation par trouble des échanges ioniques résultant de disfonctionnement de la pompe Na⁺ /K⁺ par diminution d'ATP.
- **Des modifications de la plasticité** : diminution de la déformabilité des GR entraînant une stagnation dans les capillaires.

Lorsque les macrophages phagocytent les GR, l'hémoglobine est libérée directement dans les macrophages :

- La partie globinique de l'Hb (globine): est dégradée en acides aminés qui vont rejoindre le pool métabolique général.
- La partie héminique de l'Hb (hème) : est transformée en bilirubine qui sera libérée dans le plasma sous forme de bilirubine libre (bilirubine non conjuguée). Cette dernière sera fixée sur l'albumine et transportée vers les cellules hépatiques où elle sera conjuguée.

La bilirubine conjuguée passera dans la bile et sera ensuite éliminée majoritairement par les selles sous forme de stercobiline et de stercobilinogène, et très partiellement par les urines sous forme d'urobiline et d'urobilinogène.

Concernant le fer issu de la dégradation des GR: le $\frac{1}{3}$ sera stocké dans les macrophages sous forme de ferritine et d'hémosidérine ; tandis que les $\frac{2}{3}$ seront libérés par les macrophages dans la circulation où le fer va se lier à la transferrine pour être réutilisé dans l'érythropoïèse (figure 6) [11,3].

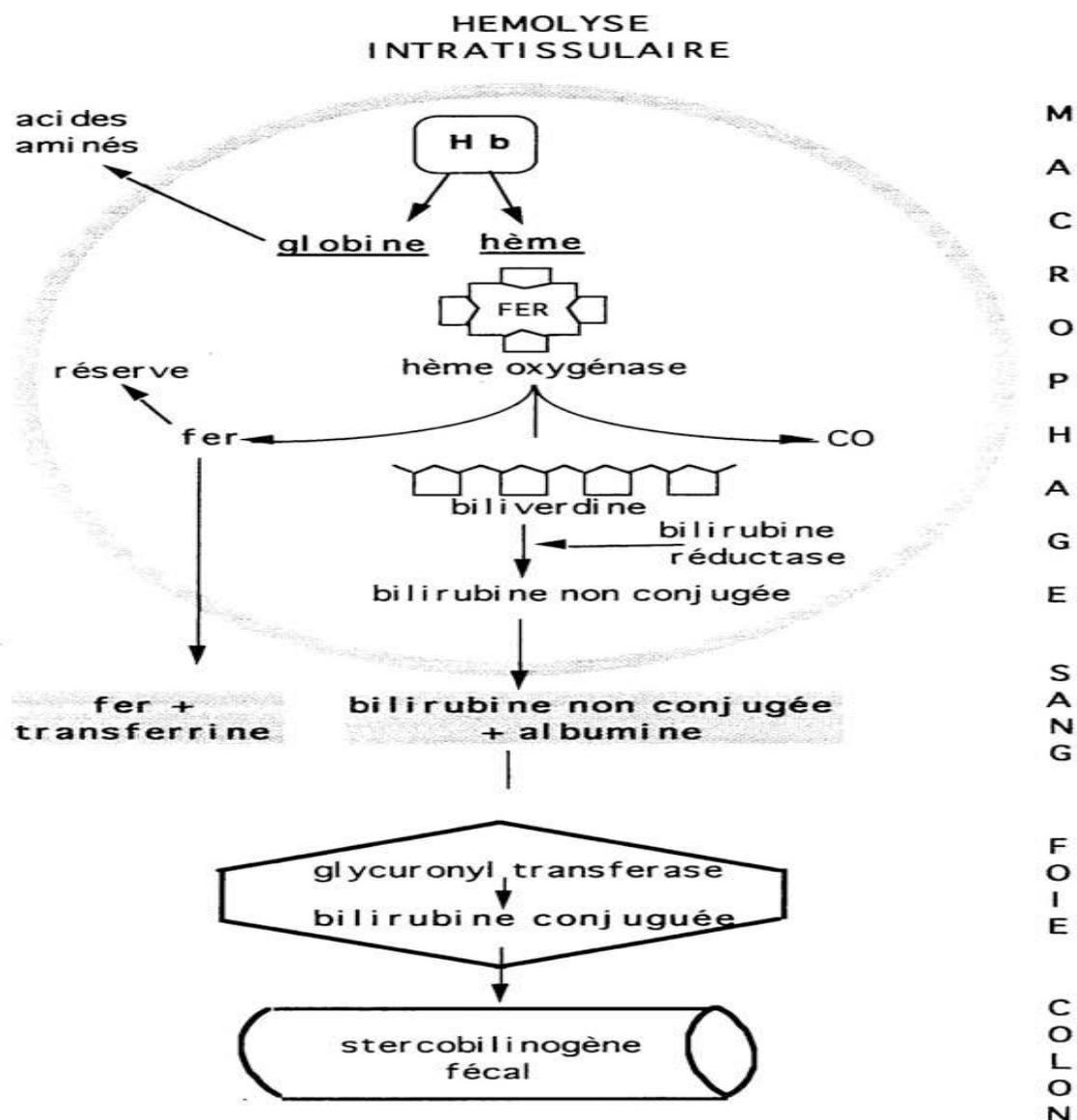


Figure 6: schéma d'hémolyse intra tissulaire.

7-3-Hémolyse intravasculaire

Au sein de la circulation sanguine, l'hémolyse se déroule dans 10 à 20% des cas. L'hémoglobine est libérée dans le plasma où elle sera captée par l'haptoglobine synthétisée par le foie. Ce complexe hémoglobine-haptoglobine sera récupéré par les hépatocytes au niveau desquels l'hémoglobine sera dégradée. La taille du complexe haptoglobine-Hb ne lui permet pas de traverser le glomérule rénal.

Si la capacité de fixation de l'haptoglobine est débordée, L'Hb en excès reste libre et traverse le filtre glomérulaire après dissociation de la molécule d'Hb en deux dimères. Elle est réabsorbée par les cellules du tubule rénal qui la catabolisent et se chargent de dépôts de fer.

Une hémossidérinurie apparaît quelques jours plus tard lorsque les cellules desquamées dans les urines.

L'Hb libérée dans la circulation peut être éliminée par une troisième voie.

Après auto-oxydation en méthémoglobine et dissociation en globine et hémine, celle-ci peut être fixée à :

- L'hémopexine, formant un complexe hémine-hémopexine éliminé par le foie mais plus lentement que complexe hémoglobine-haptoglobine.
- L'albumine, dont l'affinité pour l'hème est très inférieure à celle de l'hémopexine.

Même en cas d'hémolyse intra-vasculaire, la dégradation de l'Hb est finalement toujours intracellulaire. Ce sont les cellules épithéliales du foie et du rein qui interviennent à la place des macrophages.

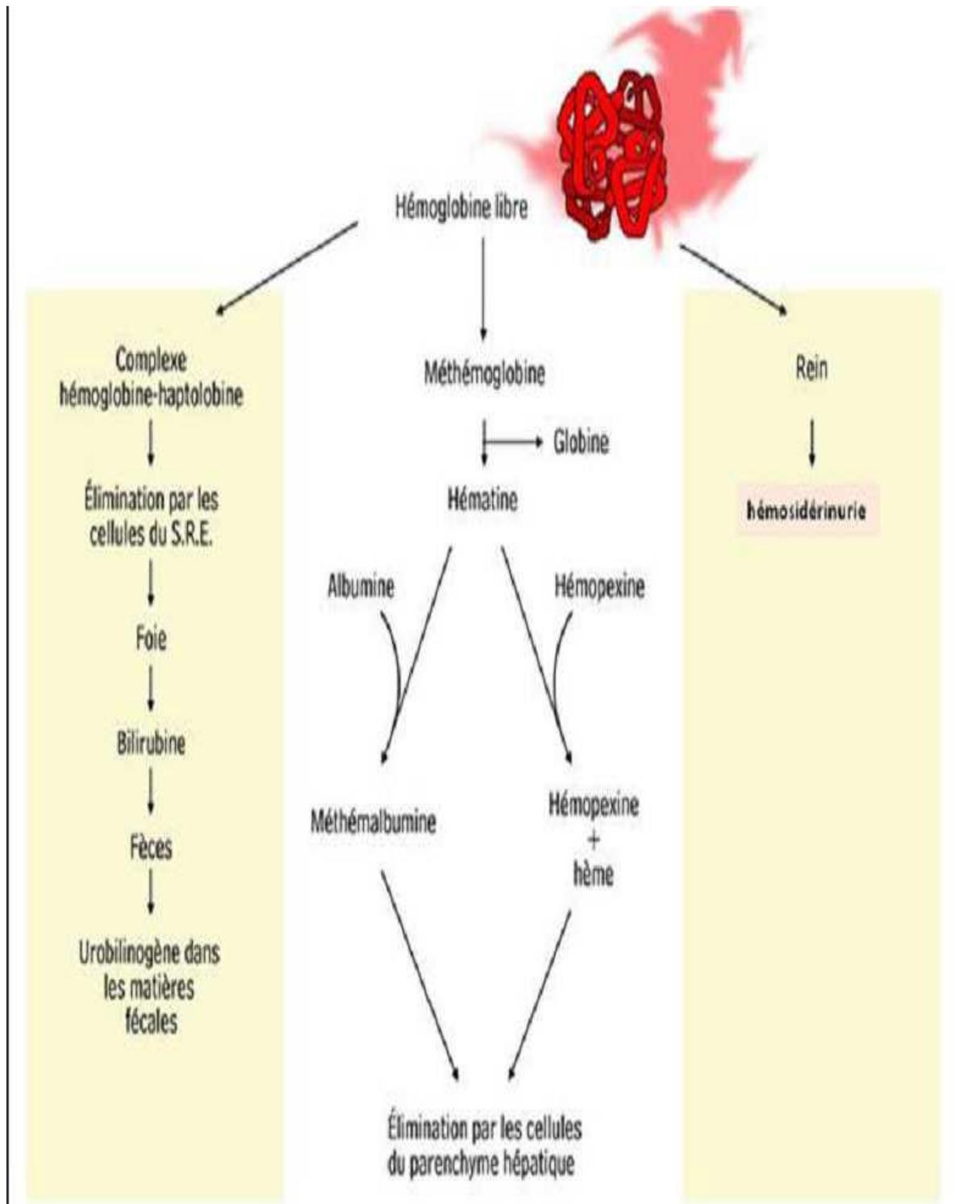


Figure 7 : Schéma d'hémolyse intra vasculaire.

8-L'hémolyse pathologique ou hyper-hémolyse**8-1-Définition**

C'est la destruction précoce et exagérée des GR circulants sous l'effet d'un processus hémolytique qui peut être intrinsèque (hémolyse d'origine corpusculaire) ou extrinsèque (hémolyse d'origine extra-corpusculaire), Elle sera responsable d'une anémie hémolytique.

L'hémolyse peut être d'origine congénitale ou acquise, elle touche toujours un des constituants vitaux du GR: membrane, enzyme, Hb.

Toute modification ou atteinte de l'un ou l'autre de ces constituants est susceptible de rendre la cellule prématurément incapable de franchir les interstices du filtre splénique, responsable de sa séquestration et sa destruction précoce.

L'hémolyse pathologique peut se produire à l'extérieur ou à l'intérieur même de l'espace vasculaire. Ceci dépend du mécanisme causal et de la brutalité avec laquelle la membrane érythrocytaire est attaquée.

8-2-L'hémolyse d'origine corpusculaire (L'hémolyse extravasculaire):Cette hémolyse peut être due au :

- a. Malformation globulaire :
 - Drépanocytose(en faucille) ;
 - Thalassémie (microcytose) : α ou β thalassémie.
- b. Anomalie de membrane :
 - Micro-sphérocytose ;
 - Elliptocytose héréditaire ;
 - Stomatocytose ;
 - Ancanthocytose.
- c. Erythro-enzymopathies congénitales :
 - Déficit en G6PD ;
 - Déficit en pyruvate kinase.
- d. Maladie de Marchiafava Micheli.

Elle se produit au sein du système des phagocytes mononuclés et constitue une exagération du mécanisme normal de retrait des GR de la circulation. Le site préférentiel est la rate, elle est capable de reconnaître l'existence d'altérations minimales de la membrane et de la flexibilité érythrocytaires.

Le foie, à cause de ses nombreuses sinusoides bordées de macrophages (cellules de Kupffer), peut lui aussi être le site d'une hémolyse anormale dans les cas où la membrane des GR est altérée de façon plus importante ou en l'absence de rate. Dans un cas comme dans l'autre, la phagocytose des hématies altérées est au premier plan, de sorte qu'il n'y a pas de libération significative d'Hb libre directement dans la circulation.

8-3-L'hémolyse extra-corporelle (L'hémolyse intra-vasculaire)

a. Causes immunologiques

- **Hémolyse iso-immune:** après transfusion récente ou au cours de la maladie hémolytique périnatale ;
- **Hémolyse auto-immune ;**
- **Hémolyse immuno-allergique.**

b. Causes toxiques: Plomb, venins des serpents.

c. Causes infectieuses

- Bactérienne: septicémie à clostridium perfringens ou à staphylocoque ;
- Parasitaire: plasmodium ;
- Virale : hépatites virales.

d. Causes mécaniques: micro-angiopathies, les valves intracardiaques.

Elle se produit directement dans la circulation et s'accompagne généralement d'une libération plus ou moins brutale d'Hb libre qui doit être alors débarrassée par liaison spécifique avec l'haptoglobine du plasma, ou non spécifique avec l'albumine. Une fois les capacités de liaison dépassées, la bilirubine libre qui s'accumule dans le plasma est toxique. La bilirubine libre, non liée, peut traverser la barrière hémoméningée et léser gravement les noyaux gris centraux.

Lorsque la quantité d'Hb libérée dépasse la capacité de liaison à l'haptoglobine, cette forme d'hémolyse peut s'accompagner d'hémoglobinémie, d'hémoglobinurie ou d'hémosidérinurie[11].

Chapitre II :
Les groupes sanguins
érythrocytaires

1-Rappels immunologiques

1-1 Antigène :D'une façon générale, en immunologie, un antigène désigne une substance capable de déclencher une réponse immunitaire et, donc, toute molécule capable d'être reconnue de façon spécifique par les cellules du système immunitaire, schématiquement les lymphocytes, qu'ils soient de type B ou T.

En immunohématologie, un antigène de groupe sanguin érythrocytaire est un antigène exprimé à la membrane du GR, qu'il soit produit par l'érythrocyte lui-même ou qu'il soit seulement adsorbé sur la membrane. Actuellement, plus de 200 antigènes de groupes sanguins sont identifiés.

1-2-Les anticorps

1-2-1 Définition

Les anticorps ou immunoglobulines sont des glycoprotéines présentes dans les liquides biologiques et donc dans le plasma ou le sérum de tous les individus chez l'homme, il existe cinq classes d'anticorps physiquement et chimiquement distinctes (IgG, IgA, IgM, IgD et IgE) [12].

1-2-2 Structure

Tous les Ac possèdent la même unité de base composé de :

- ✓ Quatre chaînes polypeptidiques identiques deux à deux reliées par des ponts disulfures :
 - * Deux chaînes lourdes dont la nature définit les cinq classes : gamma(γ) pour les IgG ; alpha(α) pour les IgA ; mu(μ) pour les IgM ; delta (δ) pour les IgD ; epsilon (ϵ) pour les IgE.
 - * Deux chaînes légères identiques : kappa (κ) ou lambda(λ).
- ✓ Un groupement glucidique : oligosaccharide associé à la région constante des chaînes lourdes et variable selon les classes (figure 8) [13].

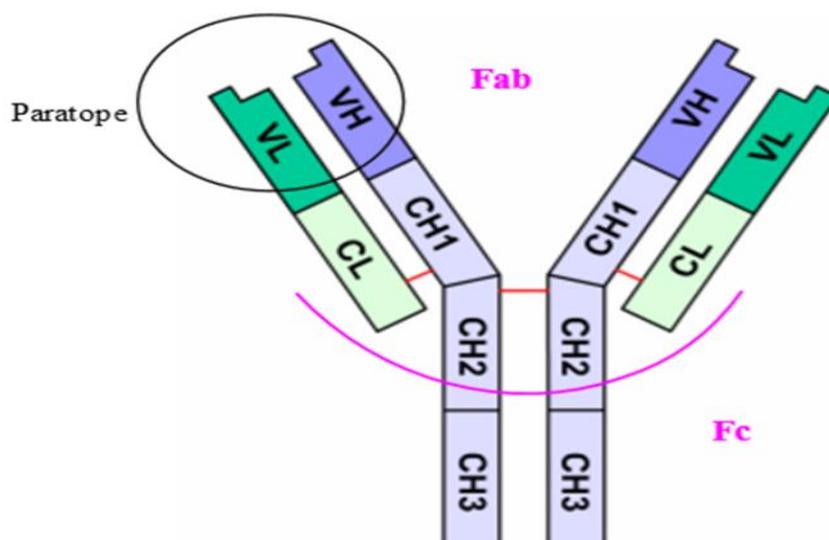


Figure 8 : Structure d'une immunoglobuline [14].

Les immunoglobulines sont constituées par deux chaînes lourdes (H), en violet sur la figure et deux chaînes légères (L), en vert sur le dessin. Les chaînes légères sont constituées d'une partie constante (CL) et d'une partie variable (VL). Les chaînes lourdes sont constituées d'une partie variable (VH) et de plusieurs parties constantes (CH1, CH2, CH3).

1-2-3- Les classes des anticorps

Classe	Chaîne lourde	Structure générale	Localisation	Fonctions
IgG(IgG1, IgG2, IgG3, IgG4)	- γ -3 domaines constants	Monomère	Ig majoritaire dans le sérum	-Principal -Acides réactions -Primaires et secondaires -produit une immunité passive chez le fœtus - Fixe le complément
IgM	- μ	Monomère	- Monomère	-Récepteur

	-4 domaines constants	ou pentamère	attaché aux LB - pentamère libre dans le sérum	antigénique des LB -Première classe d'Ig libérée lors d'une réponse primaire -Fixe le complément
IgA (IgA1, IgA2)	- α - 3domaines constants	Monomère ou dimère	-monomère dans le plasma - dimère dans les sécrétions, salive, larmes, suc intestinal, lait.	-Protège les surfaces des muqueuses
IgE	- ϵ - 4domaines constants	Monomère	-peau, muqueuse, voies gastro- intestinale et respiratoires, amygdales. -trace dans le sérum	-Participe à la réaction d'inflammation et aux allergies - Intervient dans la lutte contre les parasites. -cytophile.
IgD	- δ - 3domaines constants	Monomère	Surface des LB	-récepteur du LB -Intervient dans l'activation des LB.

Tableau 1 : Les classes des immunoglobulines[15].

1-2-4-Fonctions des Immunoglobulines**1-2-4-1- Fonctions de reconnaissance**

Les anticorps reconnaissent des antigènes solubles ou particulaires. La liaison de l'antigène à l'anticorps est une association bi-moléculaire réversible spécifique, avec une forte complémentarité de forme entre paratope et épitope [16].

1-2-4-2-Fonctions effectrices**➤ Activation du complément****a-Définition**

Le complément est un ensemble de protéines à synthèse hépatique sous forme circulante dans le plasma et sous forme de récepteurs membranaires présents à la surface de nombreux types cellulaires. Ce système fait partie de l'immunité innée impliquant une activation, sans reconnaissance spécifique d'une cible, qui repose sur des liaisons physico-chimiques [17].

b- Les voies d'activation

Il existe trois voies d'activation du complément, distinctes au niveau de leur initiation, mais convergeant vers un point commun : le clivage du C3. Il s'agit des voies classique, alterne et des lectines. Les 03 voies aboutissent à la voie commune pour la formation du complexe d'attaque membranaire.

b-1 La voie classique

L'activation par la voie classique est initiée par la fixation de la première protéine du Complément, C1q, à un de ses ligands. Parmi ceux-ci, les plus importants sont les domaines CH2 du fragment Fc des immunoglobulines IgG1, IgG2, et IgG3 et le domaine CH4 des IgM.

Cette activation fait intervenir un complexe macromoléculaire composé de trois protéines : la protéine de reconnaissance, C1q, qui est associée à deux serines estérases C1r et C1s. Cette fixation entraîne l'auto-activation de C1r, qui clive et active ainsi C1s. Le composant C1s activé clive alors le composant C4 présent dans le plasma en un petit fragment C4a, libéré en phase fluide, et un fragment majeur C4b, qui se fixe alors de façon covalente à la surface-cible de l'activation.

Le composant C2, circulant dans le plasma, peut alors s'associer au C4b et être clivé à son tour par C1s en un fragment C2a, qui reste associé à C4b, et un fragment C2b libéré en phase fluide.

Ainsi se trouve formé sur la surface activatrice le complexe C4b2a, appelé C3 convertase classique car il a la capacité de cliver C3. L'activité enzymatique est portée par la sous-unité C2a.

b-2- La voie des lectines

La voie des lectines est activée par les structures carbohydrates des micro-organismes. Il existe une similitude avec la voie classique. La protéine de reconnaissance est ici la protéine MBL (Mannan Binding Lectin) et est associée à des sérines estérases appelées MASP 1, 2 et 3 (Mannan-Associated Serine Protease) qui présentent une forte homologie avec C1s et C1r.

Une fois activées, les MASP acquièrent la capacité de cliver les protéines C4 et C2 et participent à la formation d'une C3 convertase, C4b2a, identique à celle formée à l'issue d'une activation par la voie classique.

b-3- La voie alterne

La voie alterne est activée par des substances d'origine bactérienne telles que le lipopolysaccharide (LPS) des bactéries Gram négatives, par des bactéries Gram positives, des virus ou des cellules infectées ou transformées.

Les interactions des protéines de la voie alterne aboutissent à la formation de la C3 convertase alterne. L'assemblage de la C3 convertase alterne commence avec l'association d'une molécule de C3b avec le Facteur B. Cette association permet au facteur B d'être clivé par une sérine protéase circulant sous forme active dans le plasma, le Facteur D, produisant les fragments Ba et Bb.

Le fragment Ba s'exclut du complexe tandis que le fragment Bb reste associé à C3b et acquiert une activité enzymatique. Le complexe C3bBb est la C3 convertase de la voie alterne capable de catalyser le clivage de C3 en C3b de façon absolument identique au clivage réalisé par le complexe C4b2a. La C3 convertase alterne est un complexe enzymatique très labile qui peut être stabilisé en s'associant avec la Properdine.

Le premier dépôt covalent de C3b se fait de façon aléatoire mais cette voie d'activation est capable d'une auto-amplification qui est très importante pour la reconnaissance et l'élimination des pathogènes en l'absence d'anticorps spécifiques (Figure 9) [18].

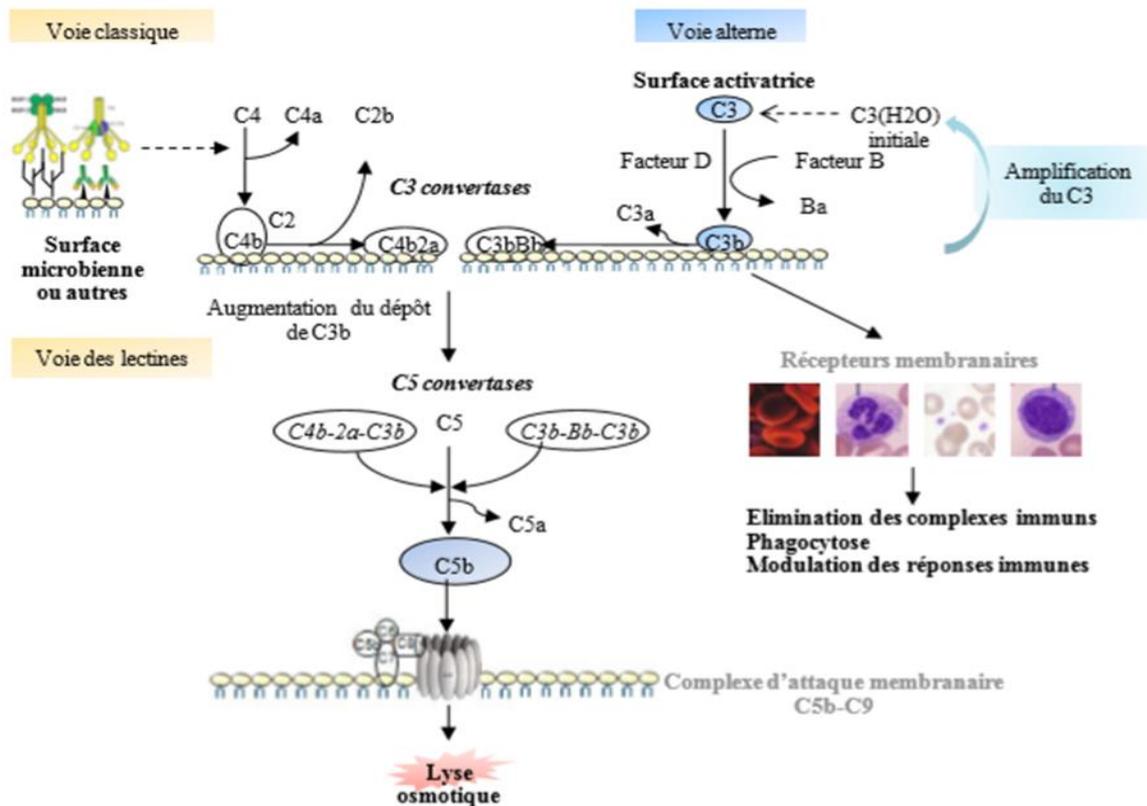


Figure 9 : Les voies d'activation du complément [19].

B-4-La voie effectrice terminale commune

Le C3 est le point de convergence des trois voies d'activation du complément et le clivage se fait de façon identique par les C3 convertases alternes (C3Bb) ou classiquement (C4b2a). La fixation des molécules de C3b supplémentaires aux convertases classiques (C4b2a(C3b))_n ou alternes (C3bBb(C3b))_n leur confère une activité C5 convertase.

En effet, la protéine C5 peut alors se lier aux complexes (C4b2a) C3b ou (C3Bb) C3B et être soumise à leur activité enzymatique. La protéolyse de C5 (par les sous-unités C2a ou Bb des complexes) coupe la chaîne α du C5 dans sa partie N terminale pour libérer en phase fluide un petit peptide, le C5a, qui a une activité anaphylatoxique, et produit la molécule C5b.

C5b peut s'associer aux protéines de la voie finale commune présentes dans le plasma ; les composants C6, C7. Ce complexe fixera C8 qui commencera un ancrage dans la membrane plasmique. Le complexe C5b8 s'associe alors à 6 à 12 molécules de C9 qui en s polymérisant vont créer un véritable pore transmembranaire.

Ainsi le complexe d'attaque membranaire appelé (C5b9) permet une lyse osmotique d la cible (microorganisme, cellule transformée) [18].

c- Le rôle du complément

- lyse des agents pathogènes ;
- Réaction inflammatoire ;
- phagocytose des microorganismes ;
- Neutralisation des virus ;
- Elimination des complexes Ag-Ac [20].

➤ **Fixation sur les récepteurs cellulaires**

Cette fixation permet en particulier le passage transplacentaire des IgG lors des derniers mois de la grossesse. Ce transfert placentaire est dû à un phénomène actif, il est lié à la présence de récepteurs pour le Fc des IgG. Les autres classes d'Ig ne traversent pas le placenta.

Les récepteurs des polynucléaires et des macrophages pour le Fc des IgG sont impliqués dans les phénomènes de cytotoxicité liés aux anticorps. D'autres cellules comme les monocytes et les basophiles ont des récepteurs pour le Fc des IgE.

Un allergène est capable de se fixer sur le site anticorps des IgE. Cette fixation déclenche un signal qui aboutit à la libération de substances contenues dans les granules intra cytoplasmiques de ces cellules. Ces phénomènes constituent la base physiopathologique de l'hypersensibilité immédiate [21].

1-3-La réaction Ag-Ac

1-3-1- Définition

Les réactions Ag-Ac sont des réactions très spécifiques. Un anticorps ne peut reconnaître qu'un antigène particulier ou un déterminant de celui-ci. Toutefois, lorsqu'un déterminant est commun à plusieurs antigènes, un anticorps aura la capacité de reconnaître ce déterminant sur les différents antigènes. On parle alors de réaction croisée.

Dans l'immuno-hématologie mettent en jeu les globules rouges, la fixation de l'antigène à l'anticorps conduit à une hypersensibilité de type II. Les réactions antigène-anticorps dans ce cas, activent le complément ou les cellules effectrices.

1-3-2- Caractéristiques générales de la réaction Ac-ag

a- Complémentarité entre l'épitope et le paratope

C'est une réaction spécifique, exothermique et réversible nécessitant une bonne complémentarité stérique entre les 2 sites réactifs (Figure 14).

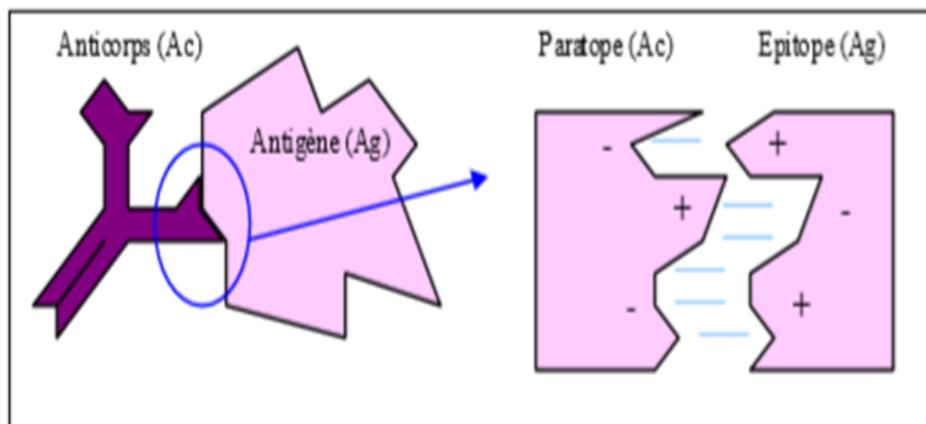


Figure10 : complémentarité stérique [14].

b- Les forces impliquées

Le site antigénique et le site anticorps doivent posséder des groupements atomiques appropriés et la forme du site anticorps doit être adaptée à l'antigène afin de permettre l'établissement des liaisons non covalentes suffisantes. Ces liaisons non covalentes sont de plusieurs types :

-**Forces électrostatiques** : qui s'établissent entre groupements chimiques ionisés de charges opposées.

-**Force issues des liaisons hydrogènes** : qui correspondent à des ponts hydrogène entre des atomes H^+ , N^+ , O^-

-**Force issues des interactions hydrophobes** : sont créées par l'association de groupements apolaires hydrophobes.

-**Force de Van Der Waals** : créées par les interactions des nuages électroniques des atomes [22].

1-3-3- Classification

Dans le cadre de l'immunohématologie, l'interaction entre un antigène érythrocytaire et son anticorps complémentaire se manifeste par l'observation d'une agglutination et / ou d'une précipitation.

Dans d'autres cas, la réaction n'est pas visible in vitro et il faut alors avoir recours à des artifices expérimentaux pour la mettre en évidence. Dans ces cas, les méthodes les plus courantes utilisent le marquage d'un des éléments de la réaction par un fluorochrome, par un isotope radioactif ou par un enzyme

➤ Agglutination

a- Principe

L'agglutination se déroule en deux étapes : la sensibilisation, correspondant à la phase de liaison entre un anticorps et un antigène érythrocytaire, et l'agglutination correspondant à la formation de ponts entre les cellules sensibilisées. Un certain nombre de conditions doit être réuni pour que ces deux étapes se déroulent correctement.

b- Les types d'agglutination

- **Agglutination active** : agglutination résultant d'une union spécifique entre un anticorps et un antigène particulaire appartenant naturellement à la particule.

- **Agglutination passive** : agglutination réalisée entre un anticorps et un antigène normalement soluble, mais rendu particulaire par fixation sur un support.
- **Agglutination indirecte ou artificielle** : agglutination réalisée entre un anticorps non agglutinant et un antigène avec utilisation d'un artifice.

c- Les facteurs influençant l'agglutination

- Nature de l'antigène : valence, Ag particulaires (agglutination active), Ag soluble fixé à des particules (agglutination passive).
- Nature de l'anticorps : Ac agglutinants (agglutination spontanée), Ac non agglutinants + artifices de laboratoire (agglutination artificielle).
- Le Potentiel ζ : représente la différence de potentiel entre la surface du globule rouge et le milieu neutre (figure 11).

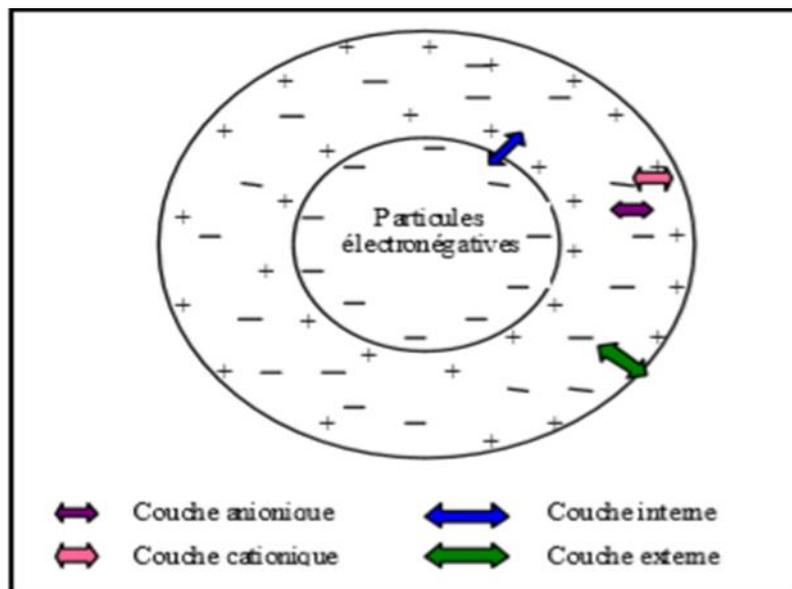


Figure 11: Potentiel ζ [14].

- Les conditions du milieu réactionnel : PH, température et la force ionique [23].

2- Les groupes sanguins érythrocytaires

2-1-Définition

Le groupe sanguin peut être défini comme un ensemble de variations allo typiques, génétiquement transmis et détectés par des anticorps à la surface de la membrane des globules rouges. Les groupes érythrocytaires sont des systèmes antigéniques situés à la surface des globules rouges et contrôlés génétiquement. Les plus importants en pratique sont les systèmes ABO et rhésus(Rh) ensuite viennent le système Kell, le système Duffy et le système Kidd [24].

2-2- Le système ABO

2-2-1 Les antigènes du système ABO

Il existe deux antigènes globulaires dans le système ABO :

L'antigène A et l'antigène B qui peuvent soit :

- Existent séparément (ce qui définit le groupe A ou le groupe B)
- Associés (ce qui définit le groupe AB)
- Absents (ce qui définit le groupe O)

Ils sont caractérisés par deux sucres possibles à la surface de l'érythrocyte, soit un galactose (antigène B) soit une N-acétyle-galactosamine (antigène A). Ces sucres sont fixés sur une substance de base appelée substance H, elle-même osidique. Le groupe O ne possède que la substance H.

Les antigènes A, B, H ne se limitant pas aux hématies, peuvent être présents dans les liquides biologiques particulièrement dans la salive. Cette présence dans la salive est sous la dépendance d'un gène sécréteur, le gène Se. Tous les individus exceptés les rares individus « Bombay » possèdent la substance H.

Les très rares sujets qui ne possèdent pas le gène H. (génotypiquement hh) ne peuvent exprimer ni l'antigenicité A, ni l'antigenicité B, même s'ils possèdent un gène A ou un gène

B ou les deux, ils sont dits de phénotype « Bombay ». Ils n'ont ni antigène A, ni antigène B, ni antigène H, mais sont capables de transmettre l'antigenicité A ou B.

L'antigène A est exprimé différemment selon les individus. Il existe en effet des multiples expressions de l'antigène A dont les plus connus sont : A1 et A2. Cette distinction est importante en transfusion du fait de la présence d'une agglutination naturelle irrégulière anti-A1 dans le sérum de 1 à 2 pour cent des sujets A2 et de 25 pour cent des sujets A2B.

Il existe également des expressions affaiblies d'A (A3, Ax, A m ...) et de B (B3, Bx, Bm ...), mais leur intérêt est moindre[24].

2-2-2- Les anticorps du système ABO

Les anticorps du système ABO sont de trois types : Les hétéroanticorps (ou anticorps naturels), les alloanticorps (ou anticorps immuns) et les autoanticorps.

2-2-2-1- Les anticorps naturels

Les immunologistes ont très rapidement mis en évidence l'existence d'Ac contre les Ag de groupes sanguins érythrocytaires en absence de toute stimulation antigénique préalable apparente. Ils ont alors parlé à tort « d'anticorps naturels », ce qui, doit en fait être traduit par « des anticorps apparus en absence de transfusion ou de grossesse incompatible antérieures ».

Ils peuvent être de deux types :

➤ Les anticorps réguliers

Ce sont des Ac retrouvés dans le sérum des sujets dont les hématies sont dépourvues des Ag correspondants (anti-A et anti-B des sujets A et B) d'apparition spontanée. Ce sont des Ig de classe IgM.

➤ Les anticorps irréguliers

Présents de façon inconstante. Ces Ac apparaissent sans pré-immunisation apparente chez des sujets de phénotypes particuliers, c'est à dire ne possédant pas l'Ag correspondant. Il s'agit le plus souvent d'IgM. Ces anticorps dits « froids », ont un optimum thermique situé à basse

température. Cependant même à 37°C leur dangerosité est grande, ils se fixent sur l'hématie possédant l'Ag spécifique, activent le complément, puis peuvent s'éluer de l'hématie et revenir dans le plasma. L'activation du complément est en général totale, jusqu'à la fraction C9 perforant la cellule, ce qui entraîne une hémolyse intravasculaire avec libération d'hémoglobine libre dans le plasma.

2-2-2-2- Les anticorps immuns

Ils se développent suite à une exposition à des antigènes portés par les hématies lors de grossesses et /ou de transfusion ou suite à une hétéroimmunisation (vaccins). Ce sont des IgM lors de la réponse immune primaire, puis des IgG lors de la réponse immune secondaire. Contrairement aux Ac anti-A et anti-B naturels, les anticorps immuns sont fortement hémolysants car ils sont capables de déclencher la cascade complète du complément. On parle ainsi d'hémolysines. Ces dernières sont caractérisées par un maximum d'activité à 37°C et sont surtout de nature IgG. Elles sont difficilement absorbables par les antigènes A et B solubles et peuvent donc entraîner des hémolyses chez les receveurs de sang. Le cas le plus éloquent étant le donneur universel dangereux (sujet O avec hémolysines anti-A et/ou anti-B). Les hémolysines peuvent, enfin, traverser la barrière foetoplacentaire et être responsable de la maladie hémolytique du N-né.

2-2-2-3- Auto- anticorps

Très rares, mais peuvent être responsables d'anémies hémolytique sévère [25].

2-3- Le système rhésus**2-3-1 Les antigènes du système rhésus**

Le système rhésus(Rh) est le système le plus immunogène et le plus polymorphe de tous les systèmes de groupes sanguins érythrocytaires connus chez l'homme. A ce jour, près de 50 antigènes du système rhésus ont été décrits, dont le plus important est l'Ag D qui est responsable de la majorité des accidents d'allo-immunisations transfusionnelles ou fœto-maternelles. La classification en Rh+ et Rh- ne repose que sur la présence ou l'absence de l'Ag D. Dans ce système, cinq antigènes principaux méritent d'être connus ; les antigènes D (Rh1), C (Rh2), E (Rh3), c(Rh4) et e (Rh5).

Ces Ag sont immunogènes et leurs immunogénicité par ordre décroissant est : D > E > c > e > C [24].

2-3-2 Les anticorps du système rhésus

Dans le système Rhésus, en situation normale, il n'y a pas d'Ac sériques. Ces Ac apparaissent lors d'une immunisation soit par transfusion, soit lors d'une grossesse incompatible. Ils sont irréguliers et immuns, c'est-à-dire présent uniquement chez les individus RH : -1 après immunisation, en opposition aux Ac du groupe ABO qui sont naturels et réguliers. Les Ac en cause sont par ordre de fréquence décroissante : anti-RhD (antiRh1), anti-RhE (anti- Rh3), anti Rhc (anti- Rh4), anti-Rhe (anti-RH5), anti-RhC (anti-Rh2) [26].

2-4-Le système kell

Le système Kell possède deux antigènes principaux : K (KEL 1) et K (KEL 2). Ce système est le plus immunogène après le système rhésus.

2-5 Les autres systèmes

Il existe trois autres systèmes d'antigènes secondaires doivent être connus et pris en considération dans les conflits immunologiques potentiels provoqués par une transfusion ou une grossesse incompatible : le système Duffy (FY), Kidd (JK), et MNS.

a- Le système Duffy

Il s'agit également d'un système immunogène. Il comprend 2 antigènes principaux : Fya (FY1) et Fyb (FY2). Il existe théoriquement 3 phénotypes possibles : Fy (a+b-), Fy (a+b+) et Fy (a-b+). Mais ce système présente une particularité chez les noirs où un grand nombre de sujets porte à l'état homozygote un allèle silencieux, avec un phénotype érythrocytaire Fy (a-b-). Chez ces sujets, la glycoprotéine Duffy non détectée sur les érythrocytes se retrouve dans les autres tissus de l'organisme.

Ce phénotype Fy (a-b-) se voit exceptionnellement chez les Caucasiens.

Les anticorps anti-Fya (FY1) et anti-Fyb (FY2) peuvent être impliqués dans des accidents transfusionnels immunologiques ou dans des problèmes d'incompatibilité fœto-maternelle.

b- Le système Kidd

Représenté par 2 antigènes principaux : Jka (Jk1) et Jkb (Jk2) aussi immunogène que les antigènes du système Duffy. Deux allèles codominants localisés sur le chromosome 18, Jk1 et Jk2, déterminent l'expression des antigènes. Il s'agit d'un système diallélique équilibré.

Les anticorps anti-Jka (Jk1) et anti-Jkb (Jk2), très dangereux et relativement fréquents, doivent être systématiquement dépistés avant la transfusion.

c- Le système MNS

Ce système doit prendre en compte deux antigènes principaux : S (grand S-MNS 3) et s (petit s-MNS4). La fréquence de ces antigènes dans la population française s'établit respectivement à 70 % pour S et 88% pour s.

Les anticorps anti-S (MNS3) et anti-s (MNS4) peuvent être responsables de réactions hémolytiques transfusionnelles et maladies hémolytiques du nouveau né. De ce fait, ils doivent également être recherchés dans un contexte transfusionnel ou lors du suivi d'une grossesse [27].

Chapitre III : Les anémies hémolytiques

1-Définition des anémies hémolytiques

L'anémie : est définie comme étant une diminution du taux de l'Hb au-dessous des valeurs de référence à l'hémogramme.

L'hémoglobine normale varie en fonction du sexe (chez l'adulte) et de l'âge. Le diagnostic positif d'anémie dépendra donc de ces critères :

	Nouveau-né	Homme adulte	Femme adulte	Enfant 3-12 ans	Nourrisson de 3mois - 2ans
Le taux normal d'Hb g/dl	13,5-19,5	13-18	12-16	11-15	10-12,5

Les anémies hémolytiques : sont des anémies liées à la destruction excessive des hématies en provoquant la libération de l'Hb dans la circulation sanguine ou dans les tissus périphériques [23,28].

2-Classification des anémies hémolytiques

Une anémie hémolytique peut être corpusculaire (anomalie du GR) ou extracorpulaire (provoquée par agent extérieur au GR).

2-1-Les anémies hémolytiques corpusculaires

2-1-1-Les hémoglobinopathies

- a- Drépanocytose :autosomique récessive, c'est la plus fréquente des hémoglobinopathies. Elle touche principalement les sujets originaires d'Afrique noire et est liée à mutation de la chaîne bêta de la globine. Seuls les homozygotes sont symptomatiques et présentent une hémolyse dès l'enfance associée à des manifestations thrombotiques sous forme de douleurs articulaires ou abdominales (crises vaso-occlusives). Le frottis sanguin montre des drépanocytes (hématies en faucilles) et le diagnostic repose sur l'électrophorèse de l'hémoglobine (HbS : 75 à 90 %) ;
- b- Thalassémies : les syndromes thalassémiques sont caractérisés par une diminution de production des chaînes de globine alpha ou bêta normales. Autosomales récessives, elles se traduisent par une pseudo-polyglobulie microcytaire dans les formes hétérozygotes et une anémie hémolytique grave (microcytaire et

hypochrome) dans les formes homozygotes. Ils touchent principalement les sujets du pourtour du bassin méditerranéen et d'Asie du Sud-Est. Le diagnostic repose sur l'électrophorèse de l'hémoglobine[23].

2-1-2-Les anomalies enzymatiques : les trois principaux déficits enzymatiques responsables d'une AH sont :

- a- **Le déficit en G6PD**: est une anémie hémolytique chronique. Cette maladie est transmise génétiquement sur le mode récessif, lié au chromosome X. L'hémolyse est déclenchée par la prise médicamenteuse, les infections ou la consommation de fèves ;
- b- **Le déficit en pyruvate kinase** : est une maladie autosomique récessive. Elle est responsable d'une anémie hémolytique chronique non sphérocytaire de gravité très variable : de l'hémolyse bien compensée à l'anémie dépendante des transfusions. L'hémolyse peut être exacerbée par les infections et la grossesse [29] ;
- c- **Le déficit en pyrimidine 5' nucléotidase** : il s'agit d'une maladie autosomique récessive. C'est le troisième déficit enzymatique le plus fréquent responsable de l'apparition de l'hémolyse. Il est caractérisé par l'apparition des hématies à ponctuations basophiles [30].

2-1-3-Les anomalies de la membrane érythrocytaire

a. Constitutionnelles (héréditaires)

La maladie de Minkowski-Chauffard est une maladie autosomale dominante avec une hémolyse chronique. La présence de sphérocytes au frottis sanguin, l'autohémolyse in vitro et la sensibilité aux solutions hypotoniques orientent vers cette maladie mais le diagnostic est confirmé par l'ektacytométrie.

b. Acquises

L' HPN (hémoglobinurie paroxystique nocturne) : son diagnostic repose sur l'immunophénotypage des cellules sanguines.

2-2-Les anémies hémolytiques extracorporelles

2-2-1-Toxiques : les médicaments, les venins de serpents, les champignons vénéneux, le saturnisme...

2-2-2-Bactériennes : perfringens.

2-2-3-Parasitaires : paludisme.

2-2-4-Mécaniques

La micro-angiopathie thrombotique : son diagnostic repose sur la présence de schizocytes sur le frottis sanguin [23,31].

2-2-5-Immunologiques

3-Les anémies hémolytiques immunologiques

3-1-Les anémies hémolytiques allo-immunes

3-1-1-Définition

L'allo-immunisation est un phénomène qui est caractérisé par la survenue d'une réponse immunitaire d'un individu d'une espèce donnée suite à l'introduction dans son organisme d'un antigène dont il est dépourvu mais présent chez un autre individu de la même espèce, cet antigène est appelé allo-antigène. Le polymorphisme génétique allélique avec l'immunogénicité des molécules biologiques qui existent chez les individus de la même espèce sont considérés comme la cause principale de la survenue des allo-immunisations [32].

3-1-2-L'incompatibilité fœto-maternelle

L'incompatibilité fœto-maternelle correspond à la fixation d'alloanticorps maternels sur les antigènes érythrocytaires du fœtus qui sont d'origine paternelle. Cela induit la production des complexes immuns responsables d'une immunohémolyse intravasculaire. Les anticorps sont transmis au fœtus pendant la grossesse et provoquent une anémie qui débute dans l'utérus et qui persiste plusieurs semaines après l'accouchement avec un ictère qui se développe rapidement après la naissance (figure 12) [33].

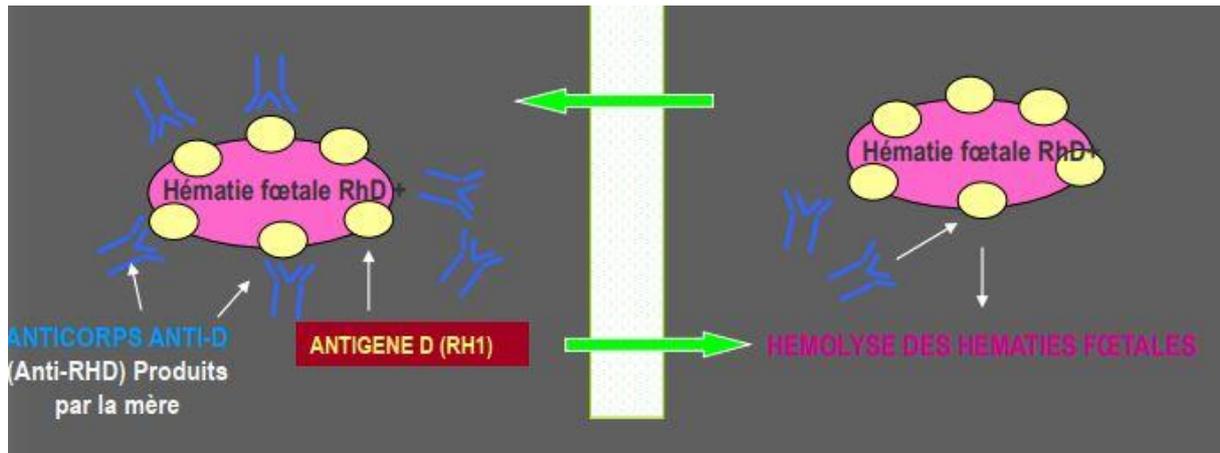


Figure 12 : l'incompatibilité fœto-maternelle érythrocytaire [34].

3-1-2-1-Physiopathologie

La survenue d'une incompatibilité fœto-maternelle nécessite une série d'évènements :

- Passage d'hématies fœtales dans le sang maternel :

Ce processus se produit essentiellement au cours de l'accouchement. Au cours de la première grossesse on ne rencontre théoriquement pas de maladie hémolytique mais lors des grossesses ultérieures où la mère est de Rhésus D négatif sera à nouveau enceinte d'un fœtus RhD positif. Une fois que la mère est immunisée, cette immunisation persiste définitivement.

- Passage des anticorps maternels vers le fœtus :

Le passage se fait par voie placentaire par un mécanisme de transport actif, seuls les anticorps du type IgG peuvent traverser cette voie via des récepteurs de leurs chaînes lourdes. Ce passage devient important vers la fin du deuxième trimestre.

- Sensibilisation des hématies du fœtus :

Les anticorps de la mère se fixent sur les hématies fœtales, ensuite il ya stimulation des macrophages de la rate et du foie qui provoque leurs phagocytoses. L'augmentation de la concentration de ces anticorps provoque une augmentation de la destruction érythrocytaire.

Au niveau du foie qui est l'organe hématopoïétique principal chez le fœtus, il ya une augmentation de la synthèse érythroblastique pour compenser l'anémie fœtale. Ce processus conduit à l'apparition d'une hépatomégalie. L'hémoglobine résultant de la destruction érythrocytaire est transformée en bilirubine qui traverse la barrière placentaire pour être éliminée par la mère (figure 2) [35].

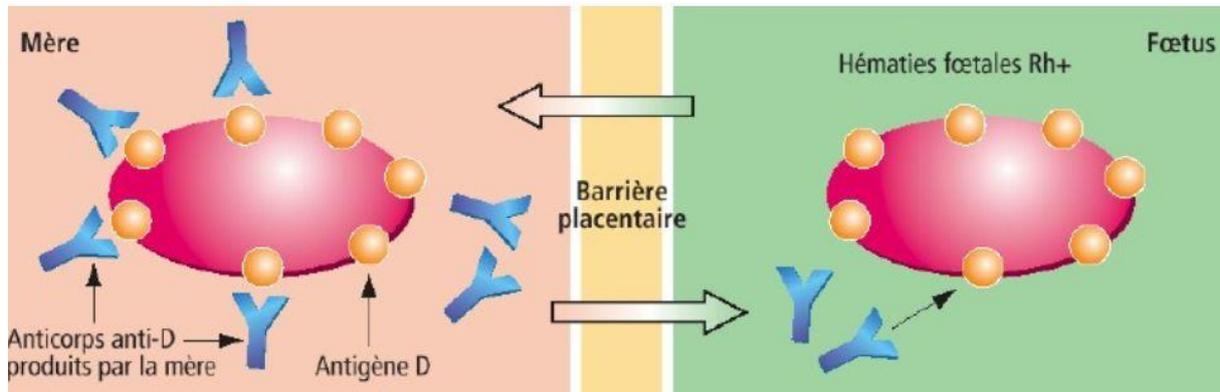


Figure 13 : passage des hématies fœtales dans le sang maternel [34].

3-1-2-2-Classification

3-1-2-2-1-Les incompatibilités Rhésus D

➤ Physiopathologie

Pour qu'une maladie hémolytique par incompatibilité Rhésus D apparaisse, un ensemble d'événements sont nécessaires :

- Le passage des hématies fœtales dans la circulation maternelle : ce processus est le résultat d'une hémorragie transplacentaire.
- La réponse immunitaire primaire (du type IgM) : après plusieurs mois de l'accouchement il y aura apparition des anticorps du type IgM en faible quantité dans le sang maternel donc le premier enfant ne présente pas une maladie hémolytique.
- La réponse immunitaire secondaire et le passage des anticorps IgG dans le sang fœtal : au cours d'une seconde grossesse incompatible, la mère produit des anticorps du type IgG qui possèdent des structures spéciales sur le fragment Fc de leurs chaînes lourdes. Cela permet un passage transplacentaire de ces anticorps pour atteindre la circulation fœtale.
- La fixation des IgG sur les hématies fœtales : la fixation des AC anti-D sur les AG érythrocytaires induit la destruction rapide des GR au niveau de la rate (d'où une splénomégalie), une anémie et une hyperhématopoïèse. Celle-ci se traduit par l'apparition d'une hépatomégalie et la présence d'érythroblastes dans le sang. Dans les cas graves, peuvent apparaître une défaillance cardiaque et un état d'anasarque avec mort fœtale possible. Mais généralement le fœtus survit à la maladie ; au moment de la naissance, une hémolyse intense se développe. La bilirubine, produit de la dégradation de l'hémoglobine, s'accumule alors dans son plasma, faute d'être évacuée par l'organisme maternel, le foie du nouveau-né n'étant pas encore capable d'extraire cette bilirubine par défaut d'enzymes

adéquats de glycuconjugaison. Il y alors ictère néonatal avec risque d'ictère nucléaire[32,36].

3-1-2-2-2-Les incompatibilités ABO

L'incompatibilité fœto-maternelle dans le système ABO se produit lorsque la mère est de groupe O et le nouveau-né du groupe non O. Elle apparaît dès la première grossesse contrairement à l'incompatibilité dans le système rhésus et elle n'est pas liée aux anticorps naturels anti-A ou anti-B qui sont des IgM qui ne traversent pas la barrière placentaire mais à des anticorps anti-A et anti-B immuns.

➤ Physiopathologie

Les anticorps maternels proviennent :

- a. Soit d'une immunisation fœto-maternelle par voie transplacentaire ou après une transfusion.
- b. Soit d'une hétéro-immunisation produite par des agents de l'environnement (production d'anticorps immuns de nature IgG): pollens, bactéries, vaccins.

Les anticorps immuns qui se trouvent dans la circulation maternelle (la mère est du groupe O) traversent la barrière placentaire et provoquent chez le fœtus qui est du groupe A ou B une anémie hémolytique modérée car les anticorps ne seront pas assez puissants pour activer la voie du complément et induire l'hémolyse.

3-1-2-2-3-Les autres incompatibilités

- c- Le système Kell : l'Ag Kell 1 est le plus immunogène après l'Ag Rh1.
- d- Le système Fy : l'Ag Fy1 est le plus immunogène.
- e- Le système Jk : l'Ag Jk1 est plus immunogène que l'Ag Jk2.
- f- Le système MNS : ces Ag provoquent rarement des IFM.

3-1-2-3-Diagnostic biologique

a. Chez la mère

- Groupage ABO et RhD et phénotype.
- Recherche des agglutinines irrégulières, s'il ya une incompatibilité dans le système rhésus [37].

b. Chez le fœtus

- TCD : à partir du cordon.

- Groupage phénotypé Rh Kell qui se fait avant une transfusion si elle existe.
- FNS et le taux de réticulocytes.
- Frottis sanguin qui est considéré comme le diagnostic différentiel des hémolyses non immunologiques.
- Dosage de la bilirubine plasmatique [34].

3-1-3-L'incompatibilité anti-érythrocytaire post transfusionnelle

L'incompatibilité anti-érythrocytaire post transfusionnelle est une réponse immunitaire générée suite à l'interaction des anticorps d'un individu transfusé avec les antigènes érythrocytaires des hématies du donneur. Exceptionnellement, les incompatibilités peuvent apparaître suite à une interaction entre les anticorps présents dans le sang du donneur et les hématies du patient transfusé (figure 3) [38].

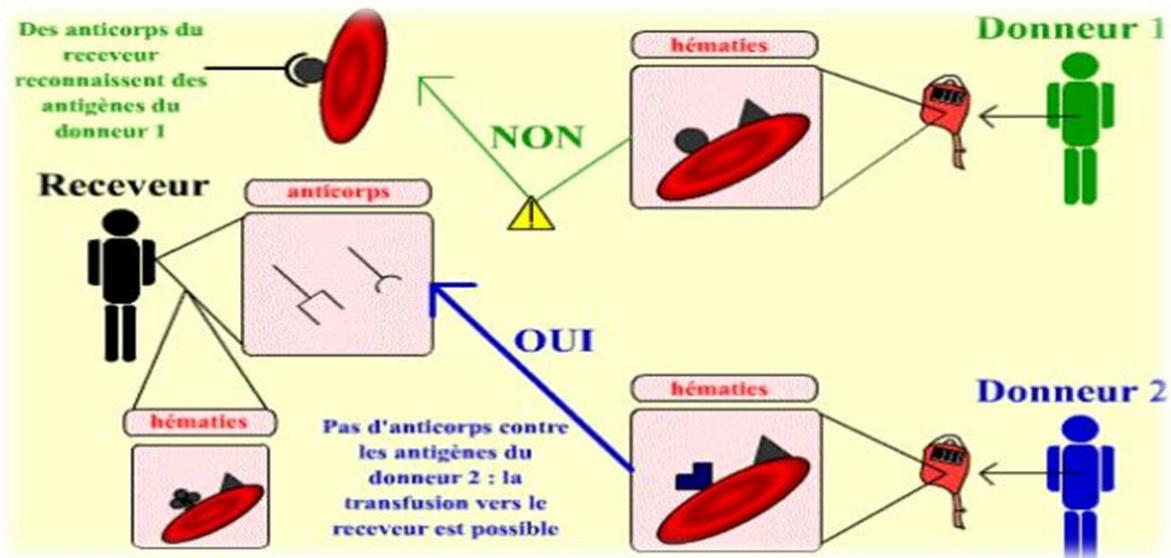


Figure 14 : la compatibilité globulaire [39].

3-1-3-1-Physiopathologie

La majorité des groupes sanguins peuvent générer des accidents hémolytiques. Les anticorps responsables sont essentiellement les Ac naturels réguliers du système ABO et les Ac immuns irréguliers des systèmes Rh, Duffy, Kell, Kidd, MNS, cependant les incompatibilités ABO sont les plus fréquentes [40].

L'hémolyse des hématies peut être extra ou intravasculaire. Les cas cliniques dépendent de la forme de l'hémolyse prédominante.

➤ L'hémolyse intravasculaire

La fixation des anticorps sur les hématies provoque l'activation du complément, ensuite la membrane sensibilisée sera détruite et l'Hb résultant sera libéré dans le sang périphérique. Cette forme d'hémolyse apparaît immédiatement.

➤ L'hémolyse extravasculaire

La fixation des anticorps sur les hématies n'induit pas l'activation du complément. Dans ce cas la surface du globule rouge contient seulement des anticorps et des fragments du complément, la reconnaissance de ces composants par les macrophages du système réticulo-endothélial provoque le retrait des hématies du sang périphérique pour être détruites. Cela entraîne une accumulation de la bilirubine [41].

3-1-3-2-Diagnostic biologique

Avant de rechercher l'anticorps responsable, il faut avant tout révéler l'origine hémolytique (taux d'hémoglobine, bilan biochimique...).

Les examens à pratiquer sont les suivants :

- Un groupage ABO Rh et phénotypage Rh-Kell 1 du donneur et du receveur ;
- RAI chez le donneur et le receveur ;
- TDA et l'élution pour déterminer la spécificité de l'anticorps en cause ;
- L'épreuve directe de compatibilité au laboratoire (EDC) entre le sérum du receveur et les GR de la poche de sang [38].

3-1-4-Les anémies hémolytiques immuno-allergiques

Ce sont des anémies rares provoquées par des prises médicamenteuses. Le processus immuno-allergique qui est directement lié à la présence d'anticorps anti-médicament ne donne une réaction immunitaire qu'avec la présence du médicament [42].

3-1-4-1-Physiopathologie

Il existe deux mécanismes essentiels responsables de l'apparition des anémies hémolytiques médicamenteuses :

➤ Le mécanisme haptène :

Les anticorps se fixent sur le médicament qui est lui-même fixé sur la membrane érythrocytaire entraînant la phagocytose des hématies.

➤ Le mécanisme immun-complexe :

Dans ce cas l'anticorps et l'antigène se lient en phase plasmatique et forment un complexe qui va se fixer sur la membrane érythrocytaire en provoquant l'activation du complément et la lyse cellulaire [43].

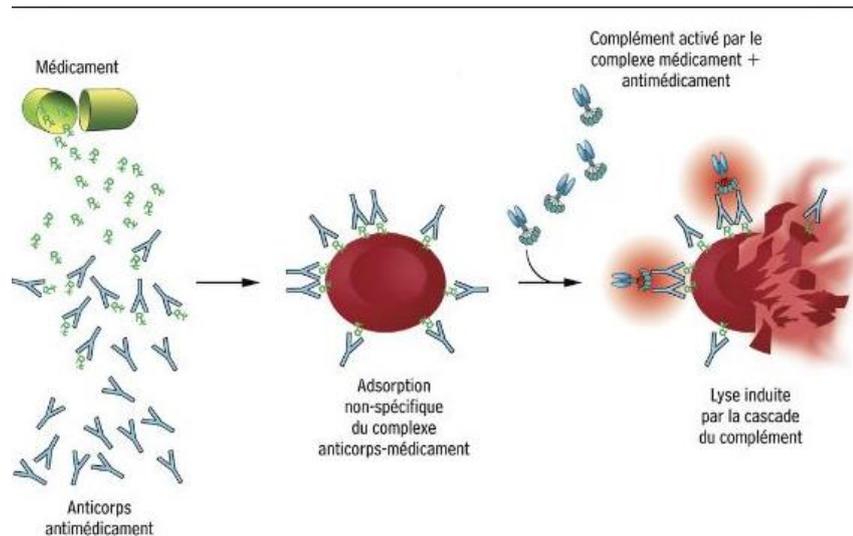


Figure 15 : mécanisme de sensibilisation des hématies par adsorption du complexe médicament-antimédicament [44].

3-1-4-2-Le diagnostic biologique

- L'examen le plus courant pour mettre en évidence des anticorps anti-érythrocytaires est le test de Coombs direct.
- Le test de Coombs indirect, ou test indirect à l'antiglobuline, correspond à la recherche d'anticorps anti-érythrocytaires libres sériques. Il est en général réalisé sans la présence de médicaments et sa positivité indique la présence d'auto-anticorps dans le sérum du patient.

Pour identifier des anticorps anti-médicaments, ce test doit être réalisé en présence du médicament suspect, en mettant le sérum du patient en contact avec les hématies préalablement exposées au médicament. Si le test est positif en présence du médicament, cela confirme la responsabilité du médicament dans l'AHIA [42].

3-2- Les anémies hémolytiques auto-immunes

3-2-1- Définition

Les anémies hémolytiques auto-immunes (AHAI) se définit par une diminution de la durée de vie des hématies (hémolyse) liée à la présence d'auto-anticorps dirigés contre un ou plusieurs composants, ou anti-gènes (Ag), exprimés à leurs surfaces[45].

3-2-2- Classification

Elle repose sur les données cliniques et biologiques, prenant en compte les résultats du TCD, les caractéristiques thermiques, le caractère hémolysant et la spécificité de l'anticorps. Elle permet de dégager une classification selon trois axes :

3-2-2-1- Classification immunologique

Dépend essentiellement de l'activité thermique de l'auto-anticorps en cause. On distingue donc les AHAI «chaudes» (AHAIC) et les AHAI « froides » dites aussi « cryopathiques ». Cette distinction revêt autant un intérêt clinique que biologique, chacune de ces deux grandes variétés possède un tableau clinique et un traitement qui leur sont propres.

3-2-2-1-a-AHAI à auto-anticorps chauds

Ils exercent leur activité hémolytique maximale, à des températures « optimum thermique » comprises entre 35 et 40 C°.

Ils sont le plus souvent d'isotype IgG : non agglutinants, décelables par le test de coombs direct, beaucoup plus rarement IgM ou IgA, et peuvent être dirigés contre une (30-40% des cas) ou plusieurs cibles antigéniques : Ag du système rhésus (anti e) pour les AHAIC type IgG, anti antigène I rarement i pour les AHAIC type IgM (Tableau 2).

TCD est positif type IgG ou IgG + complément.

Elles sont idiopathiques dans 50 % des cas.

Dans la moitié des cas, elles peuvent être déclenchées par certaines maladies (syndrome lymphoprolifératif, tumeur ovarienne, maladie autoimmune) ou par certains médicaments (alpha-méthyl L-dopa). On parle alors d'AHAI « secondaires ».

Dans les AHAIC, qui représentent 60–80% de l'ensemble des AHAI, l'hémolyse est intratissulaire et de siège principalement splénique.

3-2-2-1-b-AHAI à auto-anticorps froids

Les auto-anticorps « froids », agglutinant les hématies à basse températures inférieures à 30°C (optimum thermique 4°) encore appelés « agglutinines froides » (AF), sont presque toujours de type IgM : et ciblent principalement l'antigène I rarement i à la surface des hématies. Les AF entraînent la lyse des hématies par le biais d'une activation du C[3,45].

Les AHAI à Ac froids se caractérisent habituellement par un TCD positif de type complément(C3).

Au sein des AHAI à anticorps « froids », on distingue :

-Les formes aiguës transitoires post-infectieuses : infection à *Mycoplasma pneumoniae*.... ;

- La forme chronique appelée « maladie chronique des agglutinines froides »(MCAF), qui représente 10–20% des AHAI de l'adulte.

Bien qu'habituellement classée dans les AHAI, la MCAF s'en distingue nettement par ses caractéristiques et ses modalités thérapeutiques. Elle s'apparente, en effet, le plus souvent à une hémopathie lymphoïde B de bas grade à type essentiellement de lymphome lymphoplasmocytaire et s'associe dans la majorité des cas à la présence d'une IgM kappa monoclonale ;

- Hémoglobinurie Paroxystique à Figure (HPF) qui est exceptionnelle chez l'adulte. Elle est due à un auto-anticorps de type IgG (hémolysine biphasique de Donath-landesteiner) qui fixe le C à froid (<15°C) et entraîne une hémolyse à chaud (>30°C). Elle est le plus souvent d'origine post-infectieuse et se manifeste par une hémolyse aiguë intra-vasculaire.

Les principales caractéristiques des différents types d'AHAI et les propriétés immunochimiques des auto-anticorps en cause sont résumées dans le (tableau 2).

3-2-2-1-c- Les formes rares d'AHAI

Un certain nombre d'exceptions contrecarrent cette classification immunologique :

- Les auto-anticorps « chauds » de nature IgA qui peuvent être responsables du même tableau clinique que celui des AHAIc à IgG ;
- Les rares AF de nature IgA n'activent pas le C et ne sont pas responsables d'hémolyse, mais seulement de manifestations périphériques cutanées déclenchées par le froid ;
- La variété la plus redoutable, mais heureusement très rare, est l'AHAI à IgM «chaudes » l'auto-anticorps IgM a une large amplitude thermique et agglutine les hématies à 37°C ;
- Il existe des variétés « mixtes » résultant de la présence simultanée d'auto-anticorps« chauds » IgG et d'auto-anticorps « froids » IgM.

Type d'AHAI	Terrain/clinique	Formes secondaire	Classe d'Ig	Optimum Thermique °C	Spécificité du TDA
AHAI à auto-anticorps « chauds »	Adulte > enfant Hémolyse extravasculaire, mode d'installation subaiguë	~ 50% des cas	IgG - IgA, IgM	37	IgG±C3d
MCAF	>50 ans Hémolyse extravasculaire± acrosyndrome	IgM kappa monoclonale dans 90% des cas±lymphome Lymphoplasmocytaire	IgM>>IgA ou IgG	4	C3
AHAI à auto-anticorps « froids » transitoires	Enfant, adulte Jeune Hémolyse Intra-vasculaire	Infections (mycoplasme, EBV. . .)	IgM polyclonale	4	C3
Hémoglobinurie Paroxystique « à Frigore »	Exceptionnelle chez l'adulte Hémolyse aiguë Intra-vasculaire	Infections (mycoplasme, syphilis, virus)	IgG (hémolyse biphasique de Donath-Landsteiner)	>30	C3
AHAI « mixte »	Adulte	LMNH	IgG, IgM±AF	4- 37	IgG±C3

Tableau 2: Principales caractéristiques des différents types d'AHAI.

TDA: test direct à l'anti globuline (Coombs direct) ; MCAF: maladie chronique des agglutinines froides ; AF : agglutinines froides ; AC : Anticorps ; Ig : Immunoglobuline ; LMNH: lymphome malin non Hodgkinien.

3-2-2-2-Classification étiologique

Selon le contexte dans lequel survient l'AHAI, on distingue les formes associées à une maladie sous-jacente ou déclenchée par un agent étiologique, et les formes « idiopathiques » où l'AHAI constitue la manifestation unique de la maladie.

3-2-2-3-Classification évolutive

On distingue enfin les formes aiguës et les formes chroniques.

3-2-2-3-a- Les formes aiguës

Elles débutent brusquement, se traduisent généralement par un tableau d'hémolyse intravasculaire dont la sévérité peut mettre en jeu le pronostic vital, mais elles sont heureusement transitoires, évoluant en quelques semaines vers la guérison définitive. Elles peuvent cependant rechuter sous le même aspect et prélude à une forme chronique à poussées récidivantes.

3-2-2-3-b- Les formes chroniques

Elles durent, par définition, plusieurs mois et en général plusieurs années, répondant plus ou moins complètement aux traitements. L'hémolyse persiste souvent compensée, intermittente ou continue de faible intensité. Ces formes chroniques se soldent rarement par une guérison définitive, tant que le processus responsable des phénomènes d'auto-immunité n'a pas été supprimé [11].

3-2-3- Physiopathologie

Il existe à l'échelon individuel une corrélation inverse entre le nombre d'anticorps fixés à la surface des hématies et la demi-vie des hématies sensibilisées.

Au cours de l'AHAIc, l'auto-anticorps en cause est le plus souvent d'isotype IgG et les sous-classes IgG1, plus rarement IgG 3. Les IgG 1 comme les IgG 3 ont la capacité d'activer le

système de complément (contrairement aux IgG2 et IgG 4) et également de se fixer aux macrophages via leur liaison au récepteur pour le fragment Fc de l'IgG (Fc γ R), elles peuvent par ce biais induire la phagocytose accrue des GR opsonisés par les monocytes-macrophages de la rate.

Les autres mécanismes effecteurs pouvant contribuer à la destruction accrue des GR sont la cytotoxicité directe dépendante du complément, après activation par le complexe anticorps /antigène, et à un moindre degré la cytotoxicité directe dépendant des anticorps (ADCC) impliquant également les Nk et les macrophages, elles ont des récepteurs spécifiques pour les IgG Fc. Certains facteurs sont suspectés d'influer sur le degré de pathogénicité des auto-anticorps, parmi lesquels : l'isotype de l'anticorps (les AHAIc dues a des auto-anticorps de type IgM ou IgA sont réputés plus sévères, le degré de glycosylation de l'auto-anticorps ainsi que sa spécificité antigénique.

Le caractère pathogène des agglutinines « froides » (AF) est plus lié à leur amplitude thermique de réaction qu'à leur titre. Lorsque l'amplitude thermique de l'AF est basse, l'hémolyse ne survient qu'en cas de refroidissement conséquent. Leur pouvoir agglutinant à froid explique que l'agglutination des GR peut se produire directement in vivo dans les petits vaisseaux superficiels des extrémités où la température peut descendre à 28-31°C en fonction de la température ambiante.

L'agglutination des GR entraîne un engorgement des petits vaisseaux et des signes d'acrocyanose. Si l'obturation des vaisseaux se prolonge, l'ischémie peut conduire à la nécrose des extrémités. Les AF IgA qui ne fixent pas le C ne sont responsables que de ces signes vasculaires. Les AF IgM sont capables de fixer le C, et c'est par l'intermédiaire du C que l'hémolyse se développe. Son activation se fait de manière optimale entre 20 et 25 °C, mais se produit également à 37 °C lorsque l'AF a une amplitude thermique large.

L'agglutination n'est pas nécessaire à l'activation du C, qui se déclenche du seul fait de la réaction Ag-Ac. Une fois activées, les fractions du C restent solidement fixées sur les GR, alors que l'AF se détache aisément de son support dès que la température s'élève, ce qui se produit quand les GR retournent dans la circulation profonde. Les AF ainsi libérées ont la capacité de se fixer sur de nouveaux GR à basse température.

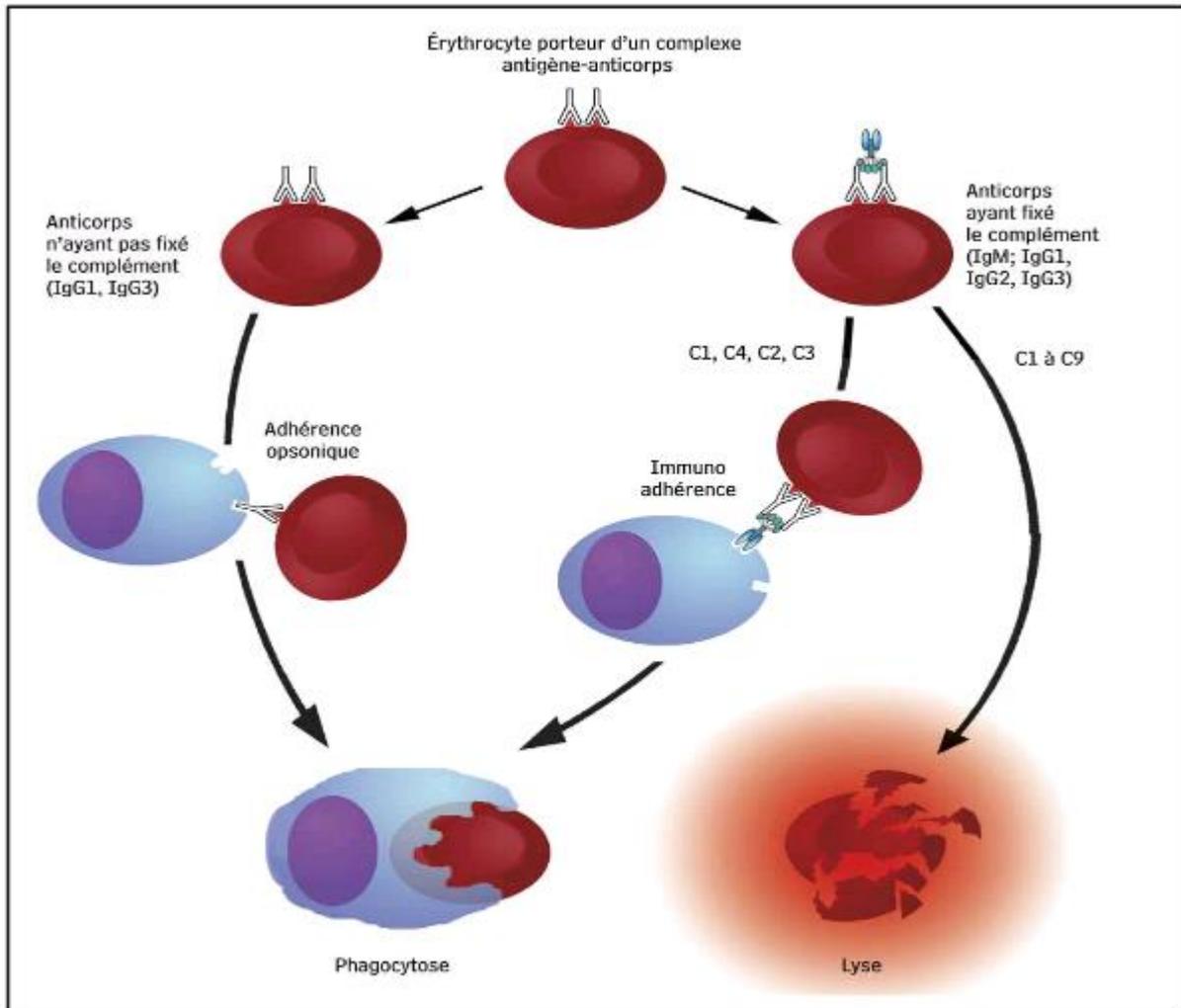


Figure 16 : Mécanisme de destruction des hématies dans les AHAI.

Si les mécanismes qui entraînent au cours des AHAI la lyse prématurée des hématies sensibilisées (phagocytose via la fixation des autoanticorps de type IgG aux Fc récepteurs et/ou lyse dépendante du complément) sont relativement bien établis, ceux qui concourent à la rupture de tolérance et à la production d'autoanticorps restent en grande partie méconnus.

L'étude des modèles de souris NZB et NZB/NZW, souris qui peuvent développer une AHAI, a mis en évidence un déséquilibre de la balance Th1/Th2 avec production accrue d'IL-10 susceptible de favoriser la production d'autoanticorps. Plus récemment, dans un modèle murin expérimental d'AHAI induite, le rôle pivot des lymphocytes T CD4+ CD25+régulateurs dans le contrôle de l'AHAI a été mis en avant.

Chez l'homme, parmi les mécanismes pouvant favoriser l'émergence d'une AHAI, un défaut d'apoptose des lymphocytes T autoréactifs a été suggéré par certains.

La production d'autoanticorps chez l'homme peut être favorisée par :

- Des infections virales ;
- Des facteurs génétiques et/ou des anomalies intrinsèques des lymphocytes B ;
- Des agents infectieux (*Mycoplasma pneumoniae*, Epstein-Barr virus...) qui peuvent présenter des motifs antigéniques (I, i, P) communs aux hématies et induire, par un mécanisme de mimétisme moléculaire, la production d'autoanticorps anti-érythrocytes ;
- L'apparition d'un clone tumoral B (IgM monoclonale à activité d'agglutinine froide dans la MAF, par exemple).

Les principales maladies ou circonstances pouvant être associées aux anémies hémolytiques auto-immunes (AHAI) à anticorps « chauds » (AHAI « secondaires ») :

- Leucémie lymphoïde chronique ;
- Leucémie aiguë lymphoblastique ;
- Lymphome malin non hodgkinien ;
- Maladie de Hodgkin ;
- Lupus systémique ;
- Maladie de Biermer ;
- Thyroïdites ;
- Mononucléose infectieuse ;
- Médicaments[45].

3-2-4- Diagnostic positif d'une anémie hémolytique

3-2-4-1- Diagnostic clinique

Les manifestations cliniques révélatrices des AHAI sont non spécifiques. Elles associent à des degrés variables, un syndrome anémique et des signes d'hémolyse extravasculaire à type de subictère conjonctival, voire d'ictère généralisé avec urines foncées. Lorsque l'hémolyse est particulièrement intense et le début brutal, des signes d'hémolyse intravasculaire (fièvre, lombalgies, urines rouges « porto » et parfois insuffisance rénale) peuvent être associés et faire parfois errer le diagnostic. En dehors de toute maladie associée, une splénomégalie modérée liée à l'hémolyse extravasculaire est observée dans 30 à 50% des cas.

La découverte d'AHAI est parfois fortuite, lors d'un examen de laboratoire (auto-agglutination lors de groupage ou de recherche d'anticorps irrégulier ou même lors de la réalisation d'une numération et formule systématique)[11,46].

3-2-4-2- Diagnostic biologique

-L'anémie hémolytique est une anémie normochrome, normocytaire ou macrocytaire. La macrocytose est en rapport avec la régénération médullaire (réticulocytose).

-L'anémie est régénérative, le chiffre absolu des réticulocytes est supérieur à $150000/\text{mm}^3$.

-L'haptoglobine est diminuée ou effondrée (quelque soit le mécanisme de l'hémolyse).

-Au bilan hépatique, il existe une élévation de la bilirubine libre sérique et augmentation des LDH.

-En cas d'hémolyse aiguë intravasculaire, il existe également une hémoglobinurie avec risque d'insuffisance rénale aiguë et de coagulation intravasculaire disséminée [3].

3-2-4-3- Diagnostic immuno-hématologique

La preuve de la nature auto-immune des AHAI repose sur le test de Coombs direct, sur le test d'élution-fixation et sur l'identification et le titrage des auto-anticorps sériques.

3-2-4-3-a- Test de Coombs Direct

Le diagnostic d'AHAI est affirmé dans la quasi-totalité des cas par la positivité du test de Coombs direct. Ce test met en présence les globules rouges du patient et les antiglobulines polyvalentes ou monospécifiques. La positivité se traduit par une agglutination. Ce test peut être parfois positif dans d'autres cas d'anémie hémolytique immunologique en particulier immuno-allergique (importance du contexte clinique).

Un test de Coombs direct positif doit toujours être contrôlé. Il ne signifie pas qu'il existe une hémolyse (il peut être positif sans qu'il n'y ait aucun signe d'hémolyse même compensée).

Actuellement, le TDA est le plus souvent réalisé en phase solide à l'aide d'un gel qui inclut l'antiglobuline (anti-IgG, anti-C3. . .).

- Préciser le type de l'auto-anticorps

Soit le test de Coombs direct est positif de type IgG seules ou IgG + complément : il s'agit d'auto-anticorps chauds.

Soit le test de Coombs direct est positif de type complément seul : il peut s'agir soit d'un auto-anticorps chaud, soit d'une agglutinine froide. La recherche d'agglutinine froide est systématique dans cette situation. La présence d'IgM à la surface des hématies ne peut en règle générale pas être démontrée de façon directe, les IgM étant le plus souvent spontanément éluées de la membrane érythrocytaire « in vitro ».

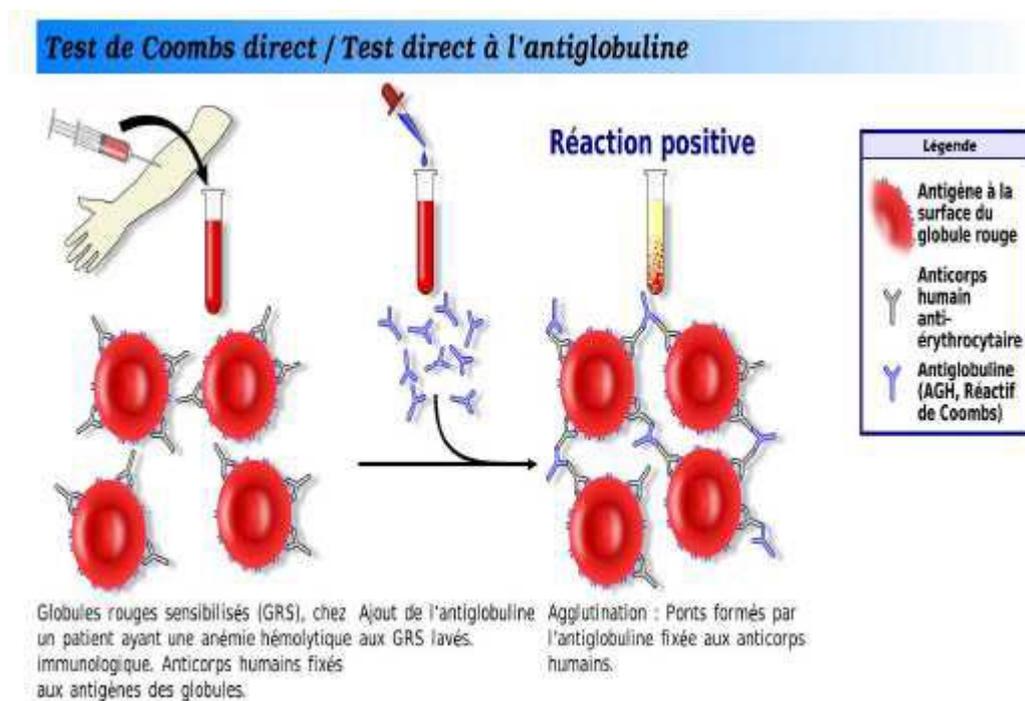


Figure 17 : schéma explicatif d'un TCD positif.

3-2-4-3-b- Cytométrie en flux

La cytométrie en flux appliquée au TCD (FC-TCD) est une technique quantitative qui permet d'apprécier la quantité d'Ac ainsi que les fractions du complément à la surface du globule rouge. Elle présente une sensibilité très élevée. En effet, elle permet de détecter des auto-anticorps à la surface des GR des patients atteints d'AHAI ayant un TCD négatif.

3-2-4-3-c- Test de Coombs indirect

Il permet, de confirmer la présence d'un auto-anticorps dans le sérum, de préciser la nature de l'Ac en cause (IgM ou IgG), d'analyser l'optimum thermique de l'Ac, d'étudier la spécificité de l'auto-anticorps, de rechercher la présence de l'hémolysine, d'apprécier le titre de l'auto-anticorps dans le temps et d'en suivre l'évolution sous traitement.

L'absence d'auto-anticorps sérique ne permet pas d'écartier la nature auto-immune d'une hémolyse. Les AF sont recherchées par une réaction d'agglutination en tube à 4°C.

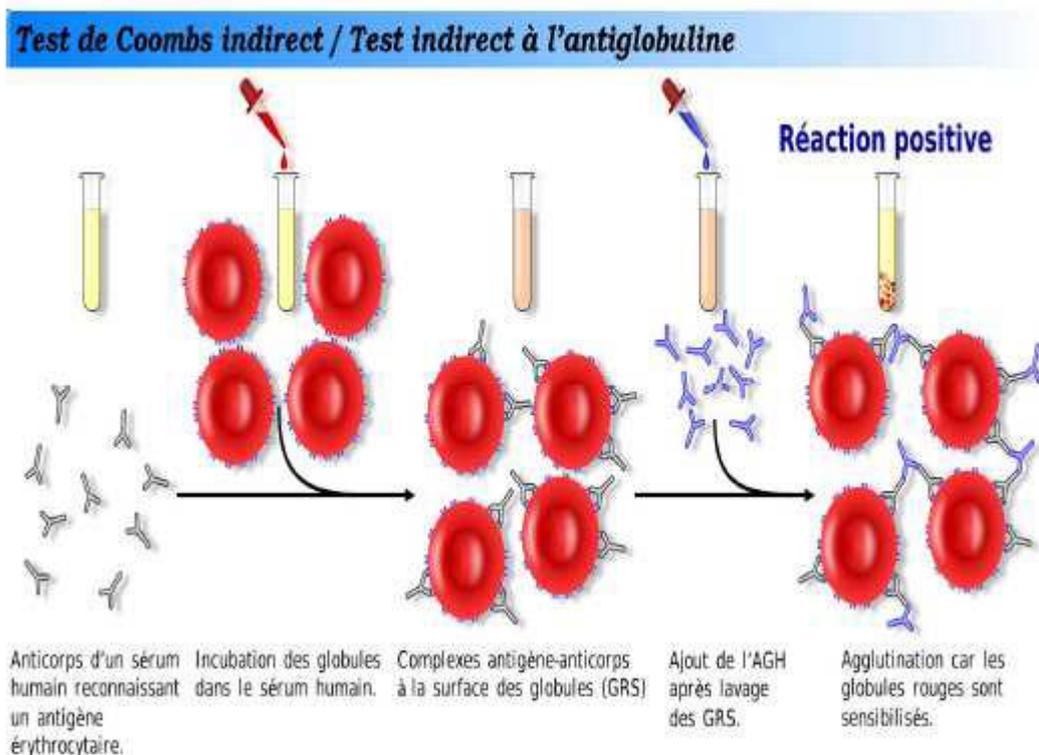


Figure 18 : Test de Coombs indirect.

3-2-4-3-d- Test d'éluion et spécificité des auto-anticorps

L'éluion a pour but de détacher de la surface des hématies les Ac fixés afin de permettre d'étudier leur spécificité. Elle permet de définir la spécificité de l'auto-anticorps. Réalisé par des méthodes physiques ou chimiques (la chaleur ou l'éther), l'éluion permet en effet de

recueillir le ou les Ac et de les confronter à un panel d'hématies humaines exceptionnel, dépourvues d'Ag publics et dans certains cas des hématies animales.

Le principe consiste à mettre dans un tube à essai des GR (et leur auto-anticorps) qui seront chauffés à 56°C ou mis dans l'éther. Il en résulte un surnageant ou éluat (auto-anticorps libres). L'analyse de cet éluat permet de connaître la spécificité de l'auto-anticorps.

Dans la grande majorité des cas en pratique courante, le test d'éluat n'est pas indispensable au diagnostic d'AHAI. Il peut être néanmoins utile dans un contexte d'hémolyse post-transfusionnelle pour distinguer un auto-anticorps d'un allo-anticorps, ou encore dans les rares cas d'hémolyse induite par un médicament [47].

Chapitre IV :

Test de coombs direct

1- Définition

Le test de Coombs direct ou test à l'antiglobuline spécifique d'espèce met en évidence d'éventuels anticorps fixés sur les globules rouges et susceptibles d'entraîner leur destruction. Il démontre en effet la sensibilisation des hématies soit par une immunoglobuline, soit par le complément, soit par les deux[48].

2-Historique

Ce test a été utilisé pour la première fois en 1945 par Coombs et al, pour détecter des anticorps dits « incomplets » (non agglutinants) du système Rh dans le contexte d'une maladie hémolytique du nouveau-né. Cette équipe a pu démontrer que la sensibilisation des hématies par ces anticorps n'aboutissait pas systématiquement à une agglutination, d'où leur qualificatif « incomplets ».

Les hématies sensibilisées ont pu alors être agglutinées grâce à l'utilisation d'une AGH préparée à partir du sérum d'animaux immunisés par des globulines humaines. Il est apparu rapidement que cette application pouvait être utilisée pour détecter d'autres anticorps fixés sur des hématies. Ainsi, la finalisation de sa procédure et son utilisation en routine ont largement contribué à découvrir de nombreux antigènes de groupes sanguins et à aider au diagnostic clinicobiologiques de nombreuses situations hémolytiques en contexte d'incompatibilité fœto-maternelle, de réaction transfusionnelle ou d'auto-immunité [49].

3-Principe

Il s'agit d'une réaction antigène-anticorps d'agglutination artificielle qui fait intervenir des antigènes particuliers et des anticorps. Les antigènes particuliers représentés par les hématies, sensibilisées ou non, sont des particules figurées, c'est-à-dire non solubles et observables en microscopie optique. Les anticorps sont en fait des anticorps anti-anticorps ou antiglobuline.

Des hématies en suspension dans une solution saline, sont séparées d'une distance interglobulaire. La sensibilisation des hématies par un Ac spécifique peut, en fonction du type d'Ag et du type d'anticorps, aboutir ou non à une agglutination. Dans ces conditions, lorsque l'agglutination fait suite à la sensibilisation, l'Ac est dit « complet » ou « agglutinant ». Cela signifie que « l'envergure » de l'Ac est suffisante pour fixer ses fragments Fab sur des Ag portés sur des hématies adjacentes et créer le réseau tridimensionnel d'un agglutinat .Lorsque

l'agglutination ne fait pas suite à la sensibilisation les Ac sont dits «incomplets» ou «non agglutinants» cela signifie que l'envergure des Ac est incompatible avec la distance interglobulaire pour créer une agglutination.

Quand un Ac non agglutinant en milieu salin se fixe sur son Ag à la surface de l'hématie, la liaison Ag-Ac est suffisamment solide pour que l'Ac ne se détache pas de la surface de l'hématie, même après plusieurs lavages. Au contraire, les globulines ou autres protéines qui peuvent s'adsorber de manière non spécifique à la surface de l'érythrocyte seront pour une grande part éluées par ces lavages et se retrouveront dans le surnageant.

La mise en évidence de la sensibilisation passe par l'utilisation d'artifice qui permet de combler la distance interglobulaire en créant un pont immunologique par un Ac anti-isotype des Ig humaines appelé AGH reconnaissant les fragments Fc des Ig qui sensibilisent l'hématie.

La mise en évidence de la sensibilisation passe par l'utilisation d'artifice qui permet de combler la distance interglobulaire en créant un pont immunologique par un Ac anti-isotype des Ig humaines appelé AGH reconnaissant les fragments Fc des Ig qui sensibilisent l'hématie.

Par extension, l'utilisation de ce type de réactif a permis aussi de mettre en évidence le stigmate d'une sensibilisation transitoire qui est représentée par le complément.

En effet, certains Ac comme ceux de nature IgM, se fixent sur l'hématie activent le complément, puis s'éluent. Si l'Ac ne peut plus être détecté, le Complément reste fixé et notamment la fraction C3d qui peut être mise en évidence par une antiglobuline spécifique. Dans le cadre de l'activation complémentaire, cette fraction est la plus importante à détecter. En effet lorsque le Complément est activé, la fraction C3 se scinde en C3a qui est libéré dans le plasma, et C3b qui reste fixé sur l'hématie. C'est par l'intermédiaire de cette fraction reconnue par les récepteurs spécifiques des macrophages hépatiques, que se fait l'épuration des hématies qui ont été sensibilisées initialement par l'Ac. Les hématies qui ont échappé aux macrophages voient la fraction C3b qu'elles portent se scinder en C3c qui est libérée dans le milieu et C3d qui reste sur la membrane et qui n'est pas reconnu par aucun récepteur des macrophages. On conçoit l'intérêt de détecter cette fraction qui a le plus de chance d'être présente sur les hématies persistant dans la circulation d'un patient en contexte hémolytique [50].

Test de Coombs direct / Test direct à l'antiglobuline

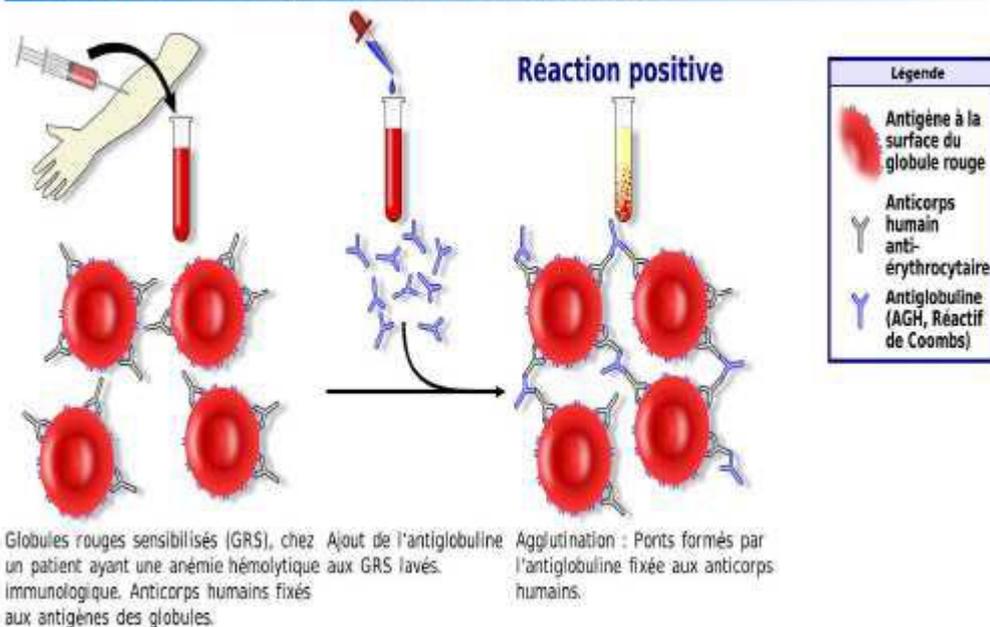


Figure 17 : Schéma explicatif d'un TCD positif[47].

4-Prélèvements

Le prélèvement doit être effectué dans un tube avec anticoagulant de type EDTA qui, par le biais de la chélation du calcium, évite la fixation de C4 source de faux positifs avec certains réactifs. L'analyse doit être réalisée dans un délai maximal de 48 heures après le prélèvement.

5-Techniques

Les laboratoires d'immunohématologie possèdent principalement deux techniques afin de mettre en évidence la sensibilisation des globules rouges par les anticorps.

5-1 Technique en tube

Cette technique n'est pas utilisée en technique de routine. Elle consiste à diluer les globules rouges du patient avec de l'eau physiologique après avoir réalisé un lavage des hématies, puis de mettre en contact les hématies diluées avec l'antiglobuline IgG ou l'antiglobuline C3d. Le lavage des hématies est une étape importante car il permet d'éliminer le plasma contenant les immunoglobulines non fixées, évitant la neutralisation de l'antiglobuline réactionnelle par les anticorps du plasma. Afin de garantir les résultats des analyses, il est indispensable de réaliser un témoin réactif. Ce témoin réactif est composé des mêmes constituants que les autres

réactifs (anti-IgG et anti-C3d) sans les anticorps spécifiques. Toute positivité de ce témoin ne permet pas la validation des analyses.

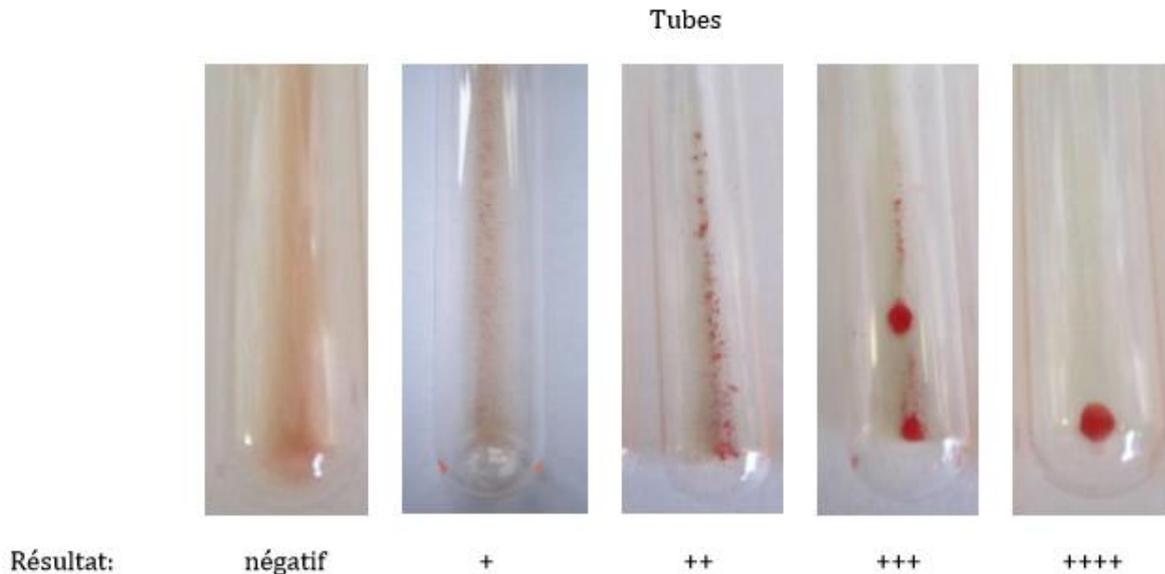


Figure 19: Test direct à l'antiglobuline en tube[51].

5-1-1-Préparation des hématies

- **Les lavages** : dans la technique en tube , les hématies doivent être lavées 4 à 6 fois au préalable afin d'éliminer toutes les globulines humaines fixées de façon non spécifique sur le GR et qui pourraient être source de faux négatifs par inhibition de l'antiglobuline ou de faux positifs par adsorption érythrocytaire aspécifique .Il convient de rappeler aussi que , afin d'éviter toute inhibition de l'action d'une antiglobuline , il est nécessaire d'utiliser une verrerie totalement dépourvue de protéines humaines.
- **La mise en suspension** : la concentration des hématies doit respecter les instructions du fournisseur. Habituellement, en tube, une suspension érythrocytaire de l'ordre de 3% à 5% est utilisée. Des suspensions érythrocytaires trop concentrées ou trop diluées donneraient des ratios incorrectes en termes de nombre de cellules /nombre d'anticorps pouvant aboutir à des faux négatifs.

5-1-2-Réactifs

- **Les antiglobulines humaines :**

Le réactif "antiglobuline" spécifique d'espèce est obtenu par immunisation d'un animal par un sérum humain, canin, félin ou équin. Ce sérum contient les immunoglobulines (IgG, IgM) ou des facteurs du complément issu de l'espèce pour laquelle on veut utiliser le réactif et il est injecté de manière régulière, à intervalle de temps précis (généralement une fois par semaine pendant cinq semaines) à l'animal choisi. Pour le lapin ou la chèvre, ces immunoglobulines sont antigéniques, et de ce fait ils synthétiseront des anticorps de lapin ou de chèvre anti-immunoglobulines humaines, canines, félines ou équines. Une semaine après la dernière injection, l'animal est saigné et le sérum est isolé par centrifugation. C'est ainsi qu'est obtenu un sérum de lapin ou de chèvre anti-immunoglobulines humaines, canines, félines ou équines. Cette antiglobuline, d'origine animale, se fixe donc spécifiquement aux épitopes isotopiques des immunoglobulines humaines, canines, félines ou équines.

Le réactif était primitivement polyspécifique (anti-IgG, anti-IgM, et anti-C3), puis des réactifs monospécifiques ont été développés, afin de reconnaître spécifiquement une classe d'immunoglobulines, IgG, IgA, IgM, ou des fractions du complément, C4, C3b et C3d susceptibles d'être fixées sur les érythrocytes.

Ces réactifs peuvent être préparés soit par des techniques polyclonales, soit par des techniques monoclonales. Les anticorps polyclonaux sont un mélange d'anticorps reconnaissant différents épitopes sur un antigène donné, chaque idiotype étant sécrété par un clone de plasmocyte (cellules sécrétrices d'anticorps) différent. Au cours de la réponse immunitaire, un organisme synthétise des anticorps dirigés contre plusieurs épitopes d'un antigène : la réponse est dite polyclonale. En effet, les anticorps monoclonaux sont des anticorps ne reconnaissant qu'un seul type d'épitope sur un antigène donné. Ils sont par définition tous identiques et produits par un seul clone de plasmocyte. La production d'anticorps monoclonaux in vitro a longtemps été rendue

difficile en raison de la faible durée de vie des plasmocytes. Les anticorps étaient alors obtenus *in vivo* en injectant chez l'animal un antigène donné et en recueillant les anticorps dans le sang.

- **Témoin négatif** : le guide de bonne exécution des analyses (GBEA) impose l'utilisation systématique d'un réactif témoin qui est caractérisé par le diluant du réactif dépourvu de l'Ac. L'objectif de ce réactif témoin est de valider toute réaction positive en l'attribuant à l'action spécifique de l'antiglobuline et non pas à une sensibilisation préalable des hématies par un Ac spontanément agglutinant comme par exemple un Ac actif à +4°C de classe IgM et qui aboutirait à une interprétation erronée de TDA positif mixte alors qu'il est en fait de type uniquement Complément.

5-1-3-Répartition

- **Le volume de répartition** : les volumes de suspension érythrocytaire et de réactif doivent respecter les instructions du fournisseur afin d'assurer un « cell ration » optimal.
- **La séquence de répartition** : en vue d'éviter un oubli de répartition des antiglobulines, il est conseillé de répartir les réactifs en premier afin de vérifier leur présence avant la répartition des suspensions globulaires. De plus, pour faciliter cette vérification, certains fournisseurs ont coloré les réactifs.

5-1-4-Etapes d'incubation : Une incubation préalable est parfois requise et demandée par le fabricant pour sensibiliser les réactions avec certaines antiglobulines anti-C3d, Il faut respecter strictement les instructions.

5-1-5-Centrifugation : Il s'agit d'une opération particulièrement sensible car, insuffisante elle aboutit à un rapprochement non optimal des hématies qui peut être source de faux négatifs et, excessive, elle peut rendre difficile une remise en suspension dont l'intensité peut casser des agglutinats et les rendre invisibles.

5-1-6-Remises en suspension des hématies

Elle doit être douce et réalisée sous les yeux de l'opérateur au-dessus d'un fond blanc.

Cette opération manuelle est source de nombreux faux négatifs.

5-1-7-Lecture et interprétation des réactions

- **Une réaction positive** est caractérisée par la présence d'agglutinats plus ou moins nombreux et de taille variable, allant du gros agglutinat unique et qualifié de ++++ à une image de « sable » au fond du tube, qualifiée (+) et pouvant facilement disparaître en cas de remise en suspension excessive.
- **Une réaction négative** correspond à la remise en suspension totale des hématies dont la cinétique est classiquement décrite en « nuage de fumée ou fumerole » permettant de la différencier d'une remise en suspension par morcellement avec des petits agglutinats transitoires qui doit être considérée comme une réaction positive. En cas de doute sur la positivité d'une réaction, une lecture au microscope permet de différencier d'authentiques agglutinats d'un phénomène de rouleaux caractérisé par un empilement des hématies en « piles d'assiettes » qui se retrouverait d'ailleurs aussi avec le réactif témoin.
- **Une image de double population (DP)** : est caractérisée par la présence d'agglutinats coexistant avec une remise en suspension totale des hématies. En cas de doute, la vérification au microscopique permet de révéler la présence d'agglutinats baignant dans une mer d'hématies libres.

5-1-8-Contrôle du système analytique

- **Le contrôle interne de qualité (CIQ)** : la réglementation impose la mise en œuvre de CIQ au moins une fois par jour. En ce qui concerne le TDA, il repose sur l'analyse, dans les mêmes conditions techniques, de 2 échantillons d'hématies sensibilisées respectivement par un anticorps IgG et par des fractions C3d du Complément.

- **Le contrôle de l'étape de lavage des hématies** : chaque réaction négative devrait être contrôlée avec des hématies de contrôle sensibilisées qui, en donnant une réaction positive, permettent d'éliminer le faux négatif dû à un oubli de répartition des antiglobulines ou à l'inhibition de celles-ci par un mauvais lavage des hématies[52].

5-2 Technique sur gel

Cette technique est à l'heure actuelle la plus répandue, autant en technique manuelle, que par les appareils automatisés. Cette technique nécessite l'utilisation d'une cassette constituée d'une micro-cupule surmontant une colonne de filtration. Cette colonne de filtration contient des micro-billes ou du gel et de l'antiglobuline (soit IgG, soit C3d).

Après avoir mis les globules rouges du patient dans la cupule, la cassette est centrifugée. Lors de cette centrifugation, les globules rouges sont dirigés au fond de la colonne de filtration. Pendant cette phase de migration, l'antiglobuline va se fixer sur les hématies sensibilisées. Les hématies ayant fixé l'antiglobuline seront bloquées par les billes ou le gel. Elles ne vont donc pas atteindre le fond de la colonne. Ces cassettes possèdent également un témoin réactif (contrôle) qui doit être négatif pour pouvoir interpréter les résultats.

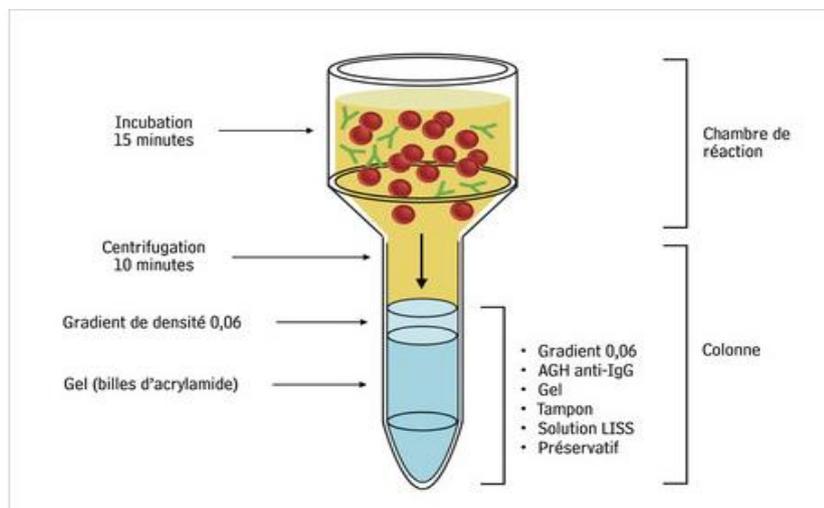


Figure 20: Représentation schématique d'un microtube [53].

5-2-1-Préparation des hématies

- **Les lavages** : sont inutiles pour les techniques de filtration. Elles utilisent, en effet, la centrifugation comme procédé mécanique pour extraire les hématies qui, par gravité différentielle arriveront les premières au contact des antiglobulines. Cette approche technologique, associée à un excès d'antiglobuline, évite tout risque d'inhibition des antiglobulines, même en absence de lavage.
- **La mise en suspension** : classiquement, en filtration, une suspension érythrocytaire de l'ordre de 0,8 % est utilisée. Comme pour d'autres techniques, des suspensions inadéquates peuvent être sources de faux négatifs.

5-2-2-Réactifs

Les antiglobulines : les deux antiglobulines monospécifiques anti-IgG et anti-C3d imposées par la réglementation sont pré-distribuées dans les colonnes ainsi qu'un réactif témoin. Il existe, notamment pour le TDA chez le N-né, des supports avec uniquement de l'anti-IgG.

5-2-3-Lecture et interprétation des résultats

- Une réaction positive est caractérisée par la présence d'agglutinats piégés dans la colonne. L'intensité des réactions repose sur le niveau de blocage des hématies dans la colonne qui peut aller d'un arrêt total qualifié de 4+ à des hématies dispersées sur toute la hauteur de la colonne pour les réactions faibles.
- Une réaction négative est caractérisée par le rassemblement de toutes les hématies au bas de la colonne car celles-ci, non agglutinées, l'ont traversée sans s'y arrêter.

- Une image de DP est caractérisée par la présence d'agglutinats plus ou moins dispersés dans la colonne avec une proportion significative d'hématies situées au bas de la colonne. Ces réactions sont à distinguer de réactions faibles qui peuvent parfois laisser totalement passer des hématies faiblement sensibilisées. En cas de doute, la réalisation d'un test direct en tube avec contrôle microscopique permettra, dans la majorité des cas, de lever l'ambiguïté [54].

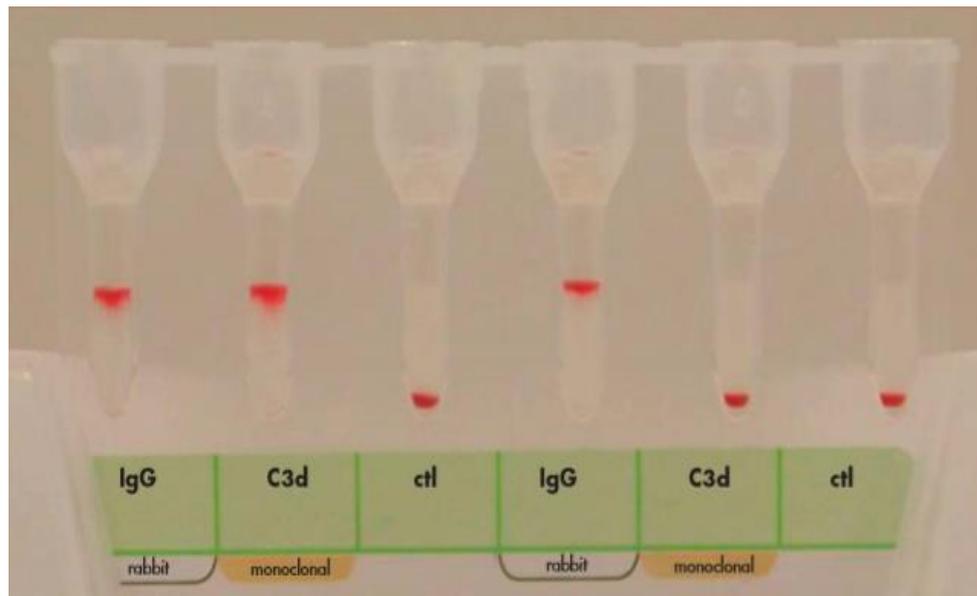


Figure 21 : Exemples de revêtements érythrocytaires par des IgG et C3d ou par des IgG[55].

5-3 Autres techniques

Il est également possible de réaliser un TDA en microplaque, soit par immuno-adhérence, soit par magnétisation des hématies.

5-3-1- La technique d'immunocapture

La sensibilisation des hématies, qui sont fixées au fond du puits, est détectée par l'utilisation d'hématies révélatrices sur lesquelles est fixée une antiglobuline. Le dépôt des hématies révélatrices en deuxième monocouche donnant une image homogène de l'ensemble du puits correspond à une réaction positive, témoin de la sensibilisation in vivo des hématies. L'obtention d'une image en cible avec une concentration centrale des hématies révélatrices correspond à une image négative.

5-3-2- La technique d'immunoadhérence en microplaque

Les hématies du patient sont magnétisées extemporanément par la mise en suspension dans une solution magnétisante puis réparties dans le puits dans lequel est fixée l'antiglobuline. La microplaque est ensuite placée sur un aimant qui, attirant les hématies vers le fond du puits, se substitue à la centrifugation. Si les hématies sont sensibilisées, elles se fixent sous forme d'une monocouche homogène sur l'ensemble du puits. En absence de sensibilisation, elles se concentrent dans le centre du puits comme dans la technique d'immunocapture [56].

6-Indications du TCD

- La recherche d'une incompatibilité fœto-maternelle à l'origine d'une maladie hémolytique du nourrisson.
- Le bilan de certaines anémies :
 - Les anémies hémolytiques auto-immunes.
 - Les anémies hémolytiques suite à certaines infections virales.
- Après une transfusion sanguine (incompatibilité de groupes sanguins).
- La prise de certains médicaments.
- La maladie des agglutinines froides.
- Des syndromes lymphoprolifératifs (myélomes)[57].

7-La positivité d'un TCD

La positivité d'un TCD est le témoin de la sensibilisation des hématies in vivo. Pour que la réaction puisse être possible, il faut au minimum 200 molécules d'Ig ou de C3d sur l'hématie. Mais cela ne correspond pas forcément à une hémolyse ou une anémie chez le patient. Inversement, un TDA négatif ne signifie pas l'absence d'hémolyse à la suite d'un conflit immunologique.

- ✓ **TCD positif avec de l'anti-IgG** : Le TCD avec de l'anti-IgG permet de mettre en évidence une sensibilisation (complexe immunitaire anticorps-antigène) des érythrocytes par un anticorps de classe IgG. La mise en évidence de ce complexe immunitaire est très importante lors de la recherche d'une MHN, et lors d'un problème suite à une transfusion sanguine de globules rouges.

- ✓ **TCD positif avec de l'anti-C3d** : le TCD avec de l'anti-C3d (anti-complément) permet de mettre en évidence une sensibilisation (complexe immunitaire anticorps-Antigène) des globules rouges par un anticorps de classe IgM ou IgG ayant activé le complément.

- ✓ **TCD dit mixte** : lorsqu'il y a une réaction positive des réactifs anti-IgG et anti-C3d avec les hématies du patient. Cette double réactivité met en évidence la présence d'anticorps de type IgG. Ces IgG ont la capacité d'activer le complément ce qui induit une réaction positive avec l'anti-complément [56].

8-Sensibilité et limites

8-1-Faux positifs

- La positivité du test de Coombs peut s'observer en dehors d'une hémolyse auto-immune, particulièrement après transfusion sanguine, à la suite d'injection de produits thérapeutiques d'origine humaine ou animale.
- Il est exceptionnel d'observer un test de Coombs positif en l'absence d'hémolyse auto-immune bien que la présence d'IgG ou de certaines fractions du C ait pu être décrite chez les sujets normaux.
- Un test de Coombs direct positif ne signifie pas obligatoirement AHAI (nombreux faux positifs.) peut notamment s'observer en cas d'adsorption non spécifique d'Ig dans diverses circonstances (hypergammaglobulinémie polyclonale, autre MAI, suites de l'administration d'Ig polyvalentes, myélome...)...) ou encore en cas d'anémie hémolytique de mécanisme immunologique induite par un médicament.

8-2-Faux négatifs

A l'inverse, le TDA peut être faussement négatif dans d'authentiques AHAI (~ 5 % des AHAI) :

- Lorsque les auto-anticorps sont présents en quantité trop faible (< 150-200 par GR)
- Lorsque l'affinité de l'auto-anticorps est faible et que celui-ci est éliminé lors du lavage des GR.

En raison d'un problème et/ou d'une erreur technique : lavage insuffisant des GR, test réalisé sur échantillon de sang non fraîchement prélevé (qui peut induire surtout une fixation isolée de C3).

- Lorsqu'il s'agit d'un AC de type IgA, ce qui est le cas dans environ 2 à 3 % des AHAI [19-75]. Ce qui explique la nécessité de demander systématiquement un TDA avec une antiglobuline anti-IgA lorsque le test est négatif en IgG et C3 .

Le diagnostic d'AHAI à TDA négatif stricto sensu ne peut donc être retenu qu'après avoir exclu les autres causes d'anémies hémolytiques constitutionnelles ou acquises, pouvant se révéler à l'âge adulte et doit être remis en question en l'absence de réponse à une corticothérapie[22].

PARTIE

PRATIQUE

1-Rappel des objectifs :**1-1-Objectif principal**

Evaluation de deux techniques diagnostiques de l'hémolyse, test direct à l'antiglobuline sur carte gel et sur tube.

1-2-objectifs secondaires

1-Décrire les caractéristiques sociodémographiques de la population d'étude.

2-Décrire les caractéristiques cliniques et biologiques de l'hémolyse.

3-Déterminer les avantages et les inconvénients de chaque technique.

4-Etablir des recommandations concernant les deux techniques.

2-Matériels et méthodes**2-1-Type d'étude**

Il s'agit d'une étude transversale descriptive.

2-2-Lieu d'étude

Cette étude est menée au niveau du service d'hémobiologie, unité d'immunohématologie de CHU de Tizi-Ouzou.

2-3-Population d'étude

Patients hospitalisés au niveau du CHU Tizi-Ouzou, ayant nécessité un test de coombs direct.

2-4-Période d'étude

L'étude a été réalisée sur une période de 5 mois (du 1^{er} Décembre 2018 au 31 Avril 2019).

2-5-Moyens

2-5-1 Moyens humains

Le suivi de l'encadrement est assuré par une maitre assistante en hématologie (promotrice).

L'analyse des données est assurée par une résidente en épidémiologie et médecine préventive (co-promotrice).

2-5-2- Moyens matériels

-Centrifugeuse de paillasse ;

-Micropipettes à volumes variables de 0 à 1000µl ;

-Tubes secs ;

-Portoirs ;

-Centrifugeuse (ID centrifuge) et incubateur pour cartes gel à 37C°;

-Cartes gel ;

-Embouts jaunes et bleus ;

-Eau physiologique à 37 C°;

-ID- Diluant2 [annexe I];

-Gants ;

-Microscope optique ;

-Lames et lamelles ;

-Une fiche de renseignement [annexe III].

-Du papier ;

- Trois ordinateurs.

2-5-3- Réactifs

-L'antiglobuline humaine AGH [annexe IV] ;

-Anticorps anti-D type IgG [annexe V].

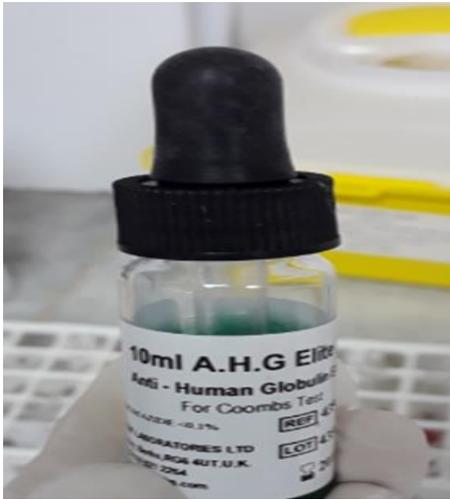


Figure 22 : Antiglobuline humaine polyvalente. **Figure 23 :** Anticorps anti-D type IgG

-ID- Diluant 2 [annexe I].

-Anticorps anti-IgG[annexe VI]

-Anticorps anti-C3d [annexe VII].



Figure 24 : Anticorps anti-C3d.

Figure 25: Anticorps anti-IgG.

2-6-Méthodes**2-6-1-Phase pré-analytique****2-6-1-1-Fiche de renseignement (voir annexe III)**

Cette étude est menée à l'aide d'une fiche de renseignement préétablie à partir des objectifs fixés.

Cette fiche comporte des informations qui concernent le patient : nom, prénom, âge, sexe, service, groupe sanguin, rhésus, phénotype, TCD sur tube ,TCD sur carte gel, TCD sur microscope, nombre de grossesse, recherche des agglutinines irrégulières(RAI) , antécédents transfusionnels, antécédents pathologiques, motif d'hospitalisation, signes cliniques d'hémolyses examens biologiques (FNS, LDH, haptoglobine, bilirubine totale, bilirubine direct, ferritine, taux de réticulocytes, frottis sanguin).

2-6-1-2-Prélèvement

Le prélèvement s'effectue au lit du malade par un(e) infirmier(e) après avoir vérifié la prescription médicale et la concordance entre celle-ci et le choix des tubes d'analyses.

Le prélèvement est réalisé dans le respect rigoureux des règles d'asepsie et se fait par ponction veineuse franche sur tube contenant EDTA ou citrate trisodique 0.105 ou 0.109M.

2-6-1-3-Circuits des échantillons

Les échantillons sont acheminés au laboratoire d'hémodiagnostic par des infirmiers.

2-6-1-4-Conservation et transport

Le prélèvement est acheminé au laboratoire en vue d'être analysé le plus tôt possible ou conservé dans un délai maximal de 48 heures à +4-8C° après le prélèvement.

2-6-1-5-Centrifugation

Tous les échantillons ont subi une centrifugation à 4000 tours/min pendant 3 min avant d'être analysés.

2-7-Phase analytique**2-7-1-Technique en tube**

-Lavage des hématies à tester à l'eau physiologique 4 à 6 fois.

-Préparation d'une suspension d'hématies à 5% avec le diluant (on dépose 475 µl de diluant dans un tube à hémolyse, on lui ajoute 25 µl du culot globulaire).

-Déposer une goutte (50µl) de la suspension préparée dans un tube sec, puis on lui rajoute deux gouttes (100 µl) de l'AGH.

-Mélanger et centrifuger à 4000 T/min pendant 1 minute.

-Lire l'agglutination en décollant doucement la pastille d'hématies au fond du tube.

- Si c'est positif sur tube on précise l'intensité de la réaction en croix.
 - Si c'est négatif, incuber à température de laboratoire pendant 5 minutes, recentrifuger et lire de nouveau.
 - Si toujours négatifs en tube on fait la lecture au microscope à l'objectif 40 ou 100.
- Pour valider la technique il faut toujours effectuer des témoins positifs et négatifs.

Témoin positif : -Dans un tube à hémolyse on dépose 50µl de GR sensibilisés +100 µl d'AGH.

Témoin négatif :

-Dans un tube à hémolyse on dépose 50µl de sang à tester +100 µl d'eau physiologique.

Lecture :

- Si présence d'agglutinants d'hématies : TCD positif.
Refaire le TCD avec l'antiglobuline spécifique :
-1 goutte de suspension GR patient +1 goutte d'anti IgG.

-1 goutte de suspension GR patient + 1 goutte d'anti-complément (anti-C3d) :Si réaction :

- IgG + et complément + : TCD positif type IgG + complément.
- IgG – et complément + : TCD positif type complément.
- IgG + et complément - : TCD positif type IgG.

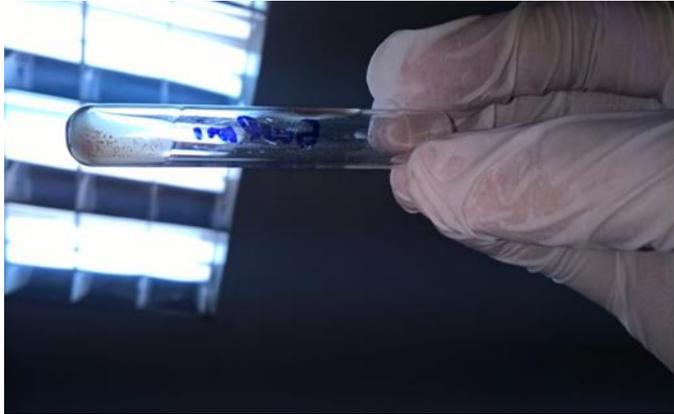


Figure 26 : Test de coombs positif en tube.

- Si absence d'agglutinants d'hématies : TCD négatif.

2-7-2-Lecture au microscope optique

Ajouter à 50µl de GR du patient lavés 6 fois à l'eau physiologique, 2à 3 gouttes de l'antiglobuline AGH au fond du tube sur les hématies. Bien mélanger.

Centrifuger à 1000 tours/min pendant une minute.

Après centrifugation, bien mélanger et déposer directement à l'aide d'une pipette une à deux gouttes du mélange entre lame et lamelles.

Déposer la lame sur la platine du microscope et la fixer avec les valets et passer à l'observation.

Lecture :

- Si présence d'agglutinant d'hématies : TCD positif.
- Si absence d'agglutinant d'hématies : TCD négatif.



Figure 27 :Test de coombs positif sur microscope.

2-7-3-Technique sur gel

-Ramener l'ID-Diluant2 à température ambiante avant utilisation.

-Préparation d'une suspension d'hématies à 5% (on dépose 475 μ l de diluant dans un tube à hémolyse, on lui rajoute 25 μ l du culot globulaire).

-Mettre 10 μ l de cette suspension dans les trois premiers puits de la carte gel (dans le puits anti IgG, anti C3d et celui du contrôle).

-Centrifuger la carte gel pendant 15 minutes.

-Faire la lecture en précisant l'intensité des réactions positives en croix.

Lecture :

- Réaction positive : les hématies agglutinées forment une ligne rouge à la surface du gel ou sont dispersées dans le gel.
- Réaction négative : sédimentation complète des hématies au fond du microtube.

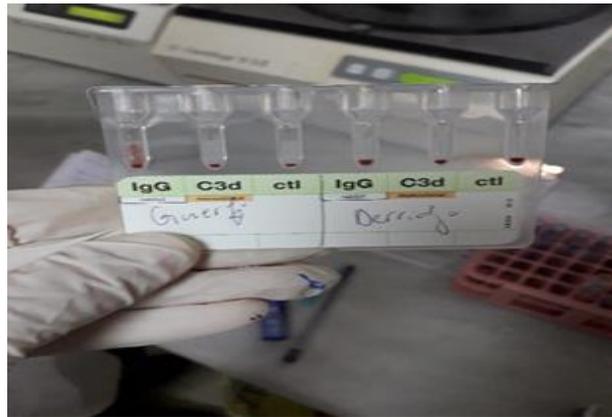


Figure 28 :Test de coombs positif sur carte gel.

2-7-4-Etude comparative de la sensibilité du test de Coombs direct entre la technique en tube et en gel sur des hématies tests sensibilisés in vitro.

2-7-4-1-Introduction

L'étude suscite à une sensibilisation des hématies O +. Notre étude a ainsi consisté en une comparaison de la sensibilité de 2 supports de réaction : tube et gel. Pour cela, nous avons sensibilisé des hématies O positives par des Ac du type IgG (Anti-D), sur lesquelles, nous avons effectué un test de coombs direct spécifique IgG en tube et en gel.

2-7-4-2-Préparation des hématies tests

La préparation a été réalisée à partir d'échantillons de sang de groupe O positifs de donneurs sains, après centrifugation du sang total (4000 tours/min pendant 3 min), pour permettre d'enlever le plasma qui pourrait masquer une réponse positive ainsi que la couche leucocytaire à la surface des hématies. Trois étapes de lavage des GR (2500 à 3000 μ l du culot globulaire sont nécessaires) à l'eau physiologique sont effectuées et la dernière eau de lavage est décantée complètement. Les échantillons présentant des signes d'hémolyses après ces étapes doivent être éliminés.

2-7-4-3-Dilutions de l'anti-D type IgG



Figure 29 : l'ID-diluant.



Figure 30: l'anti-D type IgG.

La dilution en cascade de l'anti-D type IgG permet d'obtenir des suspensions de concentration régulièrement décroissante.

Préparer un tube à essai contenant 400 μl de l'anti-D et 10 tubes contenant 200 μl du D-diluant pour chacun. Ces tubes serviront à faire les dilutions successives.

Avant de démarrer les dilutions, étiqueter à l'avance les tubes à essai pour éviter par la suite toute confusion.

Réaliser une série de dilution au $\frac{1}{2}$: la méthode consiste à prélever un échantillon (200 μl) de la solution du départ (le tube contenant l'anti-D) et la transférer dans le tube suivant (contenant 200 μl du D-diluant et étiqueté $\frac{1}{2}$) pour obtenir la dilution $\frac{1}{2}$, puis prendre un échantillon de ce tube (200 μl) pour le mettre dans le suivant (le tube étiqueté $\frac{1}{4}$) pour obtenir la dilution $\frac{1}{4}$, suivre la même méthode jusqu'à l'obtention d'une dilution $\frac{1}{1024}$ (le tube étiqueté $\frac{1}{1024}$).

Vers la fin on obtient les dilutions suivantes : (1/2,1/4,1/8,1/16,1/32 ,1/64,1/128,1/256 ,1/512 ,1/1024).

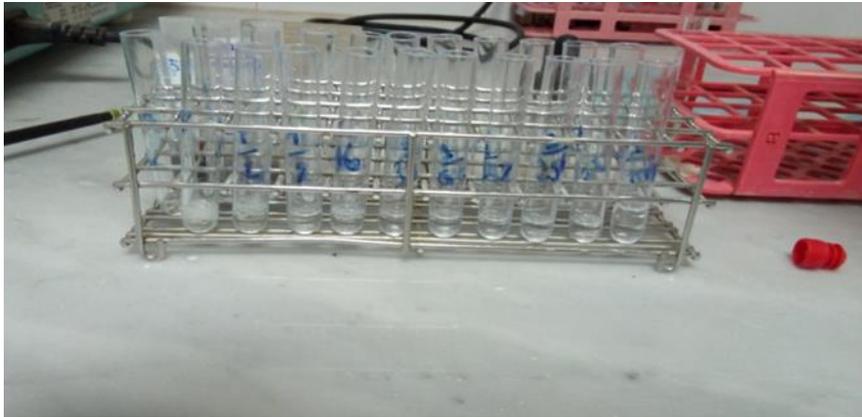


Figure 31 : dilutions en série de l'anti-D.

2-7-4-4-Sensibilisation des hématies

Préparer 10 tubes à essai, chacun contient 200 μ l de GR lavés précédemment. Il est souhaitable d'étiqueter à l'avance les tubes à essai pour éviter par la suite toute confusion.

Ajouter à chaque tube contenant 200 μ l du GR, 600 μ l de chaque dilution de l'anti-D préparée précédemment.

Incuber les tubes 1 heure à 37 degrés C °.

Après incubation, laver 3 fois à l'eau physiologique et décanter complètement la dernière eau de lavage pour éliminer les anticorps qui ne sont pas fixés.

2-7-4-5-Réalisation du TCD

Effectuer un test de coombs directe sur carte gel et sur tube pour chaque tube de GR incubé précédemment.

2-7-4-6-Lecture

a-Sur carte gel

- Une réaction positive est caractérisée par la présence d'agglutinats piégés dans le gel. L'intensité des réactions repose sur le niveau de blocage des hématies dans la colonne qui peut aller d'un arrêt total qualifié de ++++ à des hématies dispersées sur toute la hauteur du gel pour les réactions faibles.
- Une réaction négative est caractérisée par le rassemblement de toutes les hématies au bas de la carte gel car celles-ci, non agglutinées, l'ont traversée sans s'y arrêter.

b-Sur tube

- Une réaction positive est caractérisée par la présence d'agglutinats, allant du gros agglutinats unique et qualifié de ++++ à une image de « sable » au fond du tube, qualifiée +.
- Une réaction négative correspond à la remise en suspension totale des hématies. En cas de doute sur la positivité d'une réaction, une lecture au microscope permet de confirmer le diagnostic.

2-8-Recueil des données

Après avoir effectué le TDA sur les 3 techniques et avoir rendu les résultats, nous nous sommes déplacées aux différents services, pour consulter les dossiers des patients et compléter notre fiche de collecte préétablie.

2-9-Plan d'analyse**➤ Traitement et analyse des données**

La saisie et l'analyse des données ont été effectuées sur le logiciel SPSS IBM statistics 22 et le logiciel Microsoft Excel 2007.

Des effectifs et des pourcentages ont été calculés pour les variables qualitatives et des moyennes avec leurs écarts type pour les variables quantitatives.

Les tests statistiques utilisés sont :

-Le test de Khi deux de Pearson pour comparaison de pourcentages et test de khi deux de Mc Nemar pour comparaison de deux pourcentages sur série appariée.

Le seuil de signification a été fixé à 0.05 pour conclure à une différence significative entre les variables comparées.

Sensibilité : c'est la probabilité d'avoir un test positif quand on est malade, c'est donc la proportion des vrais positifs.

Résultats

1-Description de la population d'étude

1-Répartition selon le sexe

Dans notre étude, 55% de la population est de sexe féminin avec un sexe ratio de 0,83. (Tableau 3, Figure 32).

Tableau 3 : Répartition de la population d'étude selon le sexe, CHU Tizi-Ouzou, Décembre 2018, Avril 2019.

Sexe	Effectif	%
Masculin	57	45
Féminin	69	55
Total	126	100

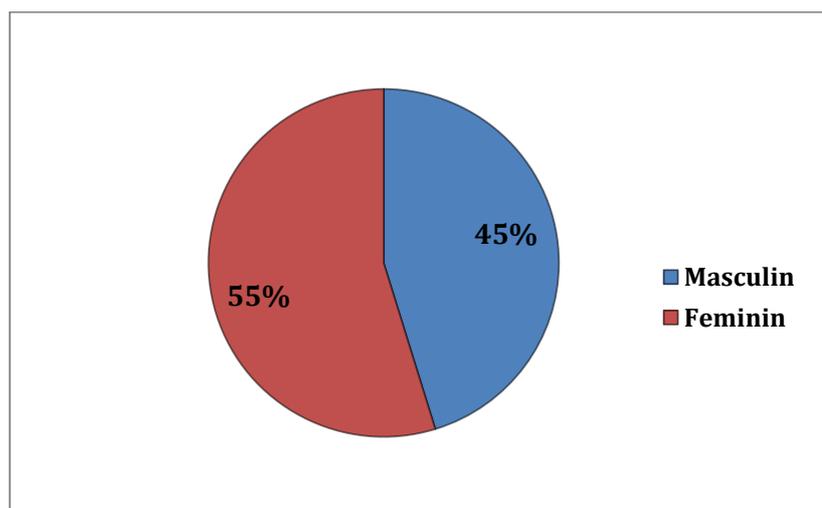


Figure 32 : Répartition de la population d'étude selon le sexe, CHU Tizi-Ouzou, Décembre 2018-Avril 2019.

1-2-Répartition selon l'âge

L'âge moyen de la population est de 34,12 ans avec un écart type de 31,16 ans, avec un minimum de 01 jour et un maximum de 84 ans.

- **La moyenne d'âge selon le sexe**

L'âge moyen de la population masculine est de : 32,53 avec un écart type de 29,39.

L'âge moyen de la population féminine est de : 35,57 avec un écart type de 32,96.

(Figure 33)

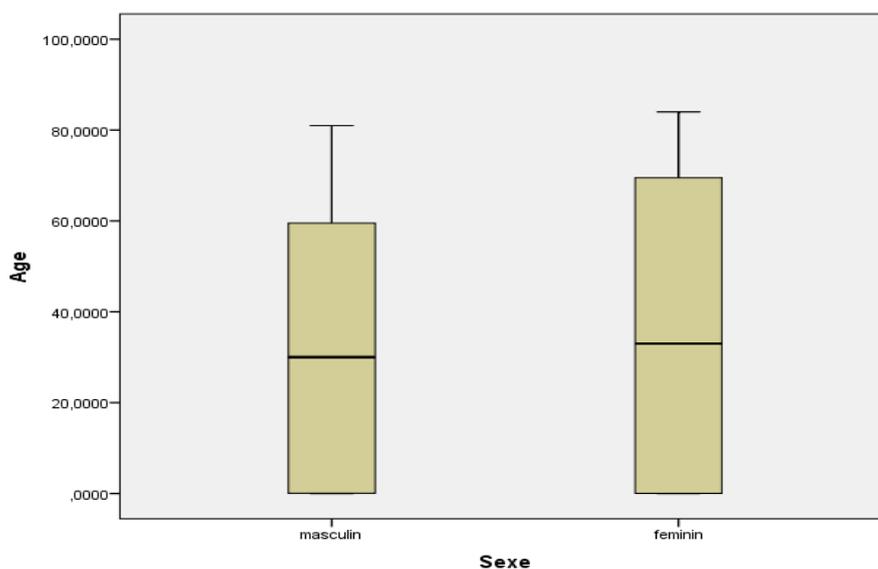


Figure 33 : Répartition de la population d'étude selon la moyenne d'âge, CHU Tizi-Ouzou, Décembre 2018-Avril 2019.

- Selon les tranches d'âge

La population qui présente un âge plus de 13 ans est de 61% des cas. (Tableau 4, Figure 34)

Tableau 4 : Répartition de la population d'étude selon les tranches d'âge, CHU Tizi-Ouzou, Décembre 2018-Avril 2019(selon l'OMS).

	Effectif	%
[1j-28j]	26	31,7
[29j- 2ans]	3	4,9
[3ans -12ans]	1	2,4
>13	50	61,0
Total	80	100,0

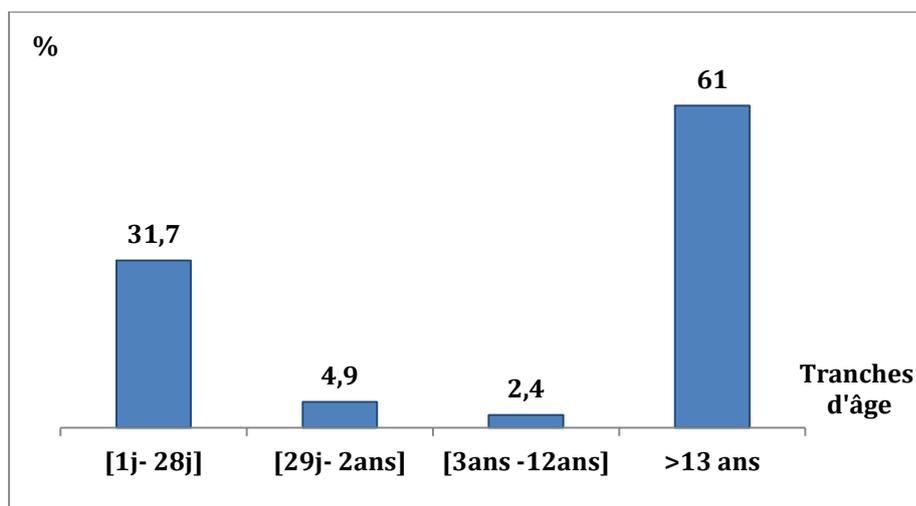


Figure 34 : Répartition de la population d'étude selon les tranches d'âge, CHU Tizi-Ouzou, Décembre 2018-Avril 2019.

1-3-Répartition selon le service

Les résultats montrent que 41,3 % des patients ayant nécessité un TCD sont hospitalisés au niveau de service d'hématologie suivi de service néonatalogie 21,4% et de pédiatrie 15,9%. (Tableau 5, Figure 35).

Tableau 5 : Répartition de la population d'étude selon le service, CHU Tizi-Ouzou, Décembre 2018-Avril 2019.

Service	Effectif	%
Hématologie	52	41,3
Néonatalogie	27	21,4
Pédiatrie	20	15,9
Médecine interne	11	8,7
Néphrologie	9	7,1
Infectiologie	5	4,0
Gastrologie	1	0,8
Rééducation	1	0,8
Total	126	100

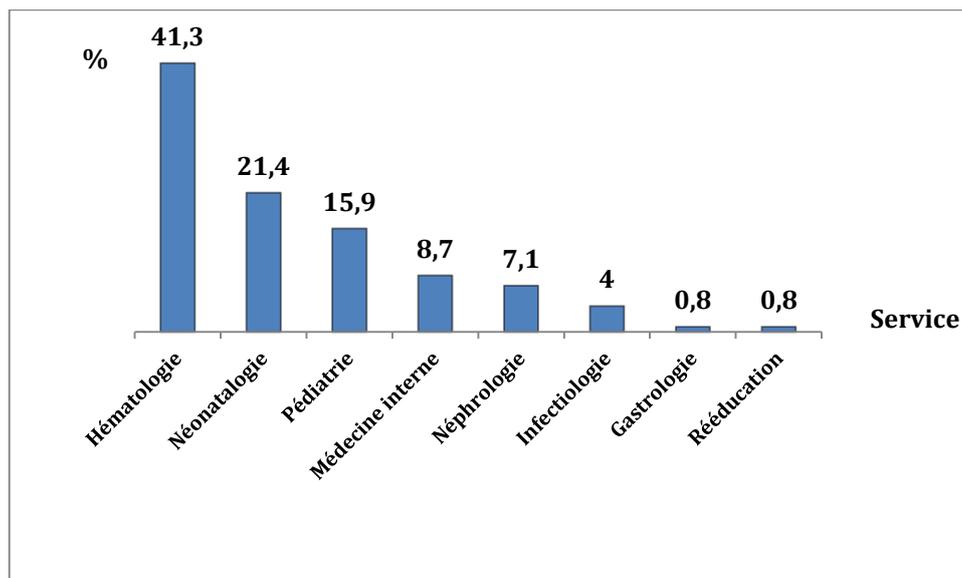


Figure 35 : Répartition de la population d'étude selon le service, CHU Tizi-Ouzou, Décembre 2018-Avril 2019.

1-4- Répartition selon le groupe sanguin ABO

Notre étude montre que 39,2% de la population est de groupe sanguin B, 37,1 % est de groupe sanguin O et 19,6 % est de groupe sanguin A. (Tableau 6, Figure 36)

Tableau 6 : Répartition de la population d'étude selon le groupe sanguin ABO, CHU Tizi-Ouzou, Décembre 2018-Avril 2019.

Groupe sanguin	Effectif	%
B	38	39,2
O	36	37,1
A	19	19,6
AB	4	4,1
Total	97	100,0

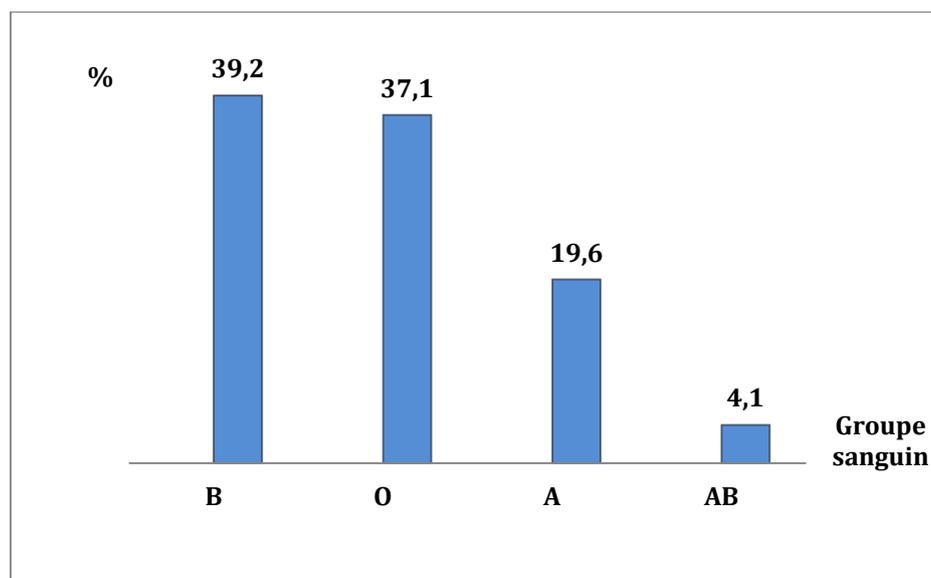


Figure 36 : Répartition de la population d'étude selon le groupe sanguin, CHU Tizi-Ouzou, Décembre 2018-Avril 2019.

1-5-Répartition selon le Rhésus D

La population d'étude est de Rhésus D positif (Rh+) dans 84,5% des cas.

(Tableau 7, Figure 37)

Tableau 7 : Répartition de la population d'étude selon le Rhésus D, CHU Tizi-Ouzou, Décembre 2018-Avril 2019.

	Effectif	Pourcentage(%)
Rh+	82	84,5
Rh-	15	15,5
Total	97	100,0

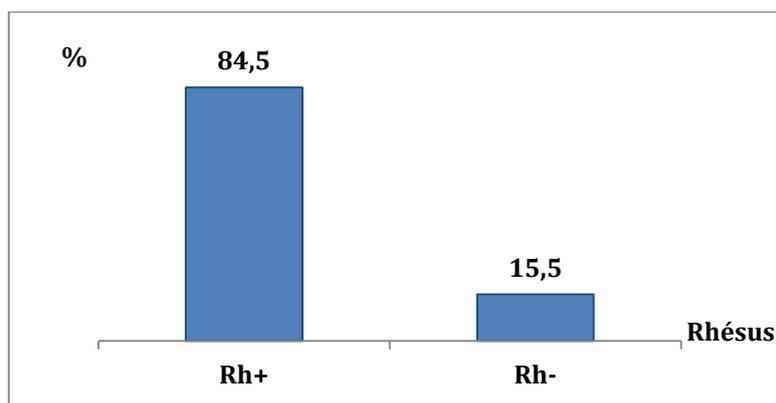


Figure 37 : Répartition de la population d'étude selon le rhésus, CHU Tizi-Ouzou, Décembre 2018-Avril 2019.

1-6-Répartition selon le Phénotype

Les résultats montrent que 30,4% de la population est de phénotype CceeK⁻ et 25,3% est de phénotype CCeeK⁻. (Tableau 8, Figure 38)

Tableau 8 : Répartition de la population d'étude selon le phénotype, CHU Tizi-Ouzou, Décembre 2018-Avril 2019.

	Effectif	%
CceeK ⁻	24	30,4
CCeeK ⁻	20	25,3
cceeK ⁻	17	21,5
CcEeK ⁻	5	6,3
ccEeK ⁻	4	5,1
CceeK ⁺	4	5,1
CCeeK ⁺	3	3,6
ccEeK ⁺	1	1,3
cceeK ⁺	1	1,3
Total	79	100

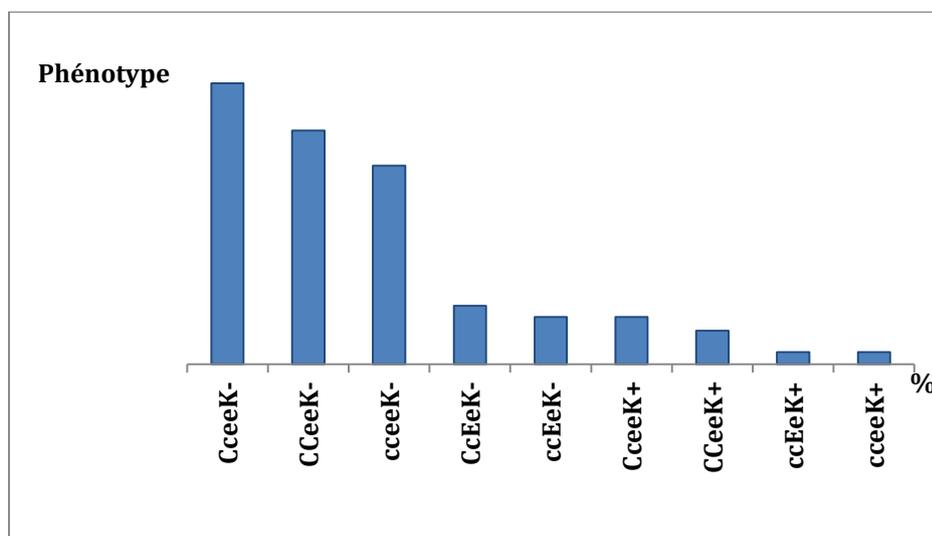


Figure 38 : Répartition de la population d'étude selon le phénotype, CHU Tizi-Ouzou, Décembre 2018-Avril 2019.

1-7-Répartition selon les résultats de la RAI

Les résultats montrent que 9,6% des patients ont une RAI positive, 4,8 % ont une RAI négative. (Tableau 9, Figure 39)

Tableau 9 : Résultats du RAI, CHU Tizi-Ouzou, Décembre 2018-Avril 2019.

	Effectif	%
Positif	8	9,6
Négatif	4	4,8
Indéterminé	71	85,5
Total	83	100

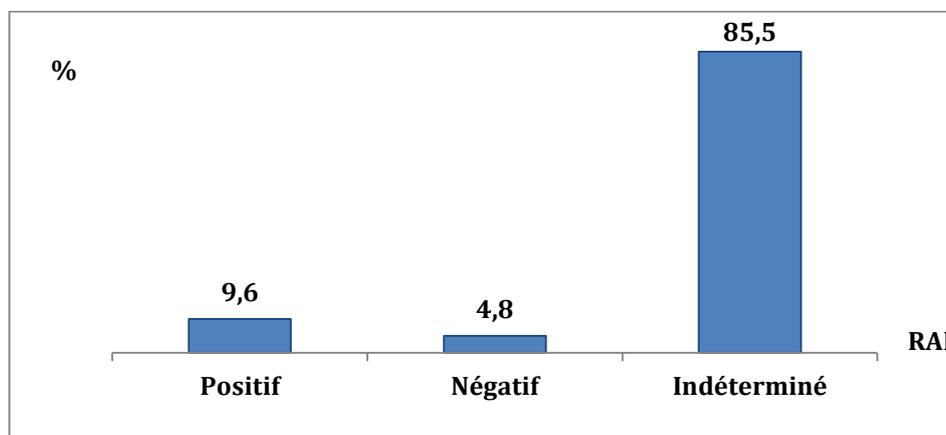


Figure 39 : Résultats du RAI, CHU Tizi-Ouzou, Décembre 2018-Avril 2019.

1-8-Répartition selon les antécédents transfusionnels

Les patients avaient un antécédent transfusionnel dans 30,1% des cas. (Tableau 10, Figure 40)

Tableau 10 : Les antécédents transfusionnels de la population d'étude, CHU Tizi-Ouzou, Décembre 2018-Avril 2019.

	Effectif	%
Oui	25	30,1
Indéterminé	58	69,9
Total	83	100

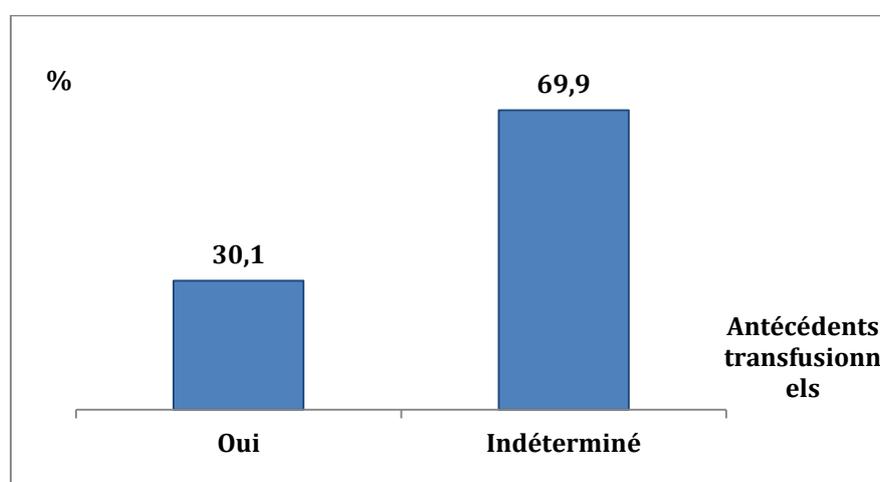


Figure 40 : Les antécédents transfusionnels de la population d'étude, CHU Tizi-Ouzou, Décembre 2018-Avril 2019.

1-9-Répartition selon le nombre de grossesse

Dans notre étude, 01 grossesse est retrouvée dans 45,8% des cas chez les mamans de nouveau né (service néonatal). (Tableau 11, Figure 41)

Tableau 11 : Répartition de la population selon le nombre de grossesse, CHU Tizi-Ouzou, Décembre 2018-Avril 2019.

	Effectif	%
Oui	11	45,8
Non	9	37,5
Indéterminé	4	16,7
Total	24	100

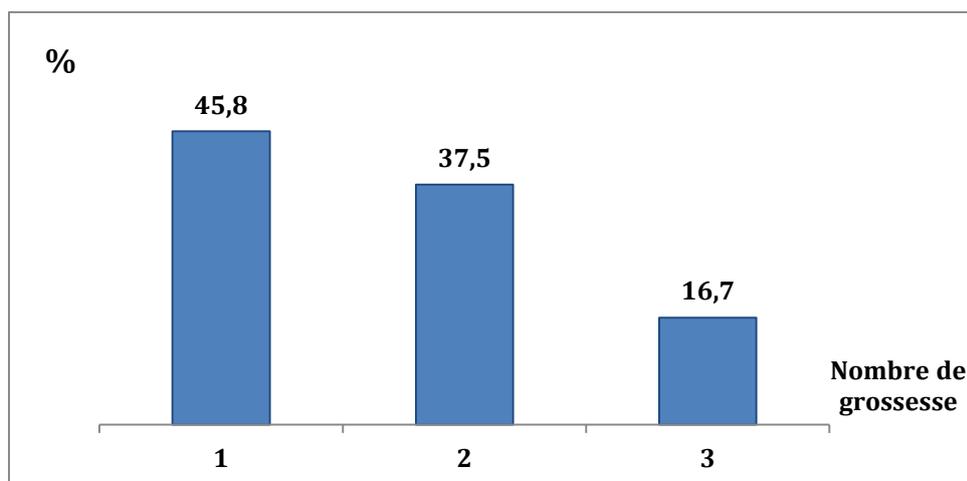


Figure 41 : Répartition de la population d'étude selon le nombre de grossesse, CHU Tizi-Ouzou, Décembre 2018-Avril 2019.

1-10-Répartition selon les antécédents pathologiques

Dans notre étude 37,3 % de la population ont des antécédents pathologiques.

(Tableau 12, Figure 42).

Tableau 12: Répartition de la population selon les antécédents pathologiques, CHU Tizi-Ouzou, Décembre 2018-Avril 2019.

	Effectif	%
Oui	31	37,3
Non	35	42,2
indéterminé	17	20,5
Total	83	100,0

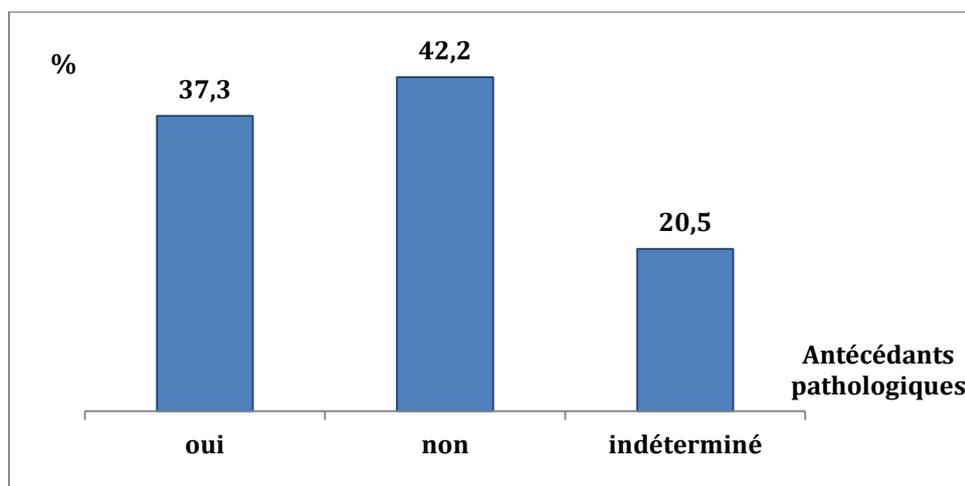


Figure 42 : Répartition de la population selon les antécédents pathologiques, CHU Tizi-Ouzou, Décembre 2018-Avril 2019.

Les antécédents pathologiques retrouvés chez les patients

Le diabète est retrouvé dans 8 % des cas, suivi des cardiopathies dans 4,8 % des cas.
(Tableau 13)

Tableau 13 : Les antécédents pathologiques retrouvés chez les patients, CHU Tizi-Ouzou, Décembre 2018-Avril 2019.

	Effectif	%
Diabète	8	8
Cardiopathie	6	4,8
Dysthyroïdie	5	4,0
Pneumopathie	3	2,4
Insuffisance rénale	4	3,2
Hémoglobinoïse	1	0,8
Paludisme	1	0,8
Purpura thrombopénique	1	0,8
Tuberculose ganglionnaire	2	1,6
Total	31	26,4

1-11-Répartition selon le motif d'hospitalisation

Dans notre étude, 21,4 % des patients ont été hospitalisé pour des hémopathies chroniques et 9,5% pour hémopathies aiguës, 19% ont été hospitalisé pour un ictère cutanéomuqueux. (Tableau14).

Tableau 14 : Répartition de la population selon le motif d'hospitalisation, CHU Tizi-Ouzou, Décembre 2018-Avril 2019.

	Effectif	%
Hémopathie chronique	27	21,4
Hémopathie aigue	12	9,5
Ictère cutanéomuqueux	24	19,0
Anémie	3	2,4
Purpura thrombopénique	3	2,4
Aplasie médullaire	2	1,6
Fièvre persistante	2	1,6
Hémophilie b sévère	2	1,6
Hépatite aigue	2	1,6
Syndrome polymalformatif	1	0,8
Tuberculose pulmonaire	1	0,8
Purpura thrombopénique	1	0,8
Syndrome de chevauchement	1	0,8
pneumopathie	1	0,8
Hémolyse aigue sur G6PD	1	0,8
Total	83	65,9

1-12-Répartition selon la présence des signes cliniques d'hémolyse

Dans notre étude 81,9% de la population d'étude ont des signes cliniques d'hémolyse.

(Tableau 15, Figure 43)

Tableau 15 : Répartition de la population d'étude selon la présence des signes cliniques d'hémolyse, CHU Tizi-Ouzou, Décembre 2018-Avril 2019.

	Effectif	%
Oui	68	81,9
Non	11	13,3
Indéterminé	4	4,8
Total	83	100

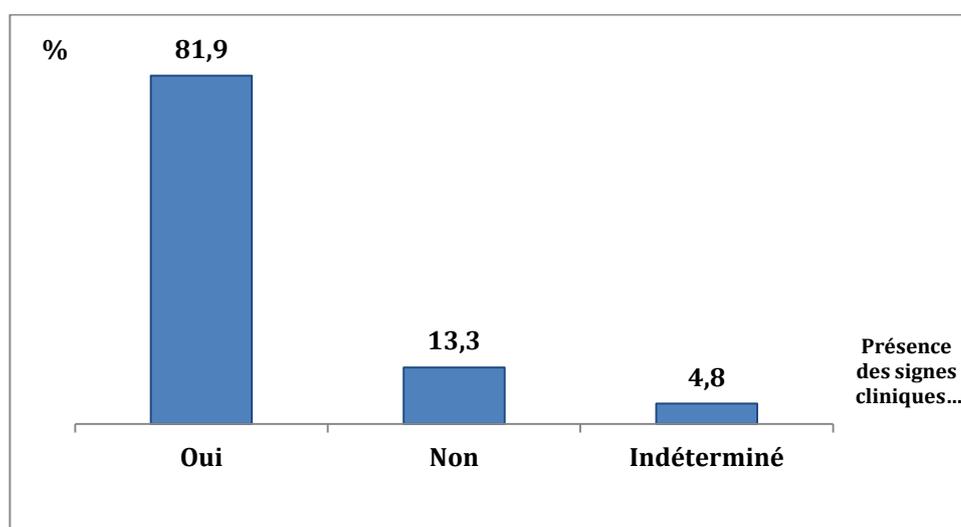


Figure 43 : Répartition de la population selon la présence des signes cliniques d'hémolyse, CHU Tizi-Ouzou, Décembre 2018-Avril 2019.

1-13-Répartition selon les signes cliniques d'hémolyses

- La pâleur cutanéomuqueuse (PCM) est retrouvée dans 71,1 % des cas.
- L'ictère est retrouvé dans 35,4% des cas.
- La splénomégalie est retrouvée dans 6 % des cas. (SPM).
- D'autres signes cliniques d'hémolyse sont retrouvés dans 34,9 % des cas.

(Tableau 16, Figure 44)

Tableau 16 : Répartition de la population selon les signes cliniques d'hémolyse, CHU Tizi-Ouzou, Décembre 2018-Avril 2019.

		Effectif	%
PCM	Oui	59	71,1
	Non	16	19,3
	Indéterminé	8	9,6
Ictère	Oui	29	35,4
	Non	27	32,9
	Indéterminé	27	31,7
SPM	Oui	5	6,0
	Non	33	39,8
	Indéterminé	45	54,2
Autre	Oui	29	34,9
	Indéterminé	54	65,1

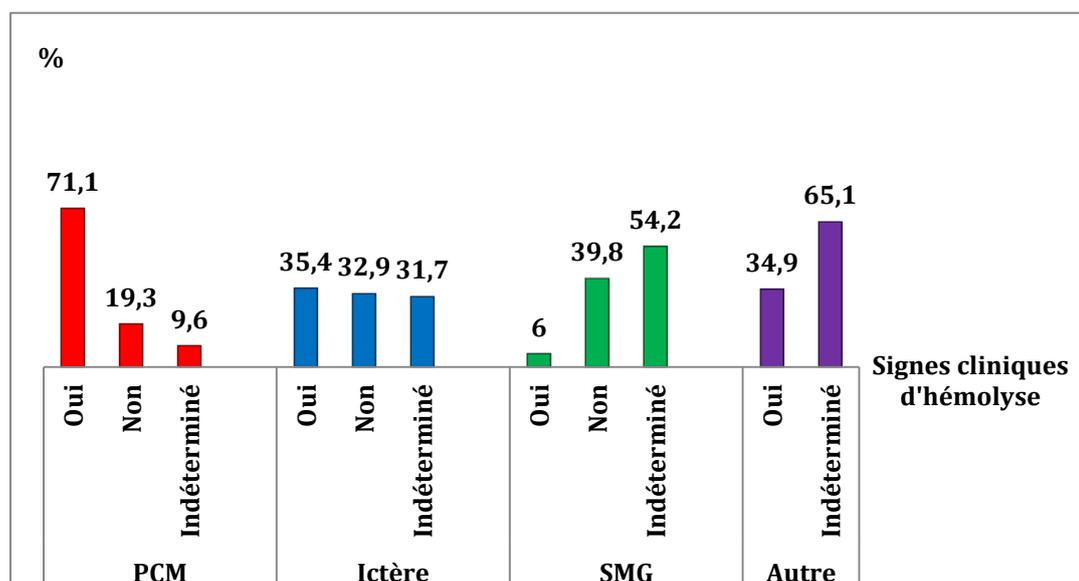


Figure 44 : Répartition de la population selon les signes cliniques d'hémolyse, CHU Tizi-Ouzou, Décembre 2018-Avril 2019.

1-14-Répartition selon les examens biologiques

1-14-1-Selon le taux d'hémoglobine (Hb)

L'Hb est diminuée dans 72,5 % des cas. (Tableau 17, Figure 45)

Tableau 17 : Le Taux de l'hémoglobine chez la population d'étude, CHU Tizi-Ouzou, Décembre 2018-Avril 2019.

Hb	g/dl	Effectif	%
NN	<13,5	12	46,2
	[13,5-19,5]	13	50
	>19,5	1	3,8
	Total	26	100
3mois-2ans	<11	2	66,7
	[11-15]	1	33,3
	Total	3	100
3ans-12ans	<10	1	100
	Total	1	100
Adulte Homme	<13	16	66,7
	[13-18]	7	29,2
	Total	23	100
Adulte Femme	<12	27	100
	Total	27	100
TOTAL		80	100

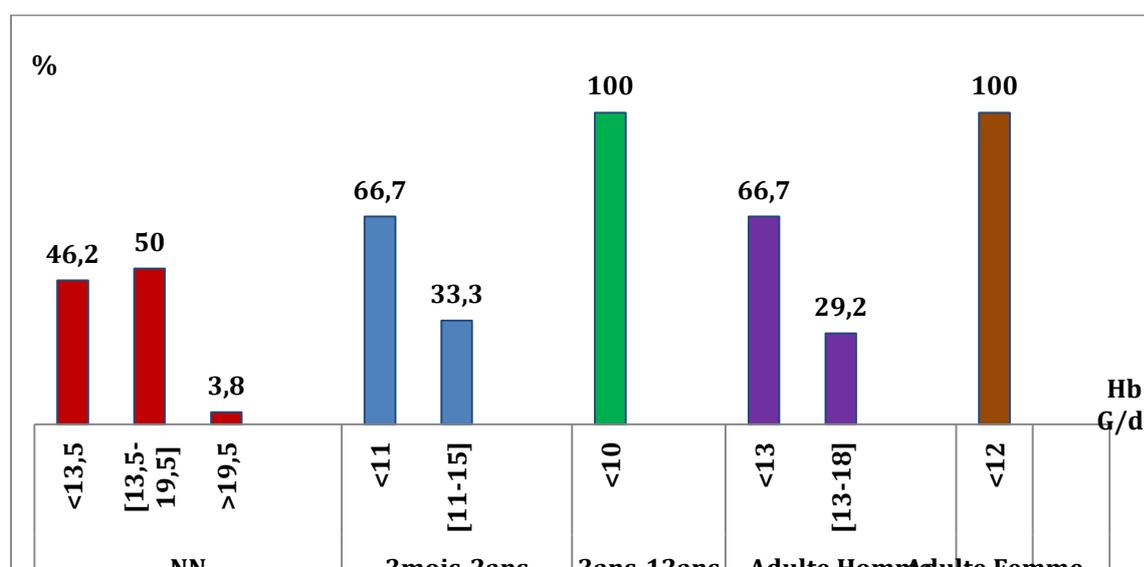


Figure 45 : Le Taux de l'hémoglobine chez la population d'étude, CHU Tizi-Ouzou, Décembre 2018-Avril 2019.

1-14-2-Selon le volume globulaire moyen (VGM)

Il y a une normocytose dans 61,6% des cas. (Tableau 18, Figure 46)

Tableau 18 : Le Taux de VGM chez la population d'étude, CHU Tizi-Ouzou, Décembre 2018-Avril 2019.

VGM		Effectif	%
NN	<98	9	36
	[98-118]	16	64
	Total	25	100,0
3 mois-2ans	<72	1	33,3
	[72-85]	2	66,7
	Total	3	100
3ans-12ans	>83	1	100
	Total	1	100
Adulte	<83	19	38,8
	[83-98]	29	59,2
	>98	1	2,00
	Total	49	100
	TOTAL	78	100

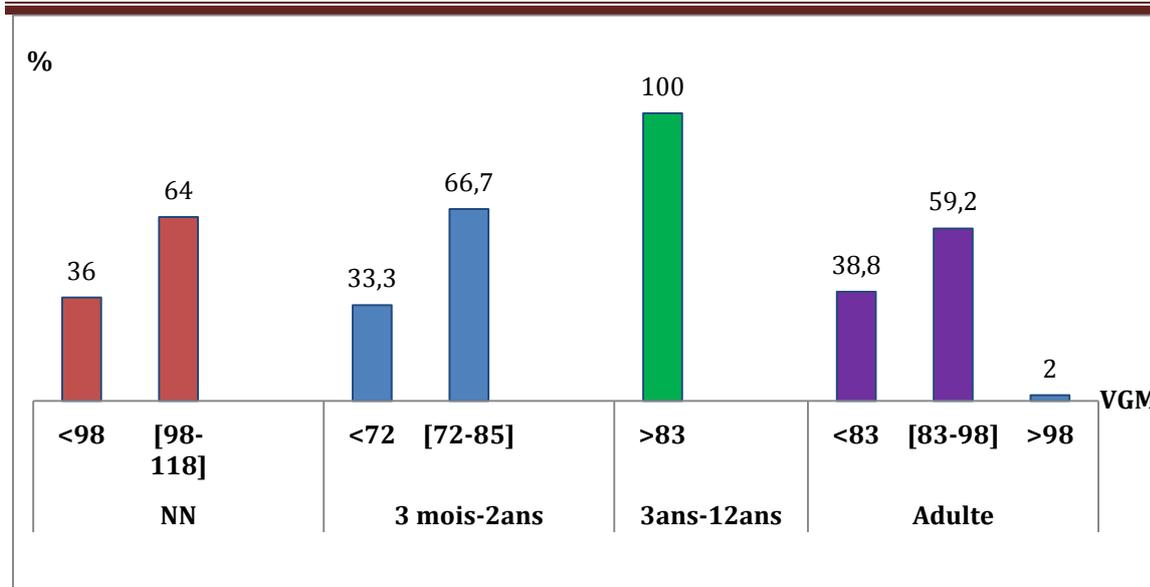


Figure 46 : Le Taux de VGM chez la population d'étude, CHU Tizi-Ouzou Décembre 2018-Avril 2019.

1-14-3-Selon le taux globulaire moyen d'hémoglobine (TGMH)

La normochromie est retrouvée dans 51% des cas. (Tableau 19, Figure47)

Tableau 19 : Le Taux de TGMH chez la population d'étude, CHU Tizi-Ouzou, Décembre 2018-Avril 2019.

TGMH		Effectif	%
NN	<30	5	19,2
	[30-36]	12	46,2
	>36	9	34,6
	Total	26	100
3mois-2ans	<25	2	66,7
	[25-34]	1	33,3
	Total	3	100
3ans-12ans	[24-32]	1	100
	Total	1	100
Adulte	<27	12	24
	[27-32]	38	76
	Total	50	100
TOTAL		80	100

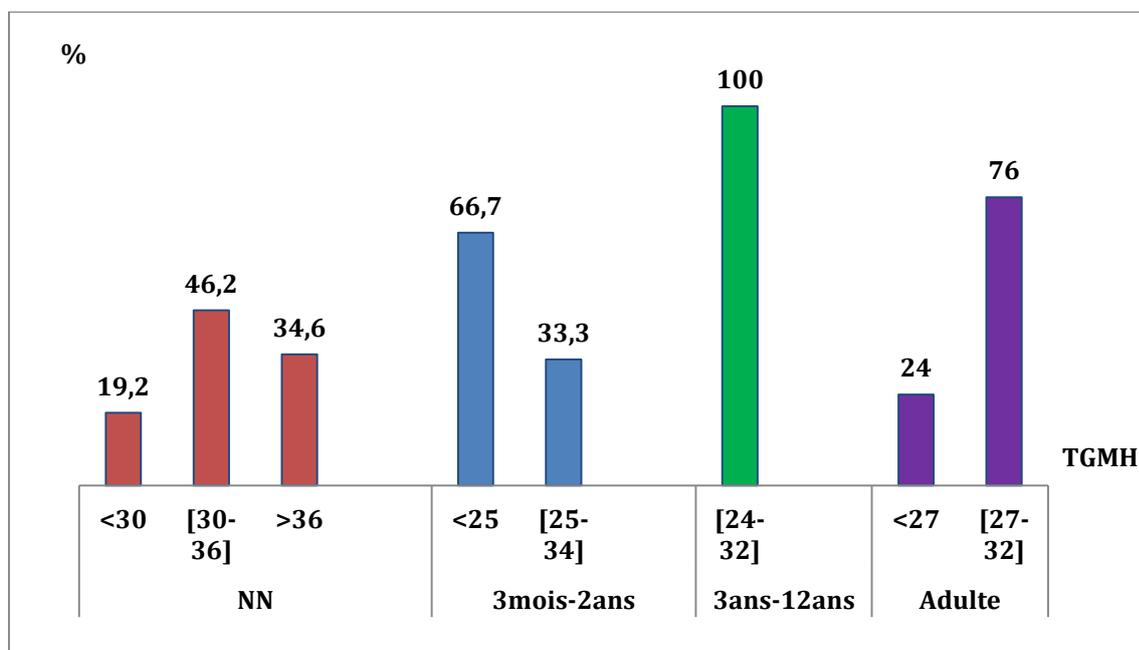


Figure 47 : Le Taux de TGMH chez la population d'étude, CHU Tizi-Ouzou, Décembre 2018-Avril 2019.

1.14.4. Selon La concentration corpusculaire moyenne d'hémoglobine (CCMH)

Il y a une normochromie dans 80% des cas. (Tableau 20, Figure 48)

Tableau 20 : Le Taux de CCMH chez la population d'étude, CHU Tizi-Ouzou, Décembre 2018-Avril 2019.

CCMH	Effectif	%
<32	15	20
[32-36]	63	80
Total	78	100,0

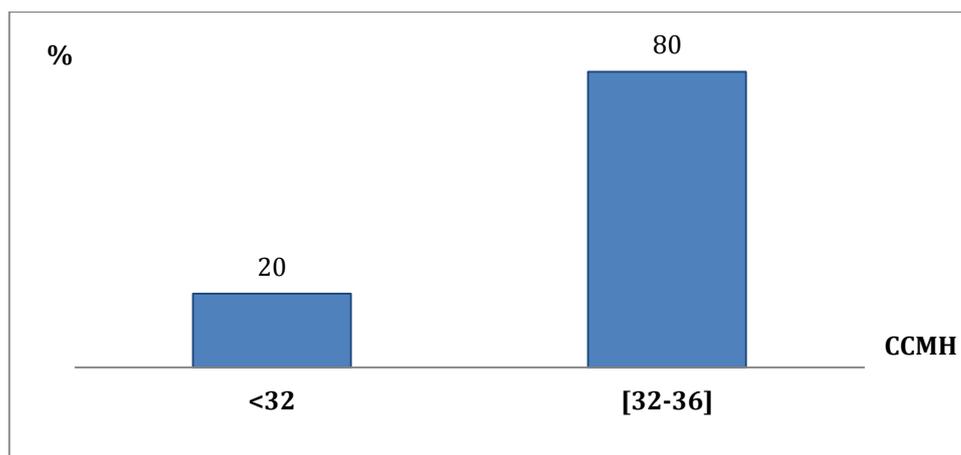


Figure 48 : Le Taux de CCMH chez la population d'étude, CHU Tizi-Ouzou, Décembre 2018-Avril 2019.

1.14.5 Selon le taux de réticulocytes

La totalité de la population a un taux de réticulocyte supérieur à 150000 elts/mm.

(Tableau 21, Figure 49)

Tableau 21 : Le taux de réticulocytes chez la population d'étude, CHU Tizi-Ouzou, Décembre 2018-Avril 2019.

Elts/mm	Effectif	%
>150000	31	100
Total	31	100

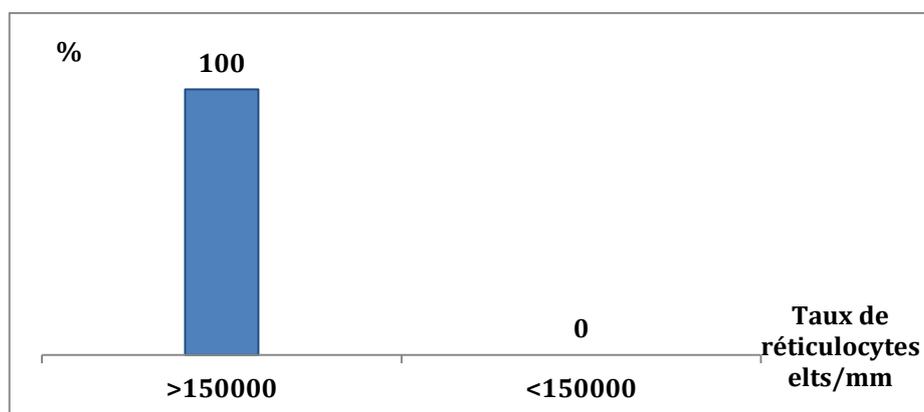


Figure 49 : Le taux de réticulocytes chez la population d'étude, CHU Tizi-Ouzou, Décembre 2018-Avril 2019.

1.14.6. Selon le taux des plaquettes

Il y a une thrombopénie dans 57,9 % des cas. (Tableau 22, Figure 50)

Tableau 22: Le Taux des plaquettes chez la population d'étude, CHU Tizi-Ouzou, Décembre 2018-Avril 2019.

Plaquettes	$10^3/\text{mm}^3$	Effectif	%
< 3 mois	< 150	4	29,1
	[150-600]	23	65,8
	>600	1	5,1
	Total	28	100
>3 mois	< 150	19	28,8
	[150-500]	29	65,0
	>500	4	6,3
	Total	52	100
TOTAL		80	100

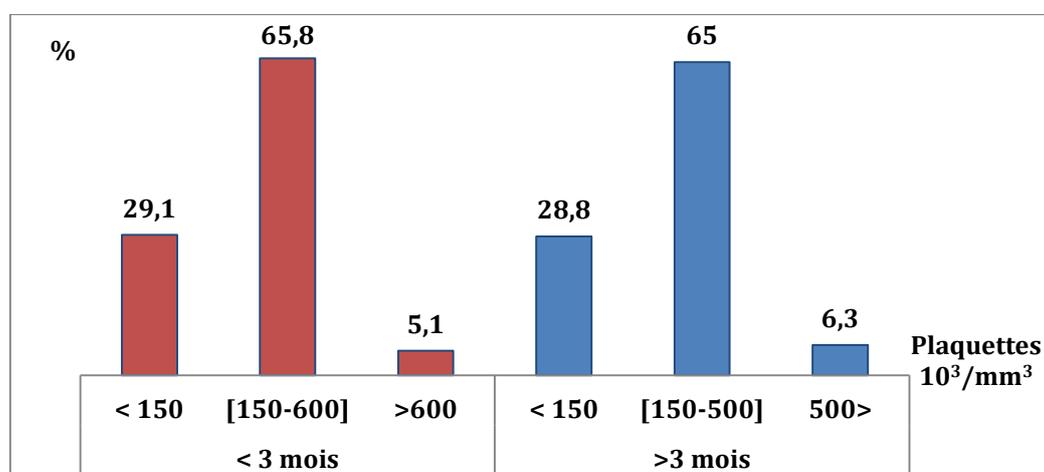


Figure 50 : Le Taux des plaquettes chez la population d'étude, CHU Tizi-Ouzou, Décembre 2018-Avril 2019.

1.14.6. Selon le taux des globules blancs (GB)

Il y a une hyperleucocytose dans 41,7% des cas. (Tableau23, Figure 51)

Tableau 23 : Le Taux des globules blancs chez la population d'étude, CHU Tizi-Ouzou, Décembre 2018-Avril 2019.

GB	$10^3/\text{mm}^3$	Effectif	%
< 3 mois	<10	8	40
	[10-25]	12	60
	Total	20	100
>3mois	<4	4	7,7
	[4-10]	18	34,6
	>10	30	47,7
	Total	52	100
TOTAL		72	100

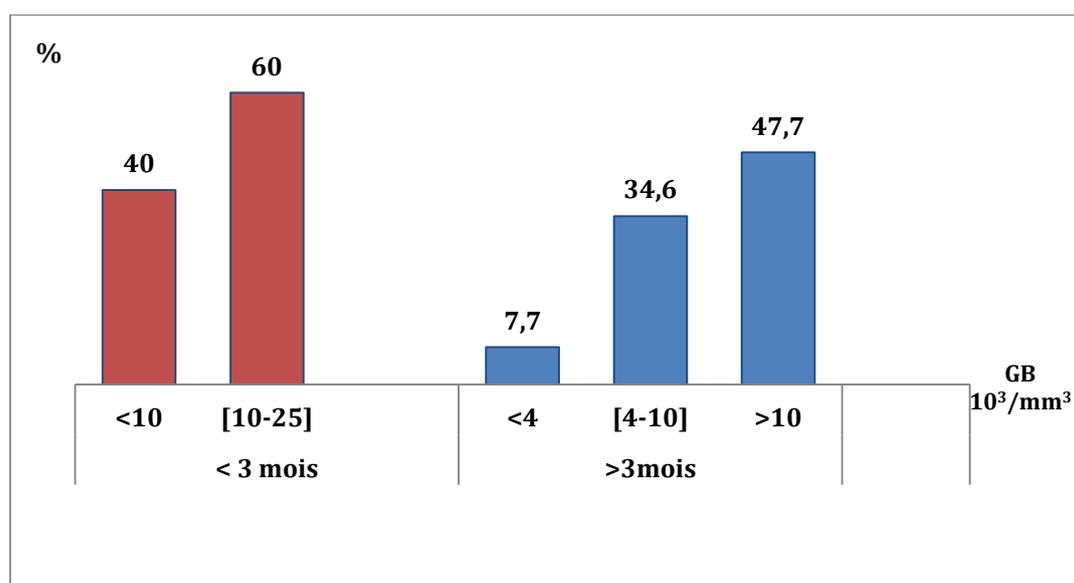


Figure 51 : Le Taux des globules blancs chez la population d'étude, CHU Tizi-Ouzou, Décembre 2018-Avril 2019.

1.14.7. Selon le taux de la bilirubine Totale

Le taux de la bilirubine totale est élevé dans 51,9% des cas. (Tableau 24, Figure 52)

Tableau 24 : Le taux de la bilirubine totale chez la population d'étude, CHU Tizi-Ouzou, Décembre 2018-Avril 2019.

	Effectif	%
< 10 mg /l	38	48,1
> 10 mg/l	41	51,9
Total	79	100

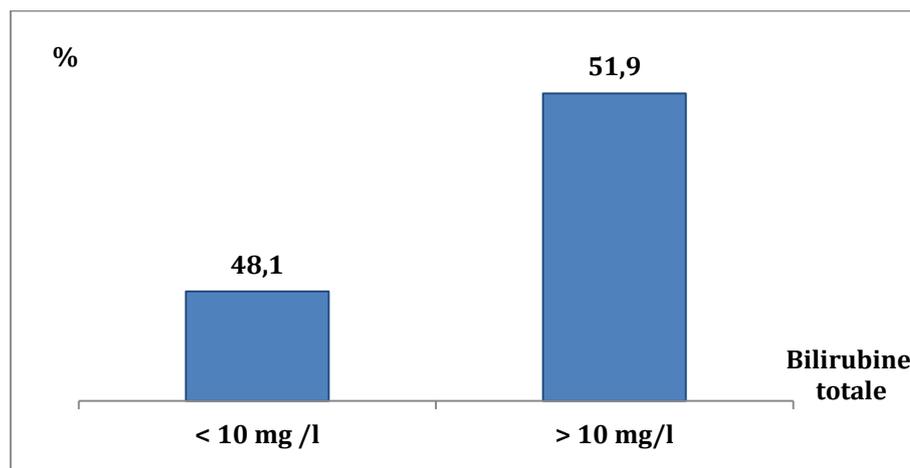


Figure 52 : Le taux de la bilirubine totale chez la population d'étude, CHU Tizi-Ouzou, Décembre 2018-Avril 2019.

1.14.8. Selon le taux de la bilirubine directe

Taux de la bilirubine directe est élevé dans 51,9 % des cas. (Tableau 25, Figure 53)

Tableau 25 : Le taux de la bilirubine directe chez la population d'étude, CHU Tizi-Ouzou, Décembre 2018-Avril 2019.

	Effectif	%
< 3 mg/l	38,1	48,1
> 3mg/l	41	51,9
Total	79	100

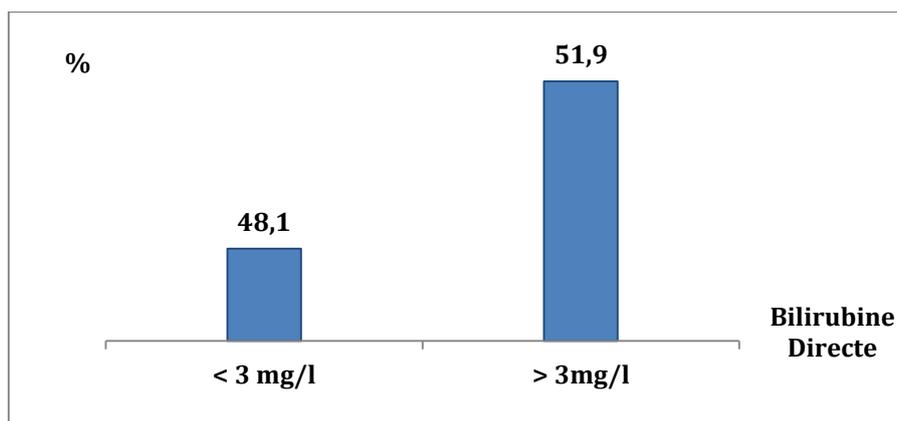


Figure 53 : Le taux de la bilirubine directe chez la population d'étude, CHU Tizi-Ouzou, Décembre 2018-Avril 2019.

1.14.9. Selon le taux de la lactase déshydrogénase (LDH)

Le taux de LDH est élevé dans 62,5% des cas. (Tableau 26, Figure 54)

Tableau 26 : Le taux de LDH chez la population d'étude, CHU Tizi-Ouzou, Décembre 2018-Avril 2019.

LDH	Effectif	%
< 400 UI /l	18	37,5
>400 UI/L	30	62,5
Total	48	100

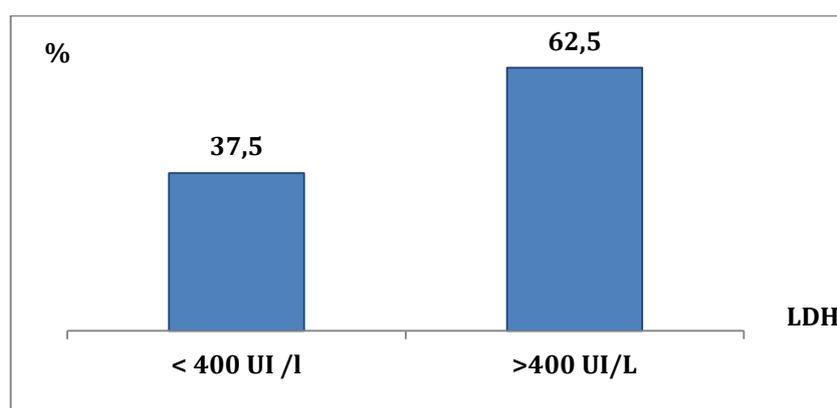


Figure 54 : Le taux de LDH chez la population d'étude, CHU Tizi-Ouzou, Décembre 2018-Avril 2019.

1.14.10. Selon le taux de la ferritine

La ferritine est élevé dans 71,9% des cas. (Tableau 27, Figure 55)

Tableau 27 : Le Taux de la ferritine chez la population d'étude, CHU Tizi-Ouzou, Décembre 2018-Avril 2019.

Ferritine	Effectif	%
< 150 μ /ml	9	28,1
>150 μ /ml	23	71,9
Total	32	100

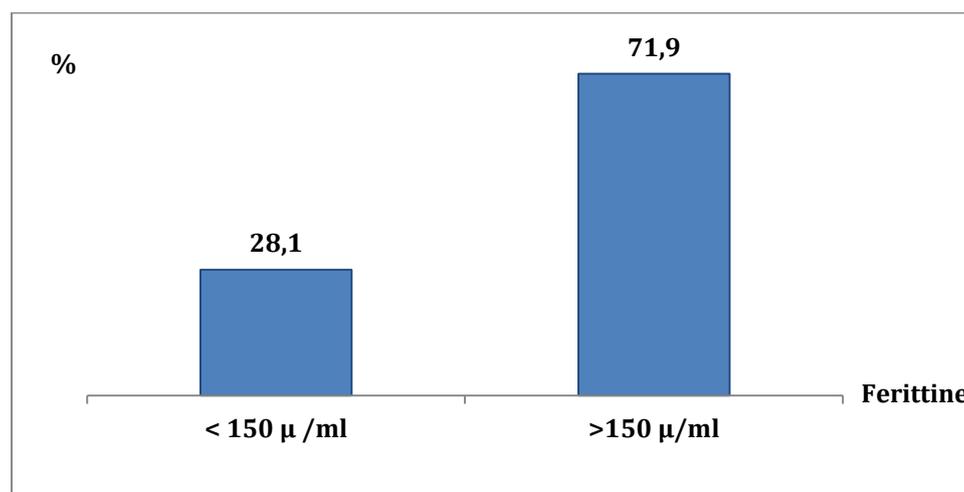


Figure 55 : Le taux de la ferritine chez la population d'étude, CHU Tizi-Ouzou, Décembre 2018-Avril 2019.

1.14.11. Selon le frottis sanguin

Il y a une normocytose normochromie dans 72,7% des cas.

Tableau 28 : Répartition de la population d'étude selon le frottis sanguin, CHU Tizi-Ouzou, Décembre 2018-Avril 2019.

Le frottis sanguin	Effectif	Pourcentage (%)
Normocytose normochromie	24	72,7
Microcytose hypochromie,	4	12,1
Macrocytose normochromie	1	3,03
Microcytose normochromie, elliptocyte++, dacryocyte+	1	3,03
Anisocytose	3	9,09
Total	33	100

1-15-Répartition selon les résultats du test de coombs direct (TCD)

- **Selon le TCD sur tube**

Le TCD sur tube est positif (TCD+) dans 14,3% des cas, le TCD est négatif (TCD-) dans 85,7% des cas.

- **Selon la spécificité de l'agglutination**

Le TCD positif à IgG est dans 12,7 % des cas, et positif à IgGC3d dans 0,8% des cas et positif à C3d dans 0,8 % des cas.

- **Selon l'intensité d'agglutination**

Le TCD positif à IgG+ est dans 8,4% des cas, il est positif à IgG++ dans 4% des cas et il est positif à IgG+++ dans 0,8 % des cas.

Le TCD positif à C3d+ est dans 1,6% des cas.

(Tableau 29, Figure 56)

Tableau 29 : Résultats du TCD effectué sur tube, CHU Tizi-Ouzou, Décembre 2018-Avril 2019.

TCD sur tube		Effectif	%
TCD	Positif	18	14,3
	Négatif	108	85,7
	Total	126	100
Spécificité d'agglutination	-	108	85,7
	IgG	16	12,7
	IgGC3d	1	0,8
	C3d	1	0,8
	Total	126	100
Intensité d'agglutination type IgG	+	11	8,7
	++	5	4,0
	+++	1	0,8
	-	109	86,5
	Total	126	100
Intensité d'agglutination type C3d	+	2	1,6
	-	124	98,4
	Total	126	100

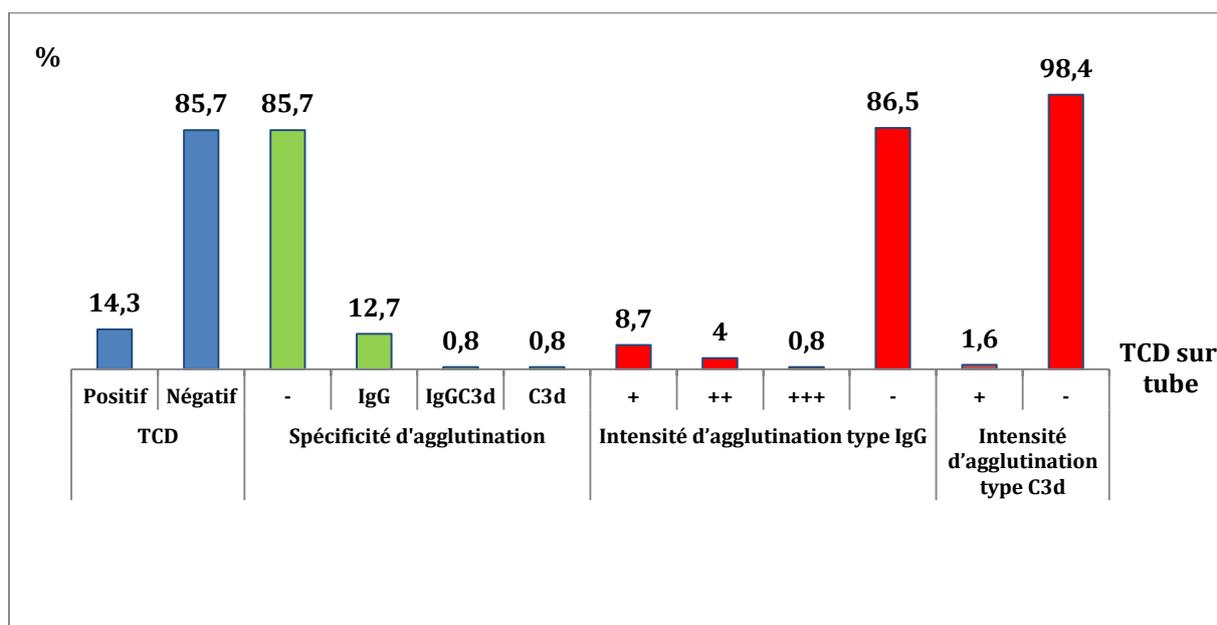


Figure 56 : Résultats du TCD effectué sur tube, CHU Tizi-Ouzou, Décembre 2018-Avril 2019.

1.15.2 TCD sur microscope

Les résultats montrent que 23,1% ont un TCD positif et 76,9 % ont TCD négatif sur microscope.

- **Selon la spécificité d'agglutination :**

Le TCD+ sur microscope est dans 100% des cas à IgG. (Tableau 30, Figure 57).

Tableau 30 : Résultats du TCD effectué sur microscope, CHU Tizi-Ouzou, Décembre 2018-Avril 2019.

TCD sur microscope		Effectif	%
TCD	Positif	25	23,1
	Négatif	83	76,9
	Total	108	100
Spécificité d'agglutination	-	83	76,9
	IgG+	25	23,1
	Total	108	100

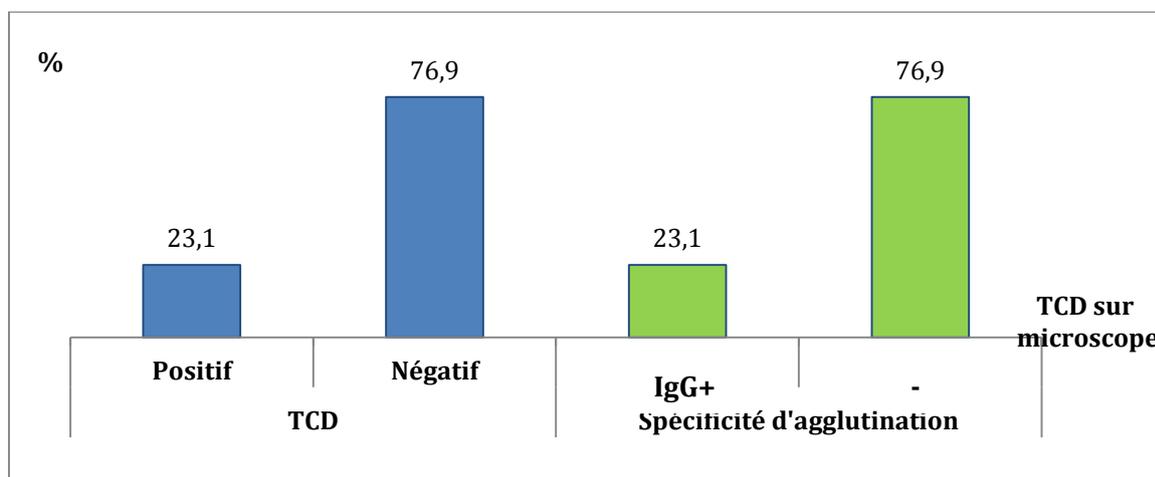


Figure 57 : Résultats du TCD effectué sur microscope, CHU Tizi-Ouzou, Décembre 2018-Avril 2019.

1.15.3. TCD sur carte gel

Le TCD sur carte gel est positif dans 34,1% des cas.

- **Selon la spécificité d'agglutination :**

Le TCD positif à IgG est dans 32,5 % des cas, et positif à IgGC3d dans 0,8% des cas et positif à C3d dans 0,8 % des cas.

- **Selon l'intensité d'agglutination :**

Le TCD positif à IgG+ est dans 20,6 % des cas, il est positif à IgG++ dans 7,9 % des cas et il est positif à IgG+++ dans 4,8 % des cas.

Le TCD positif à C3d+ est dans 0,8 % des cas et positif à C3d ++ dans 0,8 % des cas.

(Tableau 31, Figure 58).

Tableau 31 : Résultats du TCD effectué sur carte gel, CHU Tizi-Ouzou, Décembre 2018-Avril 2019.

TCD sur carte gel		Effectif	%
TCD	Positif	43	34,1
	Négatif	83	65,9
	Total	126	100
Spécificité d'agglutination	-	83	65,9
	IgG	41	32,5
	C3d	1	0,8
	IgGC3d	1	0,8
	Total	126	100
Intensité d'agglutination type IgG	+	26	20,6
	++	10	7,9
	+++	6	4,8
	-	84	66,7
	Total	126	100
Intensité d'agglutination type C3d	+	1	0,8
	++	1	0,8
	-	124	98,4
	Total	126	100

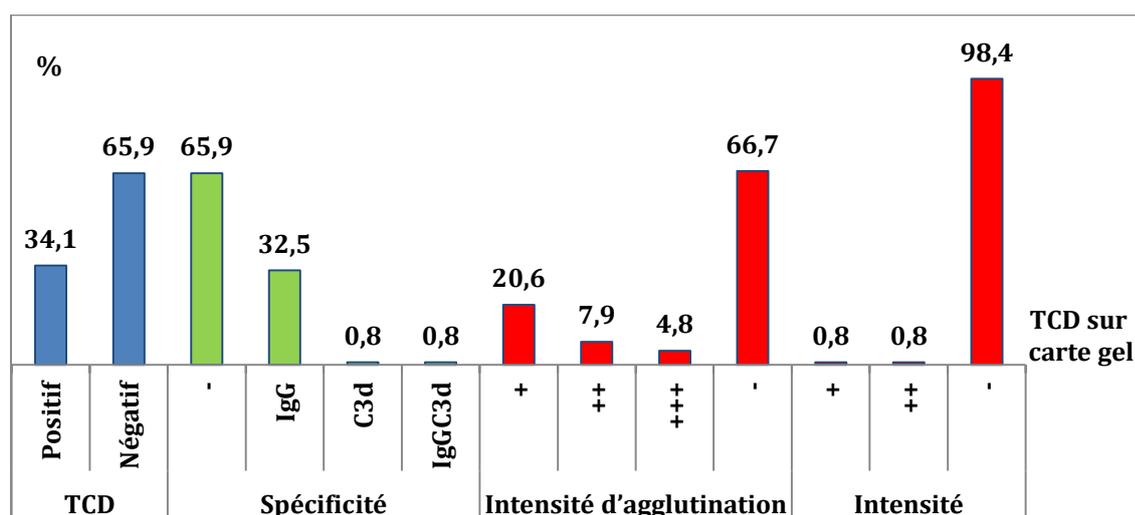


Figure 58 : Résultats du TCD effectué sur carte gel, CHU Tizi-Ouzou, Décembre 2018- Avril 2019.

2-Résultats des tests de TCD effectués sur des hématies tests

Sur carte gel : On observe qu'au fur et à mesure que l'anti-D est dilué, l'agglutination sur la carte gel diminue jusqu'à la dilution 1/128 au cours de laquelle il n'y a aucune agglutination visible dans le gel et les hématies se trouvent déposées au fond des microtubes de la carte gel. (Figure 59, Tableau 30).

Sur tube : On observe qu'au fur et à mesure que l'anti-D est dilué, l'agglutination en tube diminue jusqu'à l'agglutination 1/8 au cours de laquelle il n'y a aucune agglutination visible dans le tube. (Figure 60, 61, Tableau 32)

Nous avons constaté que selon les intensités, les forces d'agglutination en tube et en carte ne sont pas identiques, lorsque les résultats en carte sont à +++++, en tube sont à +++, mais lorsque ces résultats sont +++ en carte, ils ont tendance à être négatifs en tube.

Tableau 32 : Résultats des tests de TCD effectués sur des hématies tests ; CHU Tizi-Ouzou, Décembre 2018-Avril 2019.

Dilutions	Pur	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024
Technique en gel	+++++	+++	+++	+++	++à+++	++	+/-	+/-	-	-	-
Technique en tube	+++	+à++	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Technique sur microscope	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-

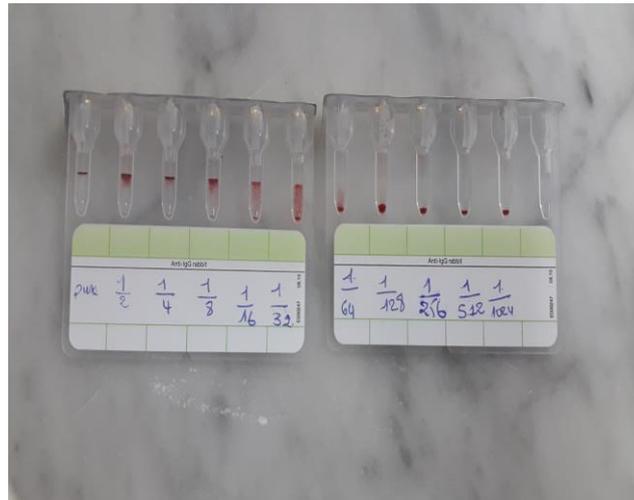


Figure 59 : les résultats de la sensibilisation des hématies sur carte gel



Figure 60 : le résultat du TCD pour la dilution 1/2



Figure 61 : le résultat du TCD pour la dilution 1/8

3-Analyse des résultats

3.1. Comparaison entre TCD sur tube et TCD sur carte gel

- TCD sur carte gel était positif dans 34,12% des cas.
- TCD sur tube était positif dans 14,3% des cas.
- Les performances des deux techniques diffèrent significativement (DS ; $p < 10^{-4}$)
- La performance de TCD sur carte gel est meilleure que le TCD sur tube. (Tableau 33).

Tableau 33 : Comparaison entre TCD sur tube et TCD sur carte gel.

Technique	Effectif	Résultat positif%	P value
TCD sur carte gel	126	44 (34,12)	<0,0001
TCD sur tube	126	18(14,3)	

3.2. Comparaison entre TCD sur tube avec lecture au microscope et TCD sur carte gel

- TCD sur carte gel était positif dans 23,14% des cas.
- TCD sur tube avec microscope était positif dans 23,14% des cas.
- Les performances des deux techniques ne diffèrent pas significativement (DNS ; p=1) (Tableau 34)

Tableau 34 : Comparaison entre TCD sur tube avec lecture au microscope et TCD sur carte gel.

Technique	Effectif	Résultat positif%	P value
TCD sur carte gel	108	25 (23,14%)	=1
TCD sur tube avec microscope	108	25(23,14%)	

3.3. Comparaison entre TCD sur tube avec et sans lecture sur microscope

- TCD sur tube sans microscope était positif dans 14,3% des cas.
- TCD sur tube avec microscope était positif dans 34,13% des cas.
- Les performances des deux techniques diffèrent significativement (DS ; $p < 10^{-4}$)
- Le TCD sur tube avec microscope est plus sensible que le TCD sur tube sans microscope. (Tableau 35)

Tableau 35 : Comparaison entre TCD sur tube avec et sans lecture sur microscope.

Technique	Effectif	Résultat positif%	P value
-----------	----------	-------------------	---------

TCD sur tube sans microscope	126	18 (14,3 %)	<0,0001
TCD sur tube avec microscope	126	43(34,13%)	

3.4. Comparaison de la sensibilité de TCD avec et sans lecture au microscope avec le TCD sur carte gel

Dans cette comparaison on a considéré la carte gel comme examen de référence

La technique du TCD avec microscope est plus sensible que le TCD sans microscope.

On a considéré dans cette comparaison, les malades sont ceux qui ont un TCD+ sur carte gel et les non malades sont ceux qui ont un TDC- .

3.4.1. Sensibilité du TCD sur tube sans lecture au microscope

La sensibilité du TCD sur tube sans microscope est de 40,9% de celle de la carte gel. (100% Vs 40,9%). (Tableau 36)

Tableau 36 : Sensibilité du TCD sans microscope.

		Malade	Non malade	
TCD sur tube sans microscope	Positif	18	0	18
	Négatif	25	83	108
		43	83	126

3.4.2. Sensibilité du TCD sur tube avec lecture au microscope

La sensibilité du TCD sur tube avec lecture au microscope est identique à celle du TCD sur carte gel (100%).

La technique de TCD sur tube avec lecture au microscope est plus sensible que le TCD sur tube sans lecture au microscope (100% Vs 40,9%). (Tableau 37)

Tableau 37 : Sensibilité de TCD sur tube avec microscope.

		Malade	Non malade

TCD sur tube avec microscope	Positif	43	0	43
	Négatif	0	83	82
		43	83	126

3.5. Comparaison entre les signes cliniques d'hémolyse et résultats de TCD

Il existe une différence significative entre les signes cliniques d'hémolyse et les résultats de TCD (DS ; $p=0,049$). (Tableau 38)

Tableau 38 : Comparaison entre les signes cliniques d'hémolyse et résultats de TCD.

Technique	Effectif	Résultat positif%	P value
Signes cliniques d'hémolyse	79	68 (86,07%)	=0,049
Résultat de TCD	79	36 (45,5 %)	

3.6. Comparaison entre le taux de la bilirubine total et résultats de TCD

Il n'existe pas de différence significative entre les taux de bilirubine total et les résultats de TCD (DNS ; $p=0,19$). (Tableau 39)

Tableau 39 : Comparaison entre le taux de la bilirubine total et résultats de TCD.

Technique	Effectif	Résultat positif%	P value
Bilirubine totale	79	41 (51,9%)	=0,19
Résultat de TCD	79	36(45,5%)	

3.7. Comparaison entre le taux de la bilirubine directe et les résultats de TCD

Il n'existe pas de différence significative entre les taux de bilirubine direct et les résultats de TCD (DNS ; $p=0,19$). (Tableau 40)

Tableau 40 : Comparaison entre le taux de la bilirubine directe et les résultats de TCD.

Technique	Effectif	Résultat positif%	P value
-----------	----------	-------------------	---------

Bilirubine direct	79	41 (51,9%)	=0,19
Résultat de TCD	79	35 (44,3 %)	

3.8. Comparaison entre le LDH et les résultats de TCD

Il n'existe pas de différence significative entre les taux de LDH et les résultats de TCD (DNS ; $p=0,88$). (Tableau 41)

Tableau41 : Comparaison entre le taux de LDH et les résultats de TCD.

Technique	Effectif	Résultat positif%	P value
LDH	48	30 (65,2%)	=0,88
Résultat de TCD	48	26 (54,2 %)	

3.9. Comparaison entre l'anémie et les résultats de TCD

Il existe une différence significative entre l'anémie et les résultats de TCD (DS, $p=0,023$). (Tableau 42)

Tableau 42 :Comparaison entre l'anémie et les résultats de TCD.

Technique	Effectif	Résultat positif%	P value
Anémie	72	29 (40,3%)	=0,023
Résultat de TCD	72	31(43,05%)	

3.10. Comparaison entre la thrombopénie et les résultats de TCD

Il existe une différence significative entre la thrombopénie et le TCD (DS ; $P<0,007$).

(Tableau 43)

Tableau 43 :Comparaison entre la thrombopénie et les résultats de TCD.

Technique	Effectif	Résultat positif%	P value
Thrombopénie	79	33 (41,7%)	=0,007
Résultat de TCD	79	23(29,1%)	

3.11. Comparaison entre l'hyperleucocytose et les résultats de TCD

Il existe une différence significative entre l'hyperleucocytose et les résultats de TCD (DS ; $p=10^{-4}$). (Tableau 44)

Tableau 44 : Comparaison entre l'hyperleucocytose et les résultats de TCD.

Technique	Effectif	Résultat positif%	P value
Hyperleucocytose	72	30 (41,6%)	=0,0001
Résultat de TCD	72	32(44,4%)	

Discussion

Discussion

Dans l'analyse des résultats on a été confronté à un certains nombre de difficultés :

- La collecte de l'information était incomplète par manque de données sur les dossiers médicaux. Ce qui nous a empêchés de chercher des relations avec d'autres facteurs tel que la grossesse et la transfusion sanguine.
- On ne pouvait pas vérifier l'exactitude des informations qui ont été recueillies en rétrospectif.
- Les résultats du bilan biologique d'hémolyse non significatifs sont non concluants, ceci peut être du à la taille de l'échantillon qui est réduit d'un paramètre à un autre.

Le TCD est un test immuno-hématologique de première importance. Il est fondamental pour le diagnostic des anémies hémolytiques auto-immunes ou allo-immunes par incompatibilité foeto-maternelle ou par incompatibilité transfusionnelle. L'importance d'un diagnostic rapide et précis exige une sensibilité optimale de la technique utilisée. Notre étude a ainsi consisté à l'évaluation des deux techniques diagnostique de l'hémolyse.

- ❖ L'âge moyen de la population est de 34,12 ans \pm 31,16 ans, avec un minimum de 01 jour et un maximum de 84 ans ; le sexe ratio est de 0,83.
- ❖ Les résultats montrent que 41,3 % des patients ayant nécessité un TCD sont hospitalisés au niveau du service d'hématologie suivi de service néonatalogie 21,4% et de pédiatrie 15,9%.
- ❖ Notre étude montre que 39,2% de la population est de groupe sanguin B, 37,1 % est de groupe sanguin O et 19,6 % est de groupe sanguin A. La population d'étude est de Rhésus positif (Rh+) dans 84,5% des cas.
- ❖ Les résultats montrent que 30,4% de la population est de phénotype C⁺ceK⁻ et 25,3% est de phénotype CC⁺ceK⁻.

Les résultats de la sensibilisation des hématies tests

- ❖ Les résultats de notre étude de sensibilisation des hématies avec un anti D montrent que sur carte gel, on observe au fur et à mesure que l'anti-D est dilué, l'agglutination sur la carte gel diminue jusqu'à la dilution 1/128 au cours de laquelle il n'y a aucune agglutination visible dans le gel et les hématies se trouvent déposées au fond des microtubes de la carte gel.

- ❖ La technique sur tube montre qu'au fur et à mesure que l'anti-D est dilué, l'agglutination en tube diminue jusqu'à la dilution 1/8 au cours de laquelle il n'y a aucune agglutination visible dans le tube.
- ❖ Nous avons constaté que selon les intensités, les forces d'agglutination en tube et en carte n'est pas identique, lorsque les résultats en carte sont à +++, en tube sont à ++, mais lorsque ces résultats sont +++ en carte, ils ont tendance à être négatifs en tube.
- ❖ Cette étude comparative montre que la technique en gel est plus sensible que celle en tube avec un écart de 5 dilutions et une plus grande intensité d'agglutination.
- ❖ Les résultats négatifs sur tube et positifs sur carte gel étaient tous positifs sur microscope.
- ❖ Les résultats obtenus dans notre étude concordent avec ceux de l'étude comparative de la sensibilité entre la technique en gel diamed et la technique en tube réalisé par H. Elleuh au niveau laboratoire d'Hématologie, Faculté de Médecine de Sfax.
- ❖ L'étude de H. Elleuh montrent que le TCD type IgG sur carte gel est plus sensible que celle en tube avec un écart allant de une à deux dilutions et une plus grande intensité d'agglutination.

Les résultats du TCD chez les patients

- ❖ Le TCD sur carte gel est positif dans 34,1% des cas, et positif sur tube dans 14,3% des cas.
- ❖ Après vérification des résultats du TCD négatifs sur tube et positifs sur carte gel ces échantillons étaient tous positifs sur microscope.
- ❖ L'analyse des résultats montre qu'il existe une différence significative entre le TCD sur tube et TCD sur carte gel, ($p < 0,0001$).

La technique du TCD sur carte gel est plus sensible que la technique du TCD sur tube sans microscope.

La sensibilité du TCD sur tube sans microscope est de 40,9% de celle de la carte gel.

- ❖ La comparaison entre TCD sur tube avec microscope et TCD sur carte gel a montré que les performances des deux techniques est identique (DNS ; $p=0,063$)
- ❖ La sensibilité du TCD sur tube avec lecture au microscope est identique à celle du TCD sur carte gel (100%).

- ❖ La comparaison entre TCD sur tube avec et sans microscope a montré que la performance de TCD sur tube avec microscope est plus performante que TCD sur tube seul ($p < 0,0001$).
- ❖ La technique du TCD sur tube avec lecture au microscope est plus sensible que le TCD sur tube sans lecture au microscope (100% Vs 40,9%).
- ❖ Cette discordance est due à une difficulté de visibilité d'agglutination à l'œil nu en tube, ceci suggère que le résultat de test sur tube négatif doit être vérifié systématiquement sur microscope.
- ❖ Par ailleurs sur 34,1% des patients au TCD+ sur carte gel, 20,6% ont un TCD IgG+, 7,9% ont un TCD IgG++, 4,8% au TDA IgG+++ et 0,8% au TCD C3d + et 0,8% au TCD C3d ++.

Par contre sur 14,3% des patients au TCD+ sur tube, 8,7 % des patients ont été au TCD IgG+, 4% des patients ont été au TCD IgG++, 0,8% des patients au TDA IgG+++ et 1,6% des patients au TCD C3d +.

- ❖ Cela montre qu'il y a une différence de précision entre ces deux techniques, car la technique sur tube nécessite un personnel qualifié et expérimenté pour l'interprétation des résultats car la lecture est subjective, contrairement à la technique sur carte gel qui permet une lecture standardisée de l'intensité d'agglutination et de garder une trace de la réaction grâce au gel qui piège les hématies agglutinées, ce qui rend la lecture ultérieures possible.

Aussi, en réalisant le test, le gel ne nécessite pas des lavages du culot globulaire parce qu'il est associé à un excès d'AGH, ce qui permet d'éviter tout risque d'inhibition des antiglobulines. Quant au tube il nécessite des lavages afin d'éliminer toutes les globulines humaines encore présentes dans le tube et qui pourraient être source de faux négatifs par inhibition de l'antiglobuline ou de faux positifs par adsorption érythrocytaire aspécifique.

La technique sur tube présente des risques d'erreurs importants en cas d'oubli d'ajout de l'AGH ou des lavages inappropriés du culot globulaire, par contre sur carte gel il y a pas du risque d'erreur en raison de principe de filtration sur gel imprégné d'AGH.

Comparaison entre les avantages et les inconvénients de la technique sur tube et sur carte gel

La carte gel présente plus d'avantages mais son seul inconvénient est son coût .

Tableau 45 : Comparaison entre les avantages et les inconvénients de la technique sur tube et sur carte gel

Technique en tube	Technique sur carte gel
Lente	Rapide
Nécessite des lavages minutieux du culot globulaire	Elle ne nécessite pas des lavages du culot globulaire
Risque d'erreur important (Lavage inapproprié, l'oubli d'ajout de réactif AGH)	Pas de risque d'erreur, cette technique utilise un gel de filtration imprégné de réactif AGH
Demande un personnel qualifié et expérimenté pour interpréter les résultats	Interprétation rapide des résultats
L'agglutination disparaît en quelques secondes	Le gel permet de garder une trace de la réaction
Elle n'est pas coûteuse	Coûteuse

- ❖ Les résultats de TCD négatif n'éliminent pas la présence d'anémie hémolytique immunologique type IgA, ou aux anticorps présents dans le sérum et non fixés sur le globule rouge et le cas d'une hémolyse des GR en cas d'accident transfusionnel.
- ❖ Une anémie hémolytique immunologique à TCD négatif peut être due à la présence d'anticorps IgA non détectable par nos cartes gels monospécifique à IgG ou à C3d.
- ❖ Le TDA peut être négatif et associé à d'authentiques AHAI : il peut être faussement négatif par erreur technique, mauvaise qualité des réactifs, éluions des Ac lors du lavage des hématies ou faible densité des Ac à la surface des hématies.
- ❖ Un résultat au TCD positif à C3d est complété par une RAI à froid (+4°) puis réchauffée à chaud pour voir si y a une disparition d'agglutination à l'origine de présence de IgM.

Corrélation de la clinique avec les résultats de TCD

- ❖ Le TCD est plus demandé par le service d'hématologie (41,3%) où les hémopathies chroniques représentent 21,7% et hémopathies aiguës 9,5%, cela en raison des anémies hémolytiques auto-immunes secondaires aux maladies et les anémies hémolytiques dues aux accédants transfusionnels.

- ❖ Le TCD est demandé par le service de néonatalogie dans 21,4% des cas pour le motif d'ictère cutanéomuqueux (19%) en raison de l'incompatibilité fœto-maternelles.

- ❖ Dans notre étude 81,9% de la population d'étude ont des signes cliniques d'hémolyse. La pâleur cutanéomuqueuse (PCM) est retrouvée dans 71,1 % des cas.

L'ictère est retrouvé dans 35,4% des cas.

La splénomégalie est retrouvée dans 6 % des cas. (SPM).

Et d'autres signes cliniques d'hémolyse sont retrouvés dans 34,9 % des cas.

Il existe une différence significative entre les signes cliniques d'hémolyse et les résultats de TCD ($p < 0,049$).

- ❖ Sur FNS on retrouve une anémie dans 72,5% des cas. Elle est normocytaire normochrome dans 51,6% des cas avec une différence significative entre l'anémie et les résultats de TCD ($p=0,023$).

- ❖ Les résultats des frottis sanguin ont montré qu'il existe une normocytose normochromie dans 72,7% des cas et une anisocytose dans 9,09% des cas.

Ces résultats concordent avec les données de littérature où les anémies hémolytique immunologiques sont souvent normochrome normocytaire.

Dans notre étude toute la population avaient une anémie régénérative (Le taux de réticulocyte > 120000 elts/mm³)

- ❖ Le taux de la ferritine est élevé dans 71,9% des cas ce qui concorde avec les données de la littérature.
- ❖ Le taux de la bilirubine totale est élevé dans 51,9% des cas. Il n'existe pas de différence significative entre les résultats de TCD et la bilirubine total ($p = 0,19$). Taux de la bilirubine directe est élevé dans 51,9 % des cas. sans différence significative avec le TCD ($p = 0,19$).
- ❖ Le taux de LDH est élevé dans 62,5% des cas sans différence significative avec le TCD ($p = 0,88$).

Les résultats du bilan biologique d'hémolyse non significatifs sont non concluants, cela peut être dû à la taille de l'échantillon et au manque de renseignements.

❖ Il existe une différence significative entre la thrombopénie et le TCD ($P=0,007$). La thrombopénie peut être associée à une anémie hémolytique auto-immune dans le syndrome d'Evans.

❖ Il existe une différence significative entre l'hyperleucocytose et le TCD ($P=10^{-4}$)
Ce qui concorde avec la littérature où l'hémolyse peut être due à l'infection virale ou bactérienne dans les anémies hémolytiques auto-immunes.

Conclusion

Les résultats obtenus à travers l'étude, nous montrent que le TDA réalisé sur tube et le TDA réalisé sur carte gel sont équivalents de point de vue diagnostique. Au cours des deux tests nous n'avons pas retrouvé que les deux tests sur tub et sur carte gel sont performants à condition de soumettre le TDA tube à l'examen microscopique. La technique sur carte gel a plus d'avantages notamment pour sa rapidité et elle a moins de risque d'erreurs, mais plus couteuse. Le choix du laboratoire reste tributaire des moyens financiers dont il dispose. Ainsi on a noté que les signes cliniques d'hémolyse concordent avec les résultats de TDA. Les paramètres biologiques suivants :Hb, taux de réticulocyte, la ferritine, Gb et plaquettes concordent le plus souvent avec les résultats de TDA.

Notre étude a été limitée dans le temps, et biaisée par le manque d'informations concernant les patients. Par ailleurs nous souhaitons que notre travail ouvre les portes à d'autres recherches prospectives sur une population plus étendue pour chercher la relation avec d'autres facteurs tels que la transfusion sanguine et la grossesse.

Recommendations

Recommandations

- Un TDA négatif ou douteux en tube doit être toujours confirmé au microscope.
- Il est préférable d'utiliser des cartes gel car c'est une technique plus rapide et plus sensible que la technique sur tube.
- Contrôler l'AGH en utilisant le témoin positif et le témoin négatif.
- Il est recommandé d'utiliser des cartes gels contenant en plus des AGH monospécifiques anti-IgG, Anti C3d, des AGH monospécifique anti-IgA et anti-IgM.
- Il est recommandé de toujours compléter le test de TCD par une FNS et un bilan martial et un bilan d'hémolyse

Références

Bibliographiques

- 1-Medkour T. Modélisation Mathématique et Simulation Numérique de la Polymérisation de l'Hémoglobine Drépanocytaire [thèse]. Paris : Université de Paris XII ; 2 juil 2008.
- 2-Tahiri N. Simulation de Globules Rouges modèles, et analyse analytique de modèles de suspensions très concentrées [thèse]. Grenoble : Université Joseph-Fourier ; 17 juil 2013.
- 3- RAHALI F Z. Guide de l'hématologie clinique à l'usage de l'étudiant en médecine en stage hospitalier [thèse]. Marrakech : Faculté de médecine et de pharmacie; 2018.
- 4-Adili N. ETUDE MORPHOMETRIQUE DES GLOBULES ROUGES DES RUMINANTS DOMESTIQUES [thèse]. Batna : Université El Hadj Lakhdar ; 2007.
- 5-Grigorakaki C. ETUDE DES MECANISMES CELLULAIRES ET MOLECULAIRES DE L'INHIBITION DE L'ERYTHROPOÏESE PAR LA CYTOKINE PROINFLAMMATOIRE TUMOR NECROSIS FACTOR (TNF)- α [thèse]. Luxembourg : Université Henri Poincaré-Nancy I ; 14 nov 2011.
- 6-Do-Rouvière J A. Diagnostique de la sphérocytose héréditaire par cytométrie en flux [thèse]. UNIVERSITE Henri Poincaré - Nancy 1 FACULTE DE PHARMACIE ; 31 octobre 2008.
- 7-Do-Rouvière J A. Diagnostique de la sphérocytose héréditaire par cytométrie en flux [thèse]. UNIVERSITE Henri Poincaré - Nancy 1 FACULTE DE PHARMACIE ; 31 octobre 2008.
- 8-Guillaume L. Élasticité du squelette du globule rouge humain - une étude par pinces optiques [thèse]. Paris : Université Pierre et Marie Curie ; 2001.
- 9-Laura V. CONTRIBUTION A L'ETUDE DE L'AFFINITE DES ANTICORPS MONOCLONAUX PAR DES METHODES D'OPTIQUE PHYSIQUE [thèse]. Lorraine : Université Henri Poincaré ; 25 oct 2000.
- 10-Gaucher C. Relation cellules endothéliales/substituts sanguins : Implication des contraintes de cisaillement ou de l'hypoxie, et évaluation de la cytotoxicité d'hémoglobine de nouvelle génération [thèse]. Lorraine : Université Henri Poincaré ; 14 déc 2007.
- 11-Meftah A. Anémies hémolytiques auto-immunes [Thèse]. RABAT : UNIVERSITÉ MOHAMMED V-RABAT ; 2016.
- 12 Chiaroni J, Roubinet F. Les analyses immunohématologiques et leurs applications cliniques. EFC ; 2011. 4p.
- 13-Sultan C, Gouault-Heilman M, Imbert M. Aide-mémoire d'hématologie. Flam. Medecine Science. Paris ; 1978. 53p.
- 14-Geber E. APPLICATION DU TEST DU COOMBS EN MEDECINE VETERENAIRE CANINE [thèse]. Lyon : Université CLAUD BERNARD ; 04 sep 2007.
- 15- Les classes des immunoglobulines . Disponible sur : <https://f.danieau.free.fr>
- 16-IMT Groupe – issuu. Structure et fonction des anticorps [en ligne]. 2017 [Publié le 19 mars 2017]. Disponible sur : https://issuu.com/groupeimt/docs/collection_mabimprove_livret_1.

- 17-Gasque P, Legoedec J, Thomas A, SchouftM,Chan P , Fontaine M. Nouvelle fonctions pour le système du complément. Apport de L'étude des synthèses locales.m/S. 1996 ; (12) :941-7.
- 18-Dragron-Durey M A, Cesbron J Y, Chevailler A, Drouet Ch ,Uring-Lambert B.Le système du complément
- 19-Geber E.APPLICATION DU TEST DU COOMBS EN MEDECINE VETERENAIRE CANINE [thèse]. Lyon : Université CLAUD BERNARD ; 04 sep 2007.
- 20-Dragron-Durey M A.Le système du complément et sa régulation .Paris : Service d'Immunologie Biologique, Hopital Européen Pompidou.2018.<https://www.datocms-assets.com>.
- 21-ChiaroniJ,RoubinetF.Les analyses immunohématologiques et leurs applications cliniques.EFC ;2011.10-11p.
- 22-ChiaroniJ,RoubinetF.Les analyses immunohématologiques et leurs applications cliniques.EFC ;2011.12-18p.
- 23-Item 297 : orientation diagnostic devant une anémie. Université Médicale Virtuelle Francophone. 01/02/2010.
- 24-Adama Traore M.Connaissances et pratiques des étudiants sur le groupe sanguin ABO et Rhésus à la FMOS/FAPH et à la FST de Bamako [thèse].Bamako ;14 mai 2018.
- 25-DebaT.ETUDE DU GENOTYPE DE SYSTEME ABO DANS LA POPULATION DE L'OEUST ALGERIEN [thèse].Oran : Faculté de Médecine ;17 jan 2017.
- 26- Vellutini B .Allo-immunisations foeto-maternelles anti-érythrocytaire anti-D et maladie hémolytique du nouveau-né : état des connaissances actuelles.[Thèse].université Claude bernard ;Lyon 1,2012.
- 27-Traore O .Phénotype érythrocytaires dans les systèmes de groupes sanguins immunogènes chez les donneurs de sang de Bamako [thèse].Bamako ;2002.
- 28-Adili N. ETUDE MORPHOMETRIQUE DES GLOBULES ROUGES DES RUMINANTS DOMESTIQUES [thèse]. Batna : Université El Hadj Lakhdar ; 2007.
- 29- Douche ^a C. Pathologie des enzymes de la glycolyse érythrocytaire. EMC[en ligne]. Juin, juil 2000 ; 324 : 37-43. Disponible sur : www.em-consulte.com.
- 30- Aubry P, Gaüzère B A. Déficits enzymatiques héréditaires du globule rouge (enzymopathies héréditaires) [en ligne]. Centre René Labusquière : Institut de Médecine Tropicale, Université de Bordeaux. 26/11/2018. Disponible sur www.medecinetropicale.com.
- 31- Bertrand Godeau. Diagnostic les anémies hémolytiques. Val de marne : Université Paris-Est Créteil.
- 32- Rigal D, Meyer F, Mayrand E, Dupraz F. Les allo-immunisations foeto-maternelles anti-érythrocytaires. EMC. Mai 2008 ; 402 : 51-62.
- 33- Cortey A. Mailloux S. Huguet-Jacquot V. Castaigne-Meary G. Macé A. N'Guyen M et al. Incompatibilités foeto-maternellesérythrocytaires.EMC, pédiatrie. 2012 [en ligne]. 7(3) [22 pages]. Disponibles sur www.em-consulte.com.

- 34- Cortey A. Incompatibilités fœto-maternelles érythrocytaires, accueil du nouveau-né, pronostic à long terme. Centre National de Référence en Hémodiagnostique Périnatal. Paris : Hôpital Trousseau.
- 35 Mokeddem A, Atmane A. l'incompatibilité fœto-maternelle [thèse]. Tlemcen : Université Abou BekrBelkaid ; 2012.
- 36- Vellutini B. Allo-immunisations fœto-maternelles anti-érythrocytaires anti-D et maladie hémolytique du nouveau-né : état des connaissances actuelles [thèse]. Lyon ; Université Claude Bernard ; 8 nov 2012.
- 37- Haiat S. Prise en charge des allo-immunisations fœto-maternelles ABO et Rhésus (à propos de 33 cas colligés au service de néonatalogie à l'hôpital d'enfant de Rabat [thèse]. Rabat : Université Mohammed V-Souissi ; 2014.
- 38- Cahier de formation bioforma- immuno-hématologie et groupes sanguins [en ligne]. 2002. Disponible sur www.biopharma.net.
- 39- Germanaud D, furelaud G. Groupes sanguins et conséquences médicales. ENS [en ligne]. 1 juin 2003 [modifié le 8 déc 2016]. Disponible sur :
<https://planet-vie.ens.fr/article/1523/groupes-sanguins-consequences-medicales>
- 40- Skalli S. Le bilan immuno-hématologie prés-transfusionnelle [thèse]. Rabat : Université Mohammed V ; 2018.
- 41-ANSM. Fiche technique incompatibilité immunologique érythrocytaire. Mai 2012.
- 42-Denis H. Anémies hémolytiques immunologiques médicamenteuses [thèse]. Lyon : Université Claude Bernard ; 2014.
- 43-Le Pennec Y, Rouger Ph. Anémies hémolytiques immunologiques. Transfusion clinique et biologique[en ligne]. 1995 ; 2 : 123-133.Disponible sur [http://www. Science directe.com](http://www.Science-directe.com).
- 44-Roselyne, Benoît.Sensibilisation des hématies et médicament-antimédicament[en ligne].2008. Disponible sur <http://monde.ccdmd.qc.ca/ressource/?id=55958>
- 45- M .Michel-Anémie hémolytiques auto-immunes. EMC-Hematologie, 2016 ; p1-3.
- 46- La Revue de médecine interne 29 (2008) 105–114 Anémies hémolytiques auto-immunes à anticorps « chauds » et syndrome d'Evans de l'adulte, M. Michel.
- 47- Sanae S. Intérêt du Rituximab dans les anémies hémolytiques auto-immunes [Thèse].Rabat : UNIVERSITE MOHAMMED V – RABAT ;2016.
- 48- Geber E.APPLICATION DU TEST DU COOMBS EN MEDECINE VETERENAIRE CANINE [thèse]. Lyon : Université CLAUD BERNARD ; 04 sep 2007.
- 49- Roubinet F, Chiaroni J. .Les analyses immunohématologiques et leurs applications cliniques.EFC ;2011.78p.
- 50- Roubinet F, Chiaroni J. Les analyses immunohématologiques et leurs applications cliniques.EFC ;2011.78-79p.

51- Jaccoud C .Validation d'une méthode pour les isoagglutinines en gel [thèse].CHUV, Unité de Médecine Transfusionnelle ;2014.

52- Roubinet F, Chiaroni J. Les analyses immunohématologiques et leurs applications cliniques.EFC ;2011.79-80p.

53-<https://monde.ccdmd.qc.ca/ressource/?id=55950&demande=desc>

54- Roubinet F, Chiaroni J.Les analyses immunohématologiques et leurs applications cliniques.EFC ;2011.80-81p.

55-Leporrier M.Anémies hémolytiques auto-immunes.Caen :service d'hémodiagnostic clinique CHRU Clémenceau.2008 ; 14 (6) : 432-41.

56-Le test direct à l'antiglobuline [en ligne].2011[révisé le 31 mars 2018]. Disponible sur :<https://www.toutsurlatransfusion.com>.

57-Test Coombs : définition et types de test de Coombs[en ligne]. Disponible sur : <https://medicament.ooreka.fr/astuce/voir/596307/test-de-coombs>.

Annexes

Annexe I

ID-Diluent 2

Français

B009290 03.13

LISS modifié pour suspensions d'hématies

Identification de produit : 05761

INTRODUCTION

Une solution de basse force ionique (LISS) augmente le taux d'association de l'anticorps sur les hématies et ainsi augmente les réactions antigène-anticorps.

ID-Diluent 2[®] est une solution de basse force ionique modifiée, spécialement destinée pour ID-System, conçue pour la préparation des suspensions d'hématies à 5% pour groupage sanguin ainsi que pour une suspension d'hématies à 0,8% pour épreuve croisée, autocontrôle, test direct à l'anti-globuline humaine, groupage sanguin du nouveau-né, ainsi que pour les hématies-tests préparées au laboratoire.

RÉACTIFS

IVD

ID-Diluent 2[®] : LISS modifié pour suspensions d'hématies, en bouteille de 100 et 500 ml ou racks avec 60 x 700 µl pour les IH-Analyzers.
Conservatoire : les antibiotiques triméthoprime et sulfaméthoxazole.

Une fois ouverte, si manipulées selon les Bonnes Pratiques de Laboratoire (BPL) et stockées correctement, les bouteilles de 100 et 500 ml peuvent être utilisées pendant 6 mois maximum ou jusqu'à la date de péremption si antérieure à 6 mois.



Stabilité : voir date de péremption sur l'étiquette.

MATÉRIAUX SUPPLÉMENTAIRES NÉCESSAIRES (POUR BOUTEILLES DE 100 ET 500 ML)

- ID-Dispenser
- Pipette 25 et 50 µl
- ID-Tips (cônes pour pipette)
- Tubes pour suspensions
- ID-Table de travail

ÉCHANTILLONS

Afin d'obtenir des résultats fiables, la détermination devrait se faire sur du matériel fraîchement prélevé ou conforme aux exigences du laboratoire auquel la demande d'analyses est adressée. L'échantillon devrait être prélevé de préférence sur anticoagulant citrate, EDTA ou CPD-A. Du sang prélevé sans anticoagulant (natif) peut également être utilisé.

PRÉPARATION DE L'ÉCHANTILLON DE SANG (POUR BOUTEILLES DE 100 ET 500 ML)

A) Pour la détermination de groupe sanguin

Préparer une suspension d'hématies du patient à 5% en ID-Diluent 2[®] comme suit :
Ramenner le diluant à température ambiante avant utilisation.

1. Distribuer 0,5 ml ID-Diluent 2[®] dans un tube propre.
2. Ajouter 50 µl de sang total ou 25 µl de culot d'hématies ; mélanger légèrement.
La suspension d'hématies peut être utilisée immédiatement.

B) Pour épreuve croisée, test direct à l'anti-globuline humaine, autocontrôle en recherche d'anticorps et d'autres tests comme indiqué dans les mode d'emplois appropriés

Préparer une suspension d'hématies à 0,8% en ID-Diluent 2[®] comme suit :
Ramenner le diluant à température ambiante avant utilisation.

1. Distribuer 1,0 ml ID-Diluent 2[®] dans un tube propre.
2. Ajouter 10 µl de culot d'hématies ; mélanger doucement.
La suspension d'hématies peut être utilisée immédiatement.

C) Pour la préparation d'hématies-tests au laboratoire

1. Laver les hématies avec une solution saline isototonique ou avec ID-Diluent 2[®], trois fois ou plus, jusqu'à ce que le surnageant soit incolore.
2. Décarter le surnageant et diluer le culot d'hématies à 0,8% avec ID-Diluent 2[®].
3. En conditions aseptiques répartir la suspension dans des fiocons en verre (ou des tubes) stériles, fermer avec des bouchons stériles.
Les hématies-tests qui sont ainsi préparés et conservés à 2-8 °C sont stables pendant un jour.

Important : Pour les détails techniques, consulter les notices des cartes-ID correspondantes.

PRÉPARATION DE L'ÉCHANTILLON DE SANG (RACKS AVEC 60 X 700 µL)

Veuillez vous référer au manuel d'utilisation des IH-Analyzers.

LIMITES

- a) Des contaminations, bactériennes ou autres, du matériel utilisé peuvent provoquer des résultats faussement positifs ou faussement négatifs.
- b) L'observation stricte des méthodes et l'emploi de l'équipement recommandé sont essentiels. L'équipement doit être régulièrement contrôlé selon les procédures des GLP.
- c) ID-Diluent 2[®] a été conçu dans le but de réduire l'incidence des réactions non significatives liées à l'interférence du complément.
- d) Certains anticorps du système Kell peuvent réagir plus faiblement en milieu LISS.
- e) Les solutions LISS peuvent favoriser l'activité des autoanticorps et, par conséquent, entraîner des difficultés avec certains échantillons.

BIBLIOGRAPHIE

1. Technical Manual; 11th ed. 1993; American Association of Blood Banks.
2. Molison, P.L., Engelbreit, C.P. and Contreras, M.: Blood Transfusion in Clinical Medicine, 9th ed. 1993; Blackwell Scientific Publications, Oxford.
3. Issitt, P.D. Applied Blood Group Serology, 3rd ed. 1985; p. 222; Montgomery Scientific Publications, Miami, Florida, U.S.A.
4. Lapiere, Y., Rigal, D., Adam, J. et al.: The gel test; A new way to detect red cell antigen-antibody reactions. Transfusion 1990; 30: 109-113.

PRODUITS

ID-Diluent 2	2 x 100 ml	REF 009260
ID-Diluent 2	1 x 500 ml	REF 009280
ID-Diluent 2 Rack for IH-Analyzers	10 racks avec 60 x 700 µl	REF 009290

Ces produits sont garantis quant à leurs propriétés et qualités stipulées sur l'étiquette et dans le mode opératoire. Le fabricant décline toute responsabilité pour les cas où ces produits seraient employés ou vendus à d'autres usages.

Les modifications apportées à la version 08.12 sont colorées en gris.

Annexe II

SERVICE D'HEMOBIOLOGIE
CHUDE TIZI -OUZOU

Unité : IMMUNO-HEMATOLOGIE

Date :			
Nom :			
Prénom :			
Service:.....			
Groupage Sanguin	ABO	Rhésus	GS
TCD	Polyspécifique	Anti IgG	Anti- complément
Observation			

Le chef de l'unité

Annexe III

CHU NEDIR MOHAMED DE TIZI OUZOU

DATE :

SERVICE D'HEMOBIOLOGIE

UNITE D'IMMUNO-HEMOBIOLOGIE

FICHE DE RENSEIGNEMENTS POUR L'ETUDE COMPARATIVE DE LA SENSIBILITE DU TEST DIRECT A L'ANTIGLOBULINE HUMAINE, ENTRE LA TECHNIQUE SUR CARTE GEL ET SUR TUBE ET COORELATION DES RESULTATS AVEC LA CLINIQUE

- Nom : -Prénom : -Service :

-Age : - Sexe :

-GS : -Rhésus : -Phénotype :

-Nombre de grossesse :

-Antécédents transfusionnels : Oui Non Indéterminé

-RAI : Oui Non Indéterminé

-Antécédents personnels : Oui Non Indéterminé

-Motif d'hospitalisation :

-Signes cliniques d'hémolyses :

Pâleur cutanéomuqueuse : Oui Non Indéterminé

Ictère : Oui Non Indéterminé

Splénomégalie : Oui Non Indéterminé

Autres : Oui Non Indéterminé

-Examens biologiques :

Bilirubine Totale :

Bilirubine Direct :

LDH :

FNS :

- HGB :
- VGM :
- TCMH :
- CCMH
- Plaquettes :
- GB :

Haptoglobine :

Ferritine :

Taux de réticulocytes :

Frottis sanguin :

-TCD : -sur tube :

- sur microscope :

-sur carte gel :

Annexe IV

BLENDED ANTI-HUMAN GLOBULIN (RABBIT) POLYSPECIFIC ANTI-IgG AND ANTI-C3d



DIRECTIONS FOR USE

AHG Elite (Clear or Green): For Antiglobulin Techniques.

SUMMARY

In 1945, Coombs, Mourant and Race described the use of anti-human globulin serum for detecting red cell-bound non-agglutinating antibodies. In 1957, Dacie et al showed that the antibodies present in antiglobulin sera were directed against certain components of complement. Anti-human globulin reagents detect non-agglutinating antibody molecules as well as molecules of complement attached to red cells following in vivo or in vitro antigen-antibody reactions.

PRINCIPLE

When used by the recommended techniques, the reagents will react with immunoglobulins and/or complement attached to the red cell surface, resulting in agglutination (clumping) of adjacent sensitised cells. Cells not sensitised will not be agglutinated (See Limitations).

REAGENT

Lorne AHG Elite Clear and AHG Elite Green reagents contain anti-IgG derived from rabbits with non-specific activity removed by absorption and mouse monoclonal IgM anti-C3d, Clone BRIC-8. The antibodies are diluted in a buffered solution containing bovine albumin. Each reagent is supplied at optimal dilution, for use with all the recommended techniques stated below without need for further dilution or addition. For lot reference number and expiry date see Vial Label.

Reagent	Colour	Dye Used
AHG Elite Clear	Colourless	None
AHG Elite Green	Green	Patent Blue and Tartrazine

STORAGE

Reagent vials should be stored at 2 - 8°C on receipt. Prolonged storage at temperatures outside this range may result in accelerated loss of reagent reactivity. This reagent has undergone transportation stability studies at 37°C and -25°C as described in document EN13640:2002.

SAMPLE COLLECTION AND PREPARATION

Samples should be drawn aseptically into EDTA to prevent in vitro complement binding and tested as soon as possible. If EDTA is unavailable, samples drawn into ACD, CPD or CPDA-1 are preferable to clotted ones. If only clotted samples are available, do not refrigerate them before testing. All blood samples should be washed at least twice with PBS or Isotonic saline before being tested.

PRECAUTIONS

1. The reagents are intended for in vitro diagnostic use only.
2. If a reagent vial is cracked or leaking, discard the contents immediately.
3. Do not use the reagents past the expiration date (see Vial Label).
4. Do not use the reagents if a precipitate is present.
5. Protective clothing should be worn when handling the reagents, such as disposable gloves and a laboratory coat.
6. The reagents have been filtered through a 0.2 µm capsule to reduce the bio-burden. Once a vial has been opened the contents should remain viable up until the expiry date as long as there is no marked turbidity, which can indicate reagent deterioration or contamination.
7. The reagents contain < 0.1% sodium azide. Sodium azide may be toxic if ingested and may react with lead and copper plumbing to form explosive metal azides. On disposal flush away with large volumes of water.
8. Materials used to produce the products were tested at source and found to be negative for HIV 1+2 and HCV antibodies and HBsAg using approved microbiological tests.
9. No known tests can guarantee that products derived from human or animal sources are free from infectious agents. Care must be taken in the use and disposal of each vial and its contents.

DISPOSAL OF REAGENT AND DEALING WITH SPILLAGES

For information on disposal of the reagents and decontamination of a spillage site see Material Safety Data Sheets, available on request.

CONTROLS AND ADVICE

1. It is recommended a positive control (weak Anti-D 0.1 IU/ml) and a negative control (an inert serum) be test in parallel with each batch of tests. Tests must be considered invalid if controls do not show expected results.
2. The antiglobulin techniques can only be considered valid if all negative tests react positively with IgG sensitised red cells.
3. In the Recommended Techniques one volume is approximately 50µl when using the vial dropper provided.
4. Use of the reagents and the interpretation of results must be carried out by properly trained and qualified personnel in accordance with requirements of the country where the reagents are in use. User must determine the suitability of the reagents for use in other techniques.

REAGENTS AND MATERIALS REQUIRED

- Coombs cell washer.
- Glass test tubes (10 x 75 mm or 12 x 75 mm).
- IgG sensitised red cells e.g. Lorne Coombs Control Cells (Cat # 970010).
- Inert antibody e.g. Lorne Inert AB Serum (Cat # 110010).
- Low Ionic Strength Solution (LISS): Containing 0.03M NaCl, 0.003M Na₂HPO₄: NaH₂PO₄ buffer pH 6.7 at 22°C ± 1°C and 0.24M glycine.
- PBS solution (pH 6.8-7.2) or Isotonic saline solution (pH 6.5-7.5).
- Volumetric pipettes.
- Water bath or dry heat incubator equilibrated to 37°C ± 2°C.
- Weak anti-D e.g. Lorne Precise Weak Anti-D (Cat # 209005).

RECOMMENDED TECHNIQUES

A. Direct Antiglobulin Technique (DAT)

1. Wash 1 volume of test red cells (2-3% suspension in PBS or Isotonic saline) 4 times with PBS or Isotonic saline, taking care to decant saline between washes and resuspend each cell button after each wash. Completely decant saline after last wash.
2. Add 2 volumes of Lorne AHG Elite to each dry cell button.
3. Mix thoroughly and centrifuge all tubes for 20 seconds at 1000 rcf or for a suitable alternative time and force.
4. Gently resuspend red cell button and read macroscopically for agglutination

B. Indirect Antiglobulin Technique (NISS IAT)

1. Prepare a 2-3% suspension of washed test red cells in PBS or Isotonic saline.
2. Place in a labelled test tube: 2 volumes of test serum and 1 volume of test red cell suspension.
3. Mix thoroughly and incubate at 37°C for 15 minutes.
4. Wash test red cells 4 times with PBS or Isotonic saline, taking care to decant saline between washes and resuspend each red cell button after each wash. Completely decant saline after last wash.
5. Add 2 volumes of Lorne AHG Elite to each dry cell button.
6. Mix thoroughly and centrifuge all tubes for 20 seconds at 1000 rcf or for a suitable alternative time and force.
7. Gently resuspend red cell button and read macroscopically for agglutination

C. LISS Indirect Antiglobulin Technique (LISS IAT)

1. Prepare a 1.5-2% suspension of washed test red cells in LISS.
2. Place in a labelled test tube: 2 volumes of test serum and 2 volumes of test red cell suspension.
3. Mix thoroughly and incubate at 37°C for 15 minutes.
4. Follow steps 4 to 7 of NISS IAT above.

INTERPRETATION OF TEST RESULTS

1. Positive: Agglutination of test red cells constitutes a positive test result and within the accepted limitations of the test procedure, indicates the presence of IgG and/or complement (C3) on the test red cells.
2. Negative: No agglutination of the test red cells constitutes a negative result and within the accepted limitations of the test procedure, indicates the absence of IgG and/or complement (C3) on the test red cells.

STABILITY OF THE REACTIONS

1. Washing steps should be completed without interruption and tests centrifuged and read immediately after addition of the reagent. Delays may result in dissociation of antigen-antibody complexes, causing false negative or weak positive results.
2. Caution should be exercised in the interpretation of results of tests performed at temperatures other than those recommended.

LIMITATIONS

1. Red cells that have a positive DAT due to a coating of IgG cannot be typed by the Indirect Antiglobulin Techniques.
2. A positive DAT due to complement sensitisation may not reflect in vivo complement fixation if test cells are from a refrigerated clotted specimen.
3. Inadequate washing of red cells in the indirect antiglobulin techniques may neutralise the anti-human globulin reagent.
4. Following completion of the wash phase excess residual saline may dilute the anti-human globulin, reducing its potency.
5. A negative direct antiglobulin test result does not necessarily preclude clinical diagnosis of ABO Haemolytic Disease of the Newborn or Auto Immune Haemolytic Anaemia. It also does not necessarily rule out HDN, especially if ABO incompatibility is suspected.
6. False positive or false negative results may also occur due to:
 - Contamination of test materials
 - Improper storage, cell concentration, incubation time or temperature
 - Improper or excessive centrifugation

SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS

1. The reagents have been characterised by the procedures mentioned in the Recommended Techniques.
2. Prior to release, each lot of Lorne AHG Elite Clear and AHG Elite Green is tested by the Recommended Techniques against red cells coated with Anti-D, Anti-K and Anti-Fya to check suitable reactivity.
3. The anti-IgG and anti-C3d potencies have been tested against the following minimum potency reference standard obtained from National Institute of Biological Standards and Controls (NIBSC): Anti-AHG reference standard 96/666
4. Anti-C3d potency is demonstrated in tests employing cells coated with C3.
5. The presence of contaminating heterospecific agglutinins or antibodies to C4d has been excluded in tests employing red cells of all ABO groups and cells coated with C4d.
6. The reactivity of any Anti-IgM, Anti-IgA or Anti-light chain components that might be present has not been established.
7. The Quality Control of the reagents was performed using red cells that had been washed with PBS or Isotonic saline prior to use.
8. The reagents comply with the recommendations contained in the latest issue of the Guidelines for the UK Blood Transfusion Services.

DISCLAIMER

1. The user is responsible for the performance of the reagents by any method other than those mentioned in the Recommended Techniques.
2. Any deviations from the Recommended Techniques should be validated prior to use¹².

BIBLIOGRAPHY

1. Coombs RRA, Mourant AE, Race RR. A new test for the detection of weak and "incomplete" Rh antibodies. *Brit J Exp Pathol.* 1945; 26:255.
2. Wright MS, Issitt PD. Anti-complement and the indirect antiglobulin test. *Transfusion* 1979; 19:688-694.
3. Howard JE, Winn LC, Gottlieb CE, Grumet FC, Garratty G, Petz LD. Clinical significance of the anti-complement components of anti-globulin antisera. *Transfusion* 1982; 22:269.
4. Howell P, Giles CM. A detailed serological study of five anti-Jka sera reacting by the antiglobulin technique. *Vox Sang.* 1983; 45: 129-138.
5. Issitt PD, Smith TR. Evaluation of antiglobulin reagents. A seminar on performance evaluation. Washington, DC. American Association of Blood Banks. 1976; 25-73.
6. The Department of Health and Social Security. Health Services Management Antiglobulin Test. False negative results, HN (Hazard) (83) 625 Nov 1983.
7. Bruce M, Watt AH, Hare W, Blue A, Mitchell R. A serious source of error in antiglobulin testing. *Transfusion* 1986; 26: 177-181.
8. The anti-complement reactivity low ionic methods as published by FDA. Recommended Methods for Anti-Human Globulin Evaluation (revision October 1984).
9. Dynan PK. Evaluation of commercially available low ionic strength salt (LISS) solutions. *Med Lab Sci* (1981) 381: 13-20.
10. Voak D, Downie DM, Moore BPL, Ford DS, Engelfreit CP, Case J. Replicate tests for the detection and correction of errors in anti-human globulin (AHG) tests: optimum conditions and quality control. *Haematologia* 1988; 21(1): 3-16.
11. Guidelines for the Blood Transfusion Service in the United Kingdom. H.M.S.O. Current Edition.
12. British Committee for Standards in Haematology, Blood Transfusion Task Force. Recommendations for evaluation, validation and implementation of new techniques for blood grouping, antibody screening and cross matching. *Transfusion Medicine*, 1995, 5, 145-150.

AVAILABLE REAGENT SIZES

	Vial Size	Catalogue Number
Lorne AHG Elite (Clear)	10 ml	415010
	1000 ml	415000*
Lorne AHG Elite (Green)	10 ml	435010
	1000 ml	435000*

*This size is For Further Manufacturing Use (FFMU) only and is therefore not CE marked.

TABLE OF SYMBOLS

	Batch Number		In-vitro Diagnostic
	Catalogue Reference		Store At
	Expiry Date		Manufacturer
	Read Pack Insert		



Lorne Laboratories Limited

Unit 1 Cutbush Park Industrial Estate, Danehill, Lower Earley, Berkshire RG6 4UT United Kingdom
Tel: +44 (0) 118 921 2264 Fax: +44 (0) 118 986 4518 Email: info@lornelabs.com www.lornelabs.com

Annexe V

ID-DiaClon Anti-D

Français

B007531 02.13

Identification de produit : **09410**

UTILISATION PRÉVUE

ID-DiaClon Anti-D sert à confirmer les résultats des tests sur le Rhésus (Rh) négatif et la caractérisation complémentaire des variants D (D faible et partiel).

INTRODUCTION

Le recours de plus en plus fréquent à des anticorps monoclonaux anti-D à partir de différentes lignées cellulaires peut créer des problèmes d'interprétation des tests sur l'antigène D, en particulier la différenciation des D faible et partiel (variants D).

Dans le système par carte-ID, une réaction +++ à ++++ indique la présence de l'antigène D et des réactions plus faibles, un D faible. Ces réactions positives faibles peuvent varier en fonction de la lignée cellulaire monoclonale utilisée.

Les cellules donnant des réactions négatives dans le cadre du test direct et positives par test indirect à l'antiglobuline (TIA ou test de Coombs indirect) sont considérées comme des antigènes D faible et partiel (variants D).

On peut procéder à une vérification supplémentaire dans le système d'identification à l'aide d'un anticorps anti-D monoclonal formulé pour définir les D faibles et le DVI au moyen de la carte ID "Coombs Anti-IgG" ou "LISS/Coombs".

RÉACTIFS

IVD

ID-DiaClon Anti-D" contenant de l'anti-D monoclonal de nature IgG (lignée cellulaire ESD1), réactif prêt à l'emploi, en flacon de 5 ml. Conservateurs : les antibiotiques triméthoprime et sulfaméthoxazole.

Attention : Tout réactif doit être considéré comme potentiellement infectieux.



Stabilité : voir la date de péremption sur l'étiquette.

RÉACTIFS SUPPLÉMENTAIRES NÉCESSAIRES

- Carte-ID "Coombs Anti-IgG" avec 6 microtubes contenant de l'antiglobuline humaine IgG (de lapin), incluse dans le gel. Conservateur : < 0,1% NaN₃.
- Carte-ID "LISS/Coombs" : avec 6 microtubes contenant de l'antiglobuline humaine polyspécifique (anti-IgG de lapin et anti-C3d monoclonal, lignée cellulaire C139-9) inclus dans le gel. Conservateur : < 0,1% NaN₃.
- ID-Diluent 2 : LISS modifié pour suspensions d'hématies.

(voir mode d'emploi correspondant)

MATÉRIAUX SUPPLÉMENTAIRES NÉCESSAIRES

- ID-Dispenser
- ID-Pipetor
- ID-Tips (cônes pour pipette)
- Tubes pour suspensions
- ID-Table de travail
- ID-Incubateur à 37 °C
- ID-Centrifuge 6, 12 ou 24

ÉCHANTILLONS

Afin d'obtenir des résultats fiables, la détermination devrait se faire sur du matériel fraîchement prélevé ou conforme aux exigences du laboratoire auquel la demande d'analyses est adressée. L'échantillon devrait être prélevé de préférence sur anticoagulant citrate, EDTA ou CPD-A. Du sang prélevé sans anticoagulant (natif) peut également être utilisé.

PRÉPARATION DE L'ÉCHANTILLON DE SANG

Préparer une suspension d'hématies à 0,8% en ID-Diluent 2, comme suit :
Ramener le diluant à température ambiante avant utilisation.

1. Distribuer 1,0 ml d'ID-Diluent 2 dans un tube propre.
2. Ajouter 10 µl de culot d'hématies, mélanger doucement.

La suspension d'hématies peut être utilisée immédiatement.

CONTRÔLES

Des échantillons D faible positifs et négatifs connus devront être inclus pour valier les résultats. Comme il est possible d'obtenir des résultats faussement positifs dans le cas où le test direct d'antiglobuline (TDA) est positif, tous les résultats positifs devraient être confirmés par un TDA négatif en utilisant la carte-ID "Coombs Anti-IgG" ou la carte-ID "LISS/Coombs".

MÉTHODE

Ne pas utiliser les cartes-ID présentant des signes de dessèchement, des bulles d'air dans le gel, un système de fermeture endommagé, des gouttelettes de gel ou de surnageant sur les parois supérieures des microtubes ou sur la facette de la languette d'aluminium.

Ramener les réactifs à température ambiante (18–25 °C) avant utilisation.

1. Identifier la carte-ID avec le numéro d'identification du donneur/du nouveau-ré toute identification complémentaire appropriée (voir remarques).
2. Décoller la languette d'aluminium des microtubes nécessaires en tenant la carte-ID en position verticale.
3. Distribuer 50 µl de la suspension d'hématies dans le microtube.
4. Ajouter 50 µl du réactif ID-DiaClon Anti-D" pour confirmation de D faible par TIA au microtube.
5. Incuber la carte-ID 15 minutes à 37 °C dans l'ID-Incubateur.
6. Centrifuger la carte-ID 10 minutes dans l'ID-Centrifuge.
7. Lire et noter les réactions.

BIO-RAD

ID-DiaClon Anti-D

Français

B007531 02.13

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

A) Principe

Positif : Hématies agglutinées formant une ligne rouge à la surface du gel ou des agglutinats dispersés dans le gel.

Négatif : Hématies en culot compact au fond du microtube.

B) Réactions de RhD en utilisant "ID-DiaClon Anti-D"

RhD positif	RhD faible/DVI *	RhD négatif
++++	= à +++	-

* Afin de distinguer les variants (D faible et partiel), il est conseillé d'approfondir l'analyse de l'échantillon avec l'ID-Partial RhD Typing Set (REF. 001451) ou l'Extended Partial RhD Typing Set (REF. 001461) (cf. notices des boîtes correspondantes).

Différenciation de RhD et RhD faible :	réactions	réactions
Test direct sur carte-ID avec anti-D	+++ à ++++	++ à nég.
Test avec "ID-DiaClon Anti-D" et la carte-ID "Coombs Anti-IgG" ou la carte-ID "LISS/Coombs".	++++	+++ à +
Résultats	RhD positif	RhD faible/DVI

REMARQUES

L'anti-D contenu dans cette carte a été sélectionné pour réagir avec les phénomènes DVI.

LIMITES

- Les cartes-ID présentant des bulles d'air dans le gel ou des gouttelettes dans la partie supérieure des microtubes ou sur la languette métallique doivent être centrifugées avant utilisation.
- Des contaminations, bactériennes ou autres, du matériel utilisé peuvent provoquer des résultats faussement positifs ou faussement négatifs.
- Des résidus de fibrine dans la suspension d'hématies peuvent emprisonner quelques cellules non agglutinées, formant ainsi une fine ligne rose à la surface du gel, alors que la plupart des hématies sont dans le fond du microtube après centrifugation.
- L'observation stricte des méthodes et l'emploi de l'équipement recommandé sont essentiels. L'équipement doit être régulièrement contrôlé selon les procédures des BPL.
- L'utilisation de diluants autres que l'ID-Diluent 2 peut modifier les résultats.
- Des suspensions d'hématies trop concentrées ou trop diluées peuvent provoquer des résultats aberrants.

CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCE

Les performances d'ID-DiaClon Anti-D ont été évaluées dans le cadre d'études internes réalisées à partir d'un groupe d'échantillons de variants. Ce réactif a permis de détecter les D faibles de type 1, 2, 3, 4.0, 4.1, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 15 et 17. La lignée cellulaire contenue dans ID-DiaClon anti-D s'avère également détecter les variants suivants : DII/DNU, DIII, DV (évaluation de DVa uniquement), DCS, DVI, DVII, DOL, DER, DAR et DAR-E, DKH/DAU-4 mais pas les suivants : DV, DRT et DHAR (3).

BIBLIOGRAPHIE

- Mollison P. L., Engelfriet C. P. and Contreras M.: Blood Transfusion in Clinical Medicine, 10th ed. 1997; Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Lapierre Y., Rigal D., Adam J. et al.: The gel test; A new way to detect red cell antigen-antibody reactions. Transfusion 1990; 30: 109-113.
- Robb JS and Allan JC. (2005). Evaluation of a New Kit for the Identification of partial RhD Types by Hemagglutination. Transfusion Medicine, 15, Supplement 1: p51.

PRODUITS

ID-DiaClon Anti-D

1 x 5 ml REF 007531

Ces produits sont garantis quant à leurs propriétés et qualités stipulées sur l'étiquette et dans le mode opératoire. Le fabricant décline toute responsabilité pour les cas où ces produits seraient employés ou vendus à d'autres usages.

Les modifications apportées à la version 06.12 sont colorées en gris.

 DiaMed GmbH
Pra Rond 23
1785 Cressier FR
Suisse



 BIO-RAD

Annexe VI

Coombs Anti-IgG

ID-Card

Français

B00402307.15

Test direct et indirect à l'antiglobuline

Identification de produit : 50540

INTRODUCTION

La fonction la plus importante du réactif antiglobuline est de détecter la présence d'anticorps de type IgG. La fraction anti-complément (C3d) permet de mettre en évidence les rares anticorps détectables seulement par leur capacité à fixer le complément. Cependant, selon les exigences du laboratoire, l'antiglobuline anti-IgG peut être préférée pour éviter l'interférence du composant complément fixé non-spécifiquement aux hématies.

Dans le test indirect à l'antiglobuline (TIA) avec la carte-ID Coombs Anti-IgG, les procédures de lavage sont supprimées puisque, la suspension d'hématies étant distribuée dans un premier temps, elle crée une barrière au-dessus du gel, ce qui évitera la neutralisation de l'anti-globuline humaine par les immunoglobulines dans le plasma/sérum du patient.

La carte-ID Coombs Anti-IgG permet de tester simultanément 6 échantillons, pour les tests directs et indirects à l'antiglobuline (TDA/TIA), pour la recherche et l'identification d'anticorps et le test de compatibilité.

RÉACTIFS

IVD

Carte-ID Coombs Anti-IgG avec 6 microtubes contenant de l'antiglobuline humaine anti-IgG (de lapin), inclus dans le gel.
Conservateur : < 0,1% NaN₃.

L'antiglobuline humaine anti-IgG utilisée dans la carte-ID Coombs Anti-IgG n'est pas spécifique uniquement pour des chaînes lourdes et peut donc aussi réagir avec les chaînes légères kappa (k) et lambda (l) des molécules IgA ou IgM.



Ne pas stocker à proximité d'une source de chaleur, d'une climatisation ou d'une sortie de ventilation. Stabilité : voir date de péremption sur l'étiquette.

RÉACTIFS SUPPLÉMENTAIRES NÉCESSAIRES

- ID-Diluent 2 : LISS modifié pour suspensions d'hématies.
- Hématies-tests: ID-DiaCell III, II/I, II, III; ID-DiaScreen; ID-DiaPanel.

(voir mode d'emploi correspondant)

MATÉRIAUX SUPPLÉMENTAIRES NÉCESSAIRES

- ID-Dispenser
- ID-Pipetor
- ID-Tips (cônes pour pipette)
- Tubes pour suspensions
- ID-Table de travail
- ID-Incubateur 37°C
- ID-Centrifuge 6, 12, ou 24

ÉCHANTILLONS

Afin d'obtenir des résultats fiables, la détermination devrait se faire sur du matériel fraîchement prélevé ou conforme aux exigences du laboratoire auquel la demande d'analyse est adressée. L'échantillon devrait être prélevé de préférence sur anticoagulant citrate, EDTA ou CPD-A. Le sang prélevé sans anticoagulant (natif) peut également être utilisé.

Lorsque l'utilisation de sérum est préférable à celle de plasma, le sérum doit être obtenu par centrifugation à 1500 g pendant 10 minutes pour éviter des résidus de fibrine qui pourraient interférer avec la réaction.

PRÉPARATION DE L'ÉCHANTILLON DE SANG

a) Hématies

Pour l'épreuve croisée, l'autocontrôle et le test direct à l'antiglobuline (TDA), préparer une suspension d'hématies à 0,8% en ID-Diluent 2 comme suit :

Ramener le diluant à température ambiante avant utilisation.

1. Distribuer 1,0 ml d'ID-Diluent 2 dans un tube propre.
2. Ajouter 10 µl de culot d'hématies, mélanger doucement. Lors de l'utilisation de sang provenant d'un segment de la poche de sang, ajouter 20 µl de sang à 1,0 ml de ID-Diluent 2.

La suspension d'hématies peut être utilisée immédiatement.

b) Plasma ou sérum pour le test indirect à l'antiglobuline (TIA)

Si les échantillons ne sont pas testés immédiatement, ils devront être conservés après décantation à 2–8°C. Pour une conservation supérieure à 48 heures, il est conseillé de les congeler à -20°C en accord avec les réglementations locales/nationales/et les BPL.

MÉTHODE

Ne pas utiliser les cartes-ID présentant des signes de dessèchement, des bulles d'air dans le gel, un système de fermeture endommagé, des gouttelettes

dégel ou des urtiants sur les parois supérieures des microtubes sous la face interne de la languette d'aluminium.
Ramener toutes les hématies-tests et le plasma ou sérum à température ambiante avant utilisation.

A) Test direct à l'antiglobuline (TDA)

1. Identifier le microtube approprié de la carte-ID Coombs Anti-IgG par le nom ou le numéro du patient ou du donneur.
2. Décoller la languette d'aluminium des microtubes nécessaires en tenant la carte-ID en position verticale.
3. Distribuer 50 µl de la suspension d'hématies au microtube approprié.
4. Centrifuger la carte-ID 10 minutes dans l'ID-Centrifuge.
5. Lire et noter les réactions.

B) Recherche d'anticorps (TIA)

Utiliser les hématies-tests prêts à l'emploi : 1D-DiaCell II, III ; 1D-DiaCell II, III ou 1D-DiaScreen I, II, III, IV.

1. Identifier les microtubes appropriés de la carte-ID Coombs Anti-IgG par le nom ou le numéro du patient.
2. Décoller la languette d'aluminium des microtubes nécessaires en tenant la carte-ID en position verticale.
3. Distribuer 50 µl de chacune des hématies-tests aux microtubes appropriés.
4. Dans le cas où un autocontrôle est inclus, distribuer 50 µl de la suspension d'hématies du patient au microtube approprié.
5. Ajouter 25 µl de sérum ou de plasma du patient dans chaque microtube.
6. Incuber la carte-ID 15 minutes à 37°C dans l'ID-Incubateur.
7. Centrifuger la carte-ID 10 minutes dans l'ID-Centrifuge.

8. Lire et noter les réactions.



c) Identification des anticorps(TIA)

Utiliser les hématies-tests prêtes à l'emploi de l'ID-DiaPanel.

1. Identifier deux cartes-ID Coombs Anti-IgG⁺ par leur nom ou leur numéro de patient ou du donneur.
2. Décoller la languette d'aluminium des microtubes nécessaires en tenant la carte-ID en position verticale.
3. Distribuer 50 µl de chacune des hématies-tests ID-DiaPanel aux microtubes appropriés (marqués 1 à 11).
4. Distribuer 50 µl de la suspension d'hématies de l'échantillon au 12^{ème} microtube (autocontrôle).
5. Ajouter 25 µl de plasma ou sérum de patient aux 12 microtubes.
6. Incuber la carte-ID 15 minutes à 37°C dans l'ID-Incubateur.
7. Centrifuger la carte-ID 10 minutes dans l'ID-Centrifuge.
8. Lire et noter les réactions.

d) Épreuve croisée(TIA)

1. Identifier les microtubes appropriés de la carte-ID Coombs Anti-IgG⁺ par leur nom ou leur numéro de receveur et du donneur.
2. Décoller la languette d'aluminium des microtubes nécessaires en tenant la carte-ID en position verticale.
3. Distribuer 50 µl de la suspension d'hématies du/des donneur(s) aux microtubes appropriés.
4. Pour l'autocontrôle, distribuer 50 µl de la suspension d'hématies du patient au microtube approprié.
5. Ajouter 25 µl de plasma ou sérum de patient à chaque microtube.
6. Incuber la carte-ID 15 minutes à 37°C dans l'ID-Incubateur.
7. Centrifuger la carte-ID 10 minutes dans l'ID-Centrifuge.
8. Lire et noter les réactions.

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS**A) Principe**

Positif: Hématies agglutinées formant un ligne rouge à la surface du gel ou des agglutinats dispersés dans le gel.

Négatif: Hématies en culot compact au fond du microtube.

B) Réactions pour:**I. Test direct à l'antiglobuline(TDA)**

- Une réaction positive de \pm à +++ indique que les hématies du patient sont sensibilisées un anticorps IgG.
- Une réaction négative indique l'absence d'anticorps IgG détectables sur les hématies.

II. Recherche d'anticorps

- Une réaction négative indique l'absence d'anticorps irréguliers détectables dans le sérum ou le plasma du patient.

- Des réactions positives indiquent la présence d'anticorps irréguliers. Inscrivez les résultats obtenus sur la table d'antigènes jointe. Vérifiez que le numéro de lot des hématies-tests ID-DiaCell III, II, I ou ID-DiaScreen I, II, III, IV correspond bien au numéro de lot indiqué sur la table d'antigènes.
- Une réaction positive avec quel que soit l'autocontrôle négatif indique la présence d'anticorps spécifiques.
- Une réaction positive avec toutes les hématies-tests et un autocontrôle positif est probablement due à des autoanticorps ou des réactions non-spécifiques.
- Dans le cas d'une réaction positive avec toutes les hématies-tests et un autocontrôle positif, mais avec une ou plusieurs hématies-tests montrant une réaction positive plus intense que l'autocontrôle, pratiquez d'autres investigations pour éliminer la présence d'un alloanticorps masqué par l'autoanticorps.

III. Identification d'anticorps

- Une réaction positive indique la présence d'anticorps irréguliers. Inscrivez les résultats obtenus sur la table d'antigènes jointe. Vérifiez que le lot des hématies-tests de l'ID-DiaPanel correspond bien au numéro de lot indiqué sur la table d'antigènes. Selon la distribution de la réaction et la configuration antigénique du panel, le type d'anticorps présent peut, dans la plupart des cas, être identifié (l'autocontrôle doit être négatif).
- Des réactions positives avec toutes les hématies-tests et un autocontrôle négatif indiquent la présence d'un alloanticorps dirigé contre un antigène de haute fréquence.
- Des réactions positives avec toutes les hématies-tests et un autocontrôle positif indiquent la présence d'autoanticorps libres ou de réactions non-spécifiques.

IV. Épreuve croisée

- Une réaction négative indique qu'il n'y a pas, chez le receveur, d'anticorps détectable, dirigés contre les antigènes érythrocytaires du donneur.
- Une réaction positive indique une incompatibilité entre le donneur et le receveur. Vérifiez les groupes sanguins ABO et Rh D à la fois du donneur et du receveur. Effectuez une recherche d'anticorps irréguliers chez le receveur. Pour le groupe complet ABO et Rh D consultez les notices correspondantes.

LIMITES

- Les cartes-ID présentant des bulles d'air dans le gel ou des gouttelettes dans la partie supérieure des microtubes ou sur la languette métallique doivent être centrifugées avant utilisation.
- Certains médicaments sont connus pour entraîner des tests à l'antiglobuline humaine positifs.
- Quelques états pathologiques ont été décrits lors de résultats positifs avec le test à l'antiglobuline humaine.
- Des contaminations, bactériennes ou autres, du matériel utilisé peuvent provoquer des résultats faussement positifs ou faussement négatifs.
- Des résidus de fibrine dans la suspension d'hématies peuvent emprisonner quelques cellules non agglutinées, formant ainsi une fine ligne rose à la surface du gel, alors que la plupart des hématies sont dans le fond du microtube après centrifugation.
- L'observation stricte des méthodes et l'emploi de l'équipement recommandés sont essentiels. L'équipement doit être régulièrement contrôlé selon les procédures des BPL.
- L'utilisation de diluants autres que l'ID-Diluent 2 peut modifier les résultats.
- Des suspensions d'hématies trop concentrées ou trop diluées peuvent provoquer des résultats aberrants.

BIBLIOGRAPHIE

- Coombs, R. R. A., Mourant, A. E. and Race, R. R.: Lancet 1945; 2: 15.
- Coombs, R. R. A., Mourant, A. E. and Race, R. R.: Brit. J. Exp. Path 1945; 26: 255.
- Lapierre, Y., Rigal, D., Adam, J. et al.: The gel test; A new way to detect red cell antigen-antibody reactions. Transfusion 1990; 30: 109-113.
- Technical Manual; R. H. Walker (ed.); American Association of Blood Banks; 12th ed. 1996.

PRODUITS

Carte-IDCoombsAnti-IgG*

1x12.REF004023

Ces produits sont garantis quant à leurs propriétés et qualités stipulées sur l'étiquette et dans le mode opératoire. Le fabricant décline toute responsabilité pour les cas où ces produits seraient employés ou vendus à d'autres usages.

Les modifications apportées à la version 08.13 sont colorées en gris.



DiaMed GmbH Pra Rond 23
1785 Cressier FR Switzerland
0123



Annexe VII

**BLENDED ANTI-HUMAN GLOBULIN (RABBIT)
POLYSPECIFIC ANTI-IgG AND ANTI-C3d**



DIRECTIONS FOR USE

AHG Elite (Clear or Green): For Antiglobulin Techniques.

SUMMARY

In 1945, Coombs, Mourant and Race described the use of anti-human globulin serum for detecting red cell-bound non-agglutinating antibodies. In 1957, Dacie et al showed that the antibodies present in antiglobulin sera were directed against certain components of complement. Anti-human globulin reagents detect non-agglutinating antibody molecules as well as molecules of complement attached to red cells following in vivo or in vitro antigen-antibody reactions.

PRINCIPLE

When used by the recommended techniques, the reagents will react with immunoglobulins and/or complement attached to the red cell surface, resulting in agglutination (clumping) of adjacent sensitised cells. Cells not sensitised will not be agglutinated (See Limitations).

REAGENT

Lorne AHG Elite Clear and AHG Elite Green reagents contain anti-IgG derived from rabbits with non-specific activity removed by absorption and mouse monoclonal IgM anti-C3d, Clone BRIC-8. The antibodies are diluted in a buffered solution containing bovine albumin. Each reagent is supplied at optimal dilution, for use with all the recommended techniques stated below without need for further dilution or addition. For lot reference number and expiry date see Vial Label.

Reagent	Colour	Dye Used
AHG Elite Clear	Colourless	None
AHG Elite Green	Green	Patent Blue and Tartrazine

STORAGE

Reagent vials should be stored at 2 - 8°C on receipt. Prolonged storage at temperatures outside this range may result in accelerated loss of reagent activity. This reagent has undergone transportation stability studies at 37°C and -25°C as described in document EN13640:2002.

SAMPLE COLLECTION AND PREPARATION

Samples should be drawn aseptically into EDTA to prevent in vitro complement binding and tested as soon as possible. If EDTA is unavailable, samples drawn into ACD, CPD or CPDA-1 are preferable to clotted ones. If only clotted samples are available, do not refrigerate them before testing. All blood samples should be washed at least twice with PBS or Isotonic saline before being tested.

PRECAUTIONS

1. The reagents are intended for in vitro diagnostic use only.
2. If a reagent vial is cracked or leaking, discard the contents immediately.
3. Do not use the reagents past the expiration date (see Vial Label).
4. Do not use the reagents if a precipitate is present.
5. Protective clothing should be worn when handling the reagents, such as disposable gloves and a laboratory coat.
6. The reagents have been filtered through a 0.2 µm capsule to reduce the bio-burden. Once a vial has been opened the contents should remain viable up until the expiry date as long as there is no marked turbidity, which can indicate reagent deterioration or contamination.
7. The reagents contain < 0.1% sodium azide. Sodium azide may be toxic if ingested and may react with lead and copper plumbing to form explosive metal azides. On disposal flush away with large volumes of water.
8. Materials used to produce the products were tested at source and found to be negative for HIV 1+2 and HCV antibodies and HBsAg using approved microbiological tests.
9. No known tests can guarantee that products derived from human or animal sources are free from infectious agents. Care must be taken in the use and disposal of each vial and its contents.

DISPOSAL OF REAGENT AND DEALING WITH SPILLAGES

For information on disposal of the reagents and decontamination of a spillage site see Material Safety Data Sheets, available on request.

CONTROLS AND ADVICE

1. It is recommended a positive control (weak Anti-D 0.1 IU/ml) and a negative control (an inert serum) be test in parallel with each batch of tests. Tests must be considered invalid if controls do not show expected results.
2. The antiglobulin techniques can only be considered valid if all negative tests react positively with IgG sensitised red cells.
3. In the Recommended Techniques one volume is approximately 50µl when using the vial dropper provided.
4. Use of the reagents and the interpretation of results must be carried out by properly trained and qualified personnel in accordance with requirements of the country where the reagents are in use. User must determine the suitability of the reagents for use in other techniques.

REAGENTS AND MATERIALS REQUIRED

- Coombs cell washer.
- Glass test tubes (10 x 75 mm or 12 x 75 mm).
- IgG sensitised red cells e.g. Lorne Coombs Control Cells (Cat # 970010).
- Inert antibody e.g. Lorne Inert AB Serum (Cat # 110010).
- Low Ionic Strength Solution (LISS): Containing 0.03M NaCl, 0.003M Na₂HPO₄: NaH₂PO₄ buffer pH 6.7 at 22°C ± 1°C and 0.24M glycine.
- PBS solution (pH 6.8-7.2) or Isotonic saline solution (pH 6.5-7.5).
- Volumetric pipettes.
- Water bath or dry heat incubator equilibrated to 37°C ± 2°C.
- Weak anti-D e.g. Lorne Precise Weak Anti-D (Cat # 209005).

RECOMMENDED TECHNIQUES

A. Direct Antiglobulin Technique (DAT)

1. Wash 1 volume of test red cells (2-3% suspension in PBS or Isotonic saline) 4 times with PBS or Isotonic saline, taking care to decant saline between washes and resuspend each cell button after each wash. Completely decant saline after last wash.
2. Add 2 volumes of Lorne AHG Elite to each dry cell button.
3. Mix thoroughly and centrifuge all tubes for 20 seconds at 1000 rcf or for a suitable alternative time and force.
4. Gently resuspend red cell button and read macroscopically for agglutination

B. Indirect Antiglobulin Technique (NISS IAT)

1. Prepare a 2-3% suspension of washed test red cells in PBS or Isotonic saline.
2. Place in a labelled test tube: 2 volumes of test serum and 1 volume of test red cell suspension.
3. Mix thoroughly and incubate at 37°C for 15 minutes.
4. Wash test red cells 4 times with PBS or Isotonic saline, taking care to decant saline between washes and resuspend each red cell button after each wash. Completely decant saline after last wash.
5. Add 2 volumes of Lorne AHG Elite to each dry cell button.
6. Mix thoroughly and centrifuge all tubes for 20 seconds at 1000 rcf or for a suitable alternative time and force.
7. Gently resuspend red cell button and read macroscopically for agglutination

C. LISS Indirect Antiglobulin Technique (LISS IAT)

1. Prepare a 1.5-2% suspension of washed test red cells in LISS.
2. Place in a labelled test tube: 2 volumes of test serum and 2 volumes of test red cell suspension.
3. Mix thoroughly and incubate at 37°C for 15 minutes.
4. Follow steps 4 to 7 of NISS IAT above.

INTERPRETATION OF TEST RESULTS

1. Positive: Agglutination of test red cells constitutes a positive test result and within the accepted limitations of the test procedure, indicates the presence of IgG and/or complement (C3) on the test red cells.
2. Negative: No agglutination of the test red cells constitutes a negative result and within the accepted limitations of the test procedure, indicates the absence of IgG and/or complement (C3) on the test red cells.

STABILITY OF THE REACTIONS

1. Washing steps should be completed without interruption and tests centrifuged and read immediately after addition of the reagent. Delays may result in dissociation of antigen-antibody complexes, causing false negative or weak positive results.
2. Caution should be exercised in the interpretation of results of tests performed at temperatures other than those recommended.

LIMITATIONS

1. Red cells that have a positive DAT due to a coating of IgG cannot be typed by the Indirect Antiglobulin Techniques.
2. A positive DAT due to complement sensitisation may not reflect in vivo complement fixation if test cells are from a refrigerated clotted specimen.
3. Inadequate washing of red cells in the indirect antiglobulin techniques may neutralise the anti-human globulin reagent.
4. Following completion of the wash phase excess residual saline may dilute the anti-human globulin, reducing its potency.
5. A negative direct antiglobulin test result does not necessarily preclude clinical diagnosis of ABO Haemolytic Disease of the Newborn or Auto Immune Haemolytic Anaemia. It also does not necessarily rule out HDN, especially if ABO incompatibility is suspected.
6. False positive or false negative results may also occur due to:
 - Contamination of test materials
 - Improper storage, cell concentration, incubation time or temperature
 - Improper or excessive centrifugation

5. British Committee for Standards in Haematology, Blood Transfusion Task Force. Recommendations for evaluation, validation and implementation of new techniques for blood grouping, antibody screening and cross matching. *Transfusion Medicine*, 1995, 5, 145-150.

AVAILABLE REAGENT SIZES

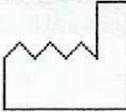
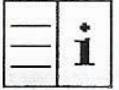
Vial Size	Catalogue Number
2 ml	427002
1000 ml	427000*

*This size is For Further Manufacturing Use (FFMU) only and is therefore not CE marked.

For the availability of other sizes, please contact:

Lorne Laboratories Limited
 Unit 1 Cutbush Park Industrial Estate
 Danehill
 Lower Earley, Reading,
 Berkshire, RG6 4UT
 United Kingdom
 Tel: +44 (0) 118 921 2264
 Fax: +44 (0) 118 986 4518
 E-mail: info@lornelabs.com

TABLE OF SYMBOLS

	Batch Number		<i>in-vitro</i> Diagnostic
	Catalogue Reference		Store At
	Expiry Date		Manufacturer
	Read Pack Insert		

AnnexeVIII

Tableau : les valeurs biologiques normales de FNS selon l'âge et le sexe (selon l'OMS).

	Homme	Femme	Enfant 3-12 ans	Nourisson 3mois-2 ans	NN
GR 10 ¹² /L	4,5-5,8	4-5,8	3,6-5,5	3,2-4,2	3,9-5,5
Hb g/dl	13-18	12-16	11-15	10-12,5	13,5-19,5
VGM	83-98	83-98	76-93	72-85	98-118
TGMH	27-32	27-32	24-32	25-34	30-36
CCMH	32-36	32-36	32-36	32-36	32-36
GB	4-10	4-10	4,5-12	6-17	10-25
Plaquettes	150-500	150-500	150-450	150-600	150-600
Taux de réticulocyte	150 000	150 000	150 000	150 000	150 000
Ferritine microg/ml	15-150	15-150	15-150	15-150	15-150

GLOSSAIRE

1. **Splénomégalie** est l'augmentation du volume de la rate, dans le rôle est de produire les lymphocytes et de détruire les globules rouges anormaux ou trop

vieux. Une augmentation de son volume peut être retrouvée dans de nombreuses affections telles que les maladies hémolytiques.

2. **L'ictère** : est synonyme de jaunisse, il correspond à une coloration jaune de la peau et des muqueuses due à l'accumulation dans les tissus de bilirubine. La première manifestation visible d'un ictère apparaît au niveau des conjonctives oculaires.

On distingue :

- Les ictères à bilirubine non conjuguée (ou libre), apparaissent dans certaines anémies avec hémolyse aigue, dans les destructions exagérées de globules rouges ou encore par défaut enzymatique hépatique transitoire (ictère du nouveau-né) ou définitif (maladies héréditaires de Gilbert, de Crigler-Najjar). Dans ce cas, les urines ne sont pas colorées par le pigment.

-Les ictères à bilirubine conjuguée, caractérisés par la coloration brune des urines survenant lors des hépatites, des cirrhoses, des malformations des voies biliaires ou de leur obstruction ou encore les maladies héréditaires avec déficit enzymatique ne permettant pas l'excrétion biliaire de la bilirubine conjuguée.

3. **La bilirubine** est un pigment jaune, produit de dégradation de l'hémoglobine (lors de la destruction des globules rouges) mais aussi d'autres hémoprotéines (cytochromes, catalases...). Son catabolisme est assuré par le foie.

- bilirubine libre est transformée (par le foie) en « bilirubine conjuguée=bilirubine directe » non toxique (phénomène dit de « conjugaison hépatique » consistant pour le foie à conjuguer cette molécule avec de l'acide glucuronique (dérivé du glucose) par glucurono-conjugaison.
- La « bilirubine conjuguée », soluble sera en partie filtrée par le rein qui produit l'urobiline (retrouvée dans l'urine) ;
Toutefois, une partie de la bilirubine conjuguée est recaptée par les hépatocytes du foie et sécrétée dans la bile et donc injectée dans l'intestin grêle où elle sera ensuite dégradée par la flore intestinale via des enzymes bactériennes : est ainsi obtenue de la stercobiline, pigment brun donnant leur couleur brun foncé aux matières fécales.

Dans l'organisme humain normal, le taux de « bilirubine conjuguée » est inférieur à 3mg /l, et bilirubine totale est inférieur à 10 mg/l.

4. **La pâleur** est une couleur de la peau ou des muqueuses pouvant être causée par une maladie, un choc émotionnel ou stress, une stimulation, manque d'exposition à la lumière de soleil, anémie ou génétique, et due à un taux réduit d'oxyhémoglobine.
5. **La numération réticulocytaire** : est le nombre de réticulocytes dans le sang, est utilisée pour le diagnostic des anémies, mais aussi pour l'évaluation de la réponse aux traitements des patients aplasique ou ayant subi une greffe de moelle osseuse. Cette analyse peut aussi être utile dans d'autres situations, par exemple en cas de traitements toxiques pour la moelle osseuse, ou pour rechercher la présence d'hémorragies cachées.
6. **Un frottis sanguin** est du sang étalé sur une lame de microscope, dans le but d'observer ses cellules et aussi les dénombrer. Le frottis doit subir une coloration pour révéler certaines cellules qui sans cela serait transparentes, donc non visibles. Il permet également de repérer un éventuel parasite dans le sang comme l'agent du paludisme, *plasmodium falciparum*.
7. **Les lactates déshydrogénases (LDH) ou déshydrogénases lactiques** : elles catalysent la conversion du pyruvate en lactate et vice-versa.

Le cofacteur le plus fréquent des lactates déshydrogénases est le NADH qui est converti en NAD⁺. Cette conversion est la réaction de base de la fermentation lactique qui permet de régénérer le NAD⁺ à l'issue de la glycolyse.

La LDH est souvent utilisée comme marqueur de dommage tissulaire. Comme la LDH est abondante dans les globules rouges, elle peut servir de marqueur de l'hémolyse.

Les valeurs usuelles : [200-400] UI/l

8. **La ferritine** est une protéine permettant le stockage du fer. Elle a une fonction de réserve et de détoxification du fer. Le dosage de la ferritine plasmatique est le reflet des réserves tissulaires mobilisables. Son dosage permet d'évaluer les réserves en fer et ainsi de dépister précocement une carence en fer ou à l'opposé d'apprécier une remontée des réserves lors d'un traitement par supplémentation ferrique.

L'hyperferritinémie peut être classée suivant l'existence ou non d'une surcharge en fer, sans surcharge en fer peut être due à une anémie hémolytiques.

Les valeurs usuelles : [15-150] µg/ml

9. **L'hémoglobine (Hb)** est une métalloprotéine contenant du fer, présente essentiellement dans le sang au sein de leurs globules rouges. L'hémoglobine est une protéine hétérotétramérique formée de chaînes peptidiques identiques deux à deux. L'hémoglobine A (HbA) représente environ 95 % des molécules d'hémoglobines chez l'adulte, constituée de deux chaînes α et de deux chaînes β ; il existe également une hémoglobine A₂ (HbA₂) de formule $\alpha_2\delta_2$, et une hémoglobine F (HbF, fœtale) de formule $\alpha_2\gamma_2$. Chacune des quatre chaînes est associée à un groupe prosthétique appelé hème et constitué d'un cation de fer complexé avec une porphyrine. L'hémoglobine est donc une hémoprotéine.

Elle a pour fonction de transporter l'oxygène O₂ depuis l'appareil respiratoire (poumons, branchies) vers le reste de l'organisme. Elle assure le transport d'autres gaz notamment le transport d'une partie du dioxyde de carbone CO₂ produit par la respiration cellulaire.

- Les valeurs normales du taux d'hémoglobine dépendent du sexe et de l'âge du sujet. Un taux d'hémoglobine inférieur à la norme définit une anémie. (Annexe VIII)

10. **Hématocrite** est le volume occupé par les globules rouges circulant dans le sang exprimé en pourcentage par rapport au volume total du sang. C'est aussi le nom de l'examen permettant de déterminer ce paramètre, qui est souvent abrégé en Ht. Cette mesure est indispensable pour calculer le volume globulaire moyen (VGM) et la concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine (CCMH).

Sa valeur est variable selon l'espèce, l'âge et le sexe. (Annexe VIII)

11. **Le volume globulaire moyen (VGM)**, est un paramètre sanguin rendant compte de la taille des globules rouges, exprimée en μm^3 . Il se calcule après la réalisation d'un hémogramme à partir de l'hématocrite et de la numération globulaire, selon la formule :

$$\text{VGM (L)} = \frac{\text{Hématocrite (nombre compris entre 0 et 1)}}{\text{Nombre de Globules Rouges par litre}}$$

Le VGM, généralement exprimé en femtolitres (fL = 10^{-15} L).

Il définit le caractère normocytaire, microcytaire ou macrocytaire d'une anémie. La valeur du VGM aide ainsi à poser le diagnostic étiologique de l'anémie.

Valeurs pathologiques :

- VGM augmenté : caractère macrocytaire : érythrocytes de grande taille
- VGM diminué: caractère microcytaire : érythrocytes de petite taille
- Sinon VGM normocytaire.(Annexe VIII)

12.La concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine (CCMH) est un paramètre sanguin donnant la concentration massique moyenne d'hémoglobine contenue dans un certain volume de globules rouges. Elle est calculée par le rapport entre le taux d'hémoglobine (concentration de l'hémoglobine dans le sang) et l'hématocrite. La CCMH est généralement exprimée en g/100mL

Sa valeur normale dans l'espèce humaine est de 32 à 36 g/100 ml. On parle d'hypochromie si la CCMH est inférieure à 32 et de normochromie quand elle est comprise entre 32 et 36. Il ne peut pas y avoir d'hyperchromie: au-delà d'une certaine concentration, l'hémoglobine précipite dans le globule rouge.

La CCMH peut se calculer à partir des valeurs du taux d'hémoglobine et de l'hématocrite comme indiqué ci-dessous. Ce calcul est actuellement effectué par les automates.

$$\frac{\text{taux d'hémoglobine} \times 100 \text{ (en g/dl)}}{\text{hématocrite (\%)}} = \text{CCMH (en g/100mL)}$$

La chromie peut aussi se vérifier sur lame : l'analyse au microscope d'un frottis de sang confirmera par exemple la présence d'hématies anormalement pales en cas d'hypochromie.

(Annexe VIII)

11. La teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine (TCMH) est un paramètre sanguin donnant la masse moyenne d'hémoglobine contenue dans un globule rouge. Elle est calculée par le rapport entre le taux d'hémoglobine et la numération globulaire. La TCMH est exprimée en picogrammes.

$$\frac{\text{taux d'hémoglobine (g/dl)} \times 10}{\text{TCMH (en pg)}} =$$

numération globulaire (millions/mm³)

Sa valeur définit le caractère normochrome ou hypochrome d'une anémie (l'hyperchromie est impossible étant donné que les globules rouges contiennent physiologiquement de l'hémoglobine à saturation dans leur cytoplasme).

La valeur de référence chez l'adulte se situe entre 27 et 38 picogrammes.

Cette valeur varie avec l'âge : elle est plus élevée chez le nouveau-né, elle diminue par la suite.

La valeur de TCMH reflétant la quantité d'hémoglobine contenue en moyenne par globule rouge, dont le volume peut lui-même varier, il faut prendre en compte ces deux variables et considérer la CCMH pour définir la normochromie (CCMH de 32 à 35 %) et l'hypochromie (CCMH < 32 %). (Annexe VIII)

12. Les plaquettes : sont des cellules sans noyau formées dans la moelle osseuse.

Elles jouent un rôle essentiel dans la coagulation car elles forment des agrégats qui vont boucher une blessure (coupure, plaie) juste après qu'elle se produise et avant que les autres facteurs de la coagulation ne se déclenchent. Leur durée de vie moyenne est de 9 jours. Le dosage plaquettaire est prescrit en cas de troubles de la coagulation ou de maladie hématologique. (Annexe VIII)

13. Le syndrome d'Evans est un trouble hématologique chronique rare caractérisé par l'association simultanée ou séquentielle d'une anémie hémolytique auto-immune (AHAI ; un trouble dans lequel les anticorps sont dirigés contre les globules rouges, causant une anémie de gravité variable), d'un purpura thrombocytopénique immunologique (PTI ; un trouble de la coagulation dans lequel les anticorps sont dirigés contre les plaquettes, ce qui provoque des épisodes hémorragiques), et parfois une neutropénie auto-immune, sans étiologie connue.

14. Les leucocytes ou globules blancs GB sont des cellules produites dans la moelle osseuse et présentes dans le sang, la lymphe, les organes lymphoïdes et de nombreux tissus conjonctifs de l'organisme. Il en existe plusieurs types, les granulocytes (ou polynucléaires), les lymphocytes et les monocytes. Chaque type joue un rôle important au sein du système immunitaire.

L'hvnerleucocytose correspond à l'augmentation de taux des globules blancs en

Résumé

Le TDA est un test d'immuno-hématologie qui permet la détection des anticorps et/ou des composants du complément fixés sur les globules rouges à l'aide de l'AGH. Il est utilisé pour le diagnostic des anémies hémolytiques immunologiques.

L'importance d'un diagnostic rapide et précis exige une sensibilité optimale de la technique utilisée. Notre étude a ainsi consisté à l'évaluation des deux techniques diagnostiques de l'hémolyse. Il s'agit d'une étude transversale descriptive, réalisée au laboratoire d'hémobiologie CHU Tizi-Ouzou entre Décembre 2018 et 31Avril 2019.

Cette étude a montré que 41,3% des patients ayant nécessité un TDA étaient de service d'hématologie et 21,3% des patients sont de service de néonatalogie.

Les résultats obtenus à travers l'étude, nous montrent que le TDA sur tube et le TDA sur carte gel ont la même sensibilité, à condition de soumettre le TDA sur tube à l'examen microscopique. La technique sur carte gel a plus d'avantages notamment pour sa rapidité et elle a moins de risque d'erreurs, mais plus couteuse. Le. Ainsi on a noté que les signes cliniques d'hémolyse concordent avec les résultats de TDA. Les paramètres biologiques suivants :Hb, taux de réticulocyte, la ferritine, Gb et plaquettes concordent le plus souvent avec les résultats de TDA.

Mots clés : TDA, anémies hémolytiques, tube, microscope, gel.

Abstract

TDA is an immuno-hematology test that allows the detection of antibodies and / or complement components attached to red blood cells using AGH. It is used for the diagnosis of immunological haemolytic anemias. The importance of rapid and accurate diagnosis requires optimal sensitivity of the technique used. Our study thus consisted of the evaluation of the two diagnostic techniques of hemolysis. This is a descriptive cross-sectional study, performed at the Tizi-Ouzou hemobiology laboratory between December 2018 and April 31, 2019. This study showed that 41.3% of patients requiring TDA were in hematology department and 21.3% of patients were in neonatal ward. The results obtained through the study, show us that the TDA on tube and the TDA on gel card have the same sensitivity, provided to submit the TDA tube on microscopic examination. The gel card technique has more advantages especially for its speed and it has less risk of errors, but more expensive. The. Thus it has been noted that the clinical signs of hemolysis are consistent with the results of TDA. The following biological parameters: Hb, reticulocyte level, ferritin, Gb and platelets are most consistent with the results of TDA.

Key words: ADD, hemolytic anemias, tube, microscope, gel.