



كلية الطب  
والصيدلة - مراكش  
FACULTÉ DE MÉDECINE  
ET DE PHARMACIE - MARRAKECH

Année 2020

Thèse N° 078

**Les Examens immunohématologiques au centre de  
transfusion sanguine:  
Expérience de l'Hôpital Militaire Avicenne de  
Marrakech**

**THÈSE**

PRÉSENTÉE ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT LE 09 /07/2020

PAR

**Mlle. Khouloud Mezzat**

Née Le 24 Décembre 1994 à Safi

POUR L'OBTENTION DU DOCTORAT EN MÉDECINE

**MOTS-CLÉS**

Transfusion sanguine – Bilans immunohématologiques – Recommandations.

**JURY**

|           |   |                   |
|-----------|---|-------------------|
| <b>M.</b> | <b>M. CHAKOUR</b><br>Professeur d'Hématologie                     | <b>PRESIDENT</b>  |
| <b>M.</b> | <b>M. AIT AMEUR</b><br>Professeur agrégé d'Hématologie Biologique | <b>RAPPORTEUR</b> |
| <b>M.</b> | <b>H.QACIF</b><br>Professeur de Médecine Interne                  | <b>JUGE</b>       |

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

وَلَا تَقُولَنَّ لِشَيْءٍ إِنِّي فَاعِلٌ ذَٰلِكَ غَدًا ۝

إِلَّا أَن يَشَاءَ اللَّهُ ۚ

وَأذْكُرُ رَبَّكَ إِذَا نَسِيتَ

وَقُلْ عَسَىٰ أَن يَهْدِيَنِّي رَبِّي لِأَقْرَبَ مِنْ هَٰذَا رَشْدًا



# Serment d'Hippocrate

*Au moment d'être admis à devenir membre de la profession médicale, je m'engage solennellement à consacrer ma vie au service de l'humanité.*

*Je traiterai mes maîtres avec le respect et la reconnaissance qui leur sont dus.*

*Je pratiquerai ma profession avec conscience et dignité. La santé de mes malades sera mon premier but.*

*Je ne trahirai pas les secrets qui me seront confiés.*

*Je maintiendrai par tous les moyens en mon pouvoir l'honneur et les nobles traditions de la profession médicale.*

*Les médecins seront mes frères.*

*Aucune considération de religion, de nationalité, de race, aucune considération politique et sociale, ne s'interposera entre mon devoir et mon patient.*

*Je maintiendrai strictement le respect de la vie humaine dès sa conception.*

*Même sous la menace, je n'userai pas mes connaissances médicales d'une façon contraire aux lois de l'humanité.*

*Je m'y engage librement et sur mon honneur.*

**Déclaration Genève, 1948**



**LISTE DES  
PROFESSEURS**



**UNIVERSITE CADI AYYAD**  
**FACULTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE**  
**MARRAKECH**

Doyens Honoraires

: Pr. Badie Azzaman MEHADJI  
: Pr. Abdelhaq ALAOUI YAZIDI

**ADMINISTRATION**

Doyen

: Pr. Mohammed BOUSKRAOUI

Vice doyen à la Recherche et la Coopération

: Pr. Mohamed AMINE

Vice doyen aux Affaires Pédagogiques

: Pr. Redouane EL FEZZAZI

Secrétaire Générale

: Mr. Azzeddine EL HOUDAIGUI

**Professeurs de l'enseignement supérieur**

| Nom et Prénom             | Spécialité                              | Nom et Prénom               | Spécialité               |
|---------------------------|---|-----------------------------|--------------------------|
| ABKARI Imad               | Traumato- orthopédie                    | FAKHIR Bouchra              | Gynécologie- obstétrique |
| ABOU EL HASSAN<br>Taoufik | Anesthésie-<br>réanimation              | FINECH Benasser             | Chirurgie - générale     |
| ABOUCHADI Abdeljalil      | Stomatologie et chir<br>maxillo faciale | FOURAJI Karima              | Chirurgie pédiatrique    |
| ABOULFALAH<br>Abderrahim  | Gynécologie-<br>obstétrique             | GHANNANE Houssine           | Neurochirurgie           |
| ABOUSSAIR Nisrine         | Génétique                               | GHOUNDALE Omar              | Urologie                 |
| ADALI Imane               | Psychiatrie                             | HACHIMI Abdelhamid          | Réanimation médicale     |
| ADERDOUR Lahcen           | Oto- rhino-<br>laryngologie             | HAJJI Ibtissam              | Ophtalmologie            |
| ADMOU Brahim              | Immunologie                             | HAROU Karam                 | Gynécologie- obstétrique |
| AGHOUTANE EI<br>Mouhtadi  | Chirurgie pédiatrique                   | HOCAR Ouafa                 | Dermatologie             |
| AIT AMEUR Mustapha        | Hématologie Biologique                  | JALAL Hicham                | Radiologie               |
| AIT BENALI Said           | Neurochirurgie                          | KAMILI EI Ouafi EI<br>Aouni | Chirurgie pédiatrique    |
| AIT BENKADDOUR<br>Yassir  | Gynécologie-<br>obstétrique             | KHALLOUKI<br>Mohammed       | Anesthésie- réanimation  |
| AIT-SAB Imane             | Pédiatrie                               | KHATOURI Ali                | Cardiologie              |
| AKHDARI Nadia             | Dermatologie                            | KHOUCHANI Mouna             | Radiothérapie            |
| ALAOUI Mustapha           | Chirurgie- vasculaire<br>péripherique   | KISSANI Najib               | Neurologie               |
| AMAL Said                 | Dermatologie                            | KOULALI IDRISSE Khalid      | Traumato- orthopédie     |
| AMINE Mohamed             | Epidémiologie- clinique                 | KRATI Khadija               | Gastro- entérologie      |
| AMMAR Haddou              | Oto-rhino-laryngologie                  | KRIET Mohamed               | Ophtalmologie            |
| AMRO Lamyae               | Pneumo- phtisiologie                    | LAGHMARI Mehdi              | Neurochirurgie           |
| ANIBA Khalid              | Neurochirurgie                          | LAKMICH I Mohamed<br>Amine  | Urologie                 |
| ARSALANE Lamiae           | Microbiologie -Virologie                | LAOUAD Inass                | Néphrologie              |

|                                    |                                       |                                  |  |
|------------------------------------|---------------------------------------|----------------------------------|--|
| ASMOUKI Hamid                      | Gynécologie-<br>obstétrique           | LOUHAB Nistrine                  | Neurologie                               |
| ASRI Fatima                        | Psychiatrie                           | LOUZI Abdelouahed                | Chirurgie - générale                     |
| BASRAOUI Dounia                    | Radiologie                            | MADHAR Si Mohamed                | Traumato- orthopédie                     |
| BASSIR Ahlam                       | Gynécologie-<br>obstétrique           | MANOUDI Fatiha                   | Psychiatrie                              |
| BELKHOU Ahlam                      | Rhumatologie                          | MANSOURI Nadia                   | Stomatologie et chiru<br>maxillo faciale |
| BEN DRISS Laila                    | Cardiologie                           | MAOULAININE Fadl<br>mrabih rabou | Pédiatrie (Neonatalogie)                 |
| BENCHAMKHA<br>Yassine              | Chirurgie réparatrice et<br>Plastique | MATRANE Aboubakr                 | Médecine nucléaire                       |
| BENELKHAJAT<br>BENOMAR Ridouan     | Chirurgie - générale                  | MOUAFFAK Youssef                 | Anesthésie - réanimation                 |
| BENHIMA<br>Mohamed Amine           | Traumatologie -<br>orthopédie         | MOUDOUNI Said<br>Mohammed        | Urologie                                 |
| BENJILALI<br>Laila                 | Médecine interne                      | MOUFID Kamal                     | Urologie                                 |
| BENZAROUEL<br>Dounia               | Cardiologie                           | MOUTAJ Redouane                  | Parasitologie                            |
| BOUAITY Brahim                     | Oto-rhino- laryngologie               | MOUTAOUAKIL<br>Abdeljalil        | Ophtalmologie                            |
| BOUCHENTOUF Rachid                 | Pneumo- phtisiologie                  | MSOUGGAR Yassine                 | Chirurgie thoracique                     |
| BOUGHALEM Mohamed                  | Anesthésie -<br>réanimation           | NAJEB Youssef                    | Traumato- orthopédie                     |
| BOUKHANNI Lahcen                   | Gynécologie-<br>obstétrique           | NARJISS Youssef                  | Chirurgie générale                       |
| BOUKHIRA<br>Abderrahman            | Biochimie - chimie                    | NEJMI Hicham                     | Anesthésie- réanimation                  |
| BOUMZEBRA Drissi                   | Chirurgie Cardio-<br>Vasculaire       | NIAMANE Radouane                 | Rhumatologie                             |
| BOURRAHOUE Aicha                   | Pédiatrie                             | NOURI Hassan                     | Oto rhino laryngologie                   |
| BOURROUS Monir                     | Pédiatrie                             | OUALI IDRISSE Mariem             | Radiologie                               |
| BOUSKRAOUI<br>Mohammed             | Pédiatrie                             | OULAD SAIAD<br>Mohamed           | Chirurgie pédiatrique                    |
| CHAFIK Rachid                      | Traumato- orthopédie                  | QACIF Hassan                     | Médecine interne                         |
| CHAKOUR Mohamed                    | Hématologie Biologique                | QAMOUSS Youssef                  | Anesthésie- réanimation                  |
| CHELLAK Saliha                     | Biochimie- chimie                     | RABBANI Khalid                   | Chirurgie générale                       |
| CHERIF IDRISSE EL<br>GANOUNI Najat | Radiologie                            | RADA Nouredine                   | Pédiatrie                                |
| CHOULLI Mohamed<br>Khaled          | Neuro pharmacologie                   | RAIS Hanane                      | Anatomie pathologique                    |
| DAHAMI Zakaria                     | Urologie                              | RAJI Abdelaziz                   | Oto-rhino-laryngologie                   |

|                             |   |                                |                           |
|-----------------------------|---|--------------------------------|---------------------------|
| DRAISS Ghizlane             | Pédiatrie                                     | ROCHDI Youssef                 | Oto-rhino- laryngologie   |
| EL ADIB Ahmed Rhassane      | Anesthésie-<br>réanimation                    | SAIDI Halim                    | Traumato- orthopédie      |
| EL ANSARI Nawal             | Endocrinologie et<br>maladies<br>métaboliques | SAMKAOUI Mohamed<br>Abdenasser | Anesthésie- réanimation   |
| EL BARNI Rachid             | Chirurgie- générale                           | SAMLANI Zouhour                | Gastro- entérologie       |
| EL BOUCHTI Imane            | Rhumatologie                                  | SARF Ismail                    | Urologie                  |
| EL BOUIHI Mohamed           | Stomatologie et chir<br>maxillo faciale       | SORAA Nabila                   | Microbiologie – Virologie |
| EL FEZZAZI Redouane         | Chirurgie pédiatrique                         | SOUMMANI Abderraouf            | Gynécologie- obstétrique  |
| EL HAOURY Hanane            | Traumato- orthopédie                          | TASSI Noura                    | Maladies infectieuses     |
| EL HATTAOUI<br>Mustapha     | Cardiologie                                   | TAZI Mohamed Illias            | Hématologie- clinique     |
| EL HOUDZI Jamila            | Pédiatrie                                     | YOUNOUS Said                   | Anesthésie- réanimation   |
| EL IDRISSE SLITINE<br>Nadia | Pédiatrie                                     | ZAHLANE Kawtar                 | Microbiologie – virologie |
| EL KARIMI Saloua            | Cardiologie                                   | ZAHLANE Mouna                  | Médecine interne          |
| EL KHAYARI Mina             | Réanimation médicale                          | ZAOUI Sanaa                    | Pharmacologie             |
| EL MGHARI TABIB<br>Ghizlane | Endocrinologie et<br>maladies                 | ZIADI Amra                     | Anesthésie – réanimation  |
| ELFIKRI Abdelghani          | Radiologie                                    | ZOUHAIR Said                   | Microbiologie             |
| ESSAADOUNI Lamiaa           | Médecine interne                              | ZYANI Mohammed                 | Médecine interne          |
| FADILI Wafaa                | Néphrologie                                   |                                |                           |

#### Professeurs Agrégés

| Nom et Prénom     | Spécialité  | Nom et Prénom             | Spécialité                                   |
|-------------------|---|---------------------------|--|
| ABIR Badreddine   | Stomatologie et<br>Chirurgie maxillo facial   | HAZMIRI Fatima<br>Ezzahra | Histologie – Embryologie<br>– Cytogénétique  |
| ADARMOUCH Latifa  | Médecine<br>Communautaire<br>(médecine préventive,<br>santé publique et<br>hygiène) | IHBIBANE fatima           | Maladies Infectieuses                        |
| AISSAOUI Younes   | Anesthésie –<br>réanimation   | KADDOURI Said             | Médecine interne                             |
| AIT BATAHAR Salma | Pneumo- phtisiologie  | LAHKIM Mohammed           | Chirurgie générale                           |
| ALJ Soumaya       | Radiologie  | LAKOUICHMI<br>Mohammed    | Stomatologie et Chirurgie<br>maxillo faciale |
| ATMANE El Mehdi   | Radiologie  | MARGAD Omar               | Traumatologie –<br>orthopédie                |
| BAIZRI Hicham     | Endocrinologie et<br>maladies métaboliques  | MEJDANE Abdelhadi         | Chirurgie Générale                           |

|                             |   |                              |                                       |
|-----------------------------|---|------------------------------|---------------------------------------|
| BELBACHIR Anass             | Anatomie- pathologique                  | MLIHA TOUATI<br>Mohammed     | Oto-Rhino -<br>Laryngologie           |
| BELBARAKA Rhizlane          | Oncologie médicale                      | MOUHSINE Abdelilah           | Radiologie                            |
| BENJELLOUN HARZIMI<br>Amine | Pneumo- phtisiologie                    | NADER Youssef                | Traumatologie -<br>orthopédie         |
| BENALI Abdeslam             | Psychiatrie                             | OUBAHA Sofia                 | Physiologie                           |
| BSISS Mohamed Aziz          | Biophysique                             | RBAIBI Aziz                  | Cardiologie                           |
| CHRAA Mohamed               | Physiologie                             | SAJIAI Hafsa                 | Pneumo- phtisiologie                  |
| DAROUASSI Youssef           | Oto-Rhino -<br>Laryngologie             | SALAMA Tarik                 | Chirurgie pédiatrique                 |
| EL AMRANI Moulay<br>Driss   | Anatomie                                | SEDDIKI Rachid               | Anesthésie - Réanimation              |
| EL HAOUATI Rachid           | Chirurgie<br>Cardiovasculaire           | SERGHINI Issam               | Anesthésie - Réanimation              |
| EL KHADER Ahmed             | Chirurgie générale                      | TOURABI Khalid               | Chirurgie réparatrice et<br>plastique |
| EL MEZOUARI EI<br>Moustafa  | Parasitologie Mycologie                 | ZARROUKI Youssef             | Anesthésie - Réanimation              |
| EL OMRANI<br>Abdelhamid     | Radiothérapie                           | ZEMRAOUI Nadir               | Néphrologie                           |
| FAKHRI Anass                | Histologie- embyologie<br>cytogénétique | ZIDANE Moulay<br>Abdelfettah | Chirurgie Thoracique                  |
| GHAZI Mirieme               | Rhumatologie                            |                              |                                       |

#### Professeurs Assistants

| Nom et Prénom       | Spécialité  | Nom et Prénom      | Spécialité                             |
|---------------------|---|--------------------|--|
| ABDELFETTAH Youness | Rééducation et<br>Réhabilitation<br>Fonctionnelle     | ELOUARDI Youssef   | Anesthésie réanimation                 |
| ABDOU Abdessamad    | Chiru Cardio vasculaire                               | ELQATNI Mohamed    | Médecine interne                       |
| AIT ERRAMI Adil     | Gastro-entérologie                                    | ESSADI Ismail      | Oncologie Médicale                     |
| AKKA Rachid         | Gastro - entérologie                                  | FDIL Naima         | Chimie de Coordination<br>Bioorganique |
| ALAOUI Hassan       | Anesthésie -<br>Réanimation                           | FENNANE Hicham     | Chirurgie Thoracique                   |
| AMINE Abdellah      | Cardiologie   | GHOZLANI Imad      | Rhumatologie                           |
| ARABI Hafid         | Médecine physique et<br>réadaptation<br>fonctionnelle | HAJJI Fouad        | Urologie                               |
| ARSALANE Adil       | Chirurgie Thoracique                                  | HAMMI Salah Eddine | Médecine interne                       |
| ASSERRAJI Mohammed  | Néphrologie   | Hammoune Nabil     | Radiologie                             |
| AZIZ Zakaria        | Stomatologie et<br>chirurgie maxillo faciale          | JALLAL Hamid       | Cardiologie                            |

|                           |                                       |                        |   |
|---------------------------|---------------------------------------|------------------------|---|
| BAALLAL Hassan            | Neurochirurgie                        | JANAH Hicham           | Pneumo- phtisiologie  |
| BABA Hicham               | Chirurgie générale                    | LAFFINTI Mahmoud Amine | Psychiatrie   |
| BELARBI Marouane          | Néphrologie                           | LAHLIMI Fatima Ezzahra | Hématologie clinique  |
| BELFQUIH Hatim            | Neurochirurgie                        | LAHMINE Widad          | Pédiatrie   |
| BELGHMAIDI Sarah          | OPhtalmologie                         | LALYA Issam            | Radiothérapie   |
| BELHADJ Ayoub             | Anesthésie – Réanimation              | LOQMAN Souad           | Microbiologie et toxicologie environnementale                           |
| BELLASRI Salah            | Radiologie                            | MAHFOUD Tarik          | Oncologie médicale  |
| BENANTAR Lamia            | Neurochirurgie                        | MILOUDI Mohcine        | Microbiologie – Virologie   |
| BENNAOUI Fatiha           | Pédiatrie                             | MOUNACH Aziza          | Rhumatologie  |
| BOUCHENTOUF Sidi Mohammed | Chirurgie générale                    | NAOUI Hafida           | Parasitologie Mycologie   |
| BOUKHRIS Jalal            | Traumatologie – Orthopédie            | NASSIH Houda           | Pédiatrie   |
| BOUTAKIOUTE Badr          | Radiologie                            | NASSIM SABAH Taoufik   | Chirurgie Réparatrice et Plastique                                      |
| BOUZERDA Abdelmajid       | Cardiologie                           | NYA Fouad              | Chirurgie Cardio – Vasculaire   |
| CHETOUI Abdelkhalek       | Cardiologie                           | OUEIAGLI NABIH Fadoua  | Psychiatrie   |
| CHETTATI Mariam           | Néphrologie                           | OUMERZOUK Jawad        | Neurologie  |
| DAMI Abdallah             | Médecine Légale                       | RAISSI Abderrahim      | Hématologie clinique  |
| DOUIREK Fouzia            | Anesthésie–réanimation                | REBAHI Houssam         | Anesthésie – Réanimation  |
| EL- AKHIRI Mohammed       | Oto- rhino- laryngologie              | RHARRASSI Isam         | Anatomie–patologique  |
| EL AMIRI My Ahmed         | Chimie de Coordination bio–organnique | SAOUAB Rachida         | Radiologie  |
| EL FADLI Mohammed         | Oncologie médicale                    | SAYAGH Sanae           | Hématologie   |
| EL FAKIRI Karima          | Pédiatrie                             | SEBBANI Majda          | Médecine Communautaire (médecine préventive, santé publique et hygiène) |
| EL HAKKOUNI Awatif        | Parasitologie mycologie               | TAMZAOURTE Mouna       | Gastro – entérologie  |
| EL HAMZAOUI Hamza         | Anesthésie réanimation                | WARDA Karima           | Microbiologie   |
| EL KAMOUNI Youssef        | Microbiologie Virologie               | ZBITOU Mohamed Anas    | Cardiologie   |
| ELBAZ Meriem              | Pédiatrie                             | ZOUIZRA Zahira         | Chirurgie Cardio-vasculaire   |

LISTE ARRÊTÉE LE 24/09/2019



# **DÉDICACES**





*Je me dois d'avouer pleinement ma  
reconnaissance à toutes les personnes qui m'ont  
soutenu durant mon parcours, qui ont su me  
hâsser vers le haut pour atteindre mon objectif.  
C'est avec amour, respect et gratitude que*

*Je dédie cette thèse ...* 



*Le très Haut, le très Grand,  
le Clément, L'Omniscient, l'Omnipotent.  
Le Tout Puissant, le très miséricordieux  
d'avoir permis à ce travail d'aboutir à son terme.  
Au PROPHÈTE MOHAMED paix et salut sur lui.*

*Je dédie cette thèse*

*Au bon Dieu Tout puissant*

*Qui m'as inspiré*

*Qui m'a guidé dans le bon chemin Je vous dois ce*

*Que je suis devenue Louanges et remerciements*

*Pour votre clémence et miséricorde*

*Au Prophète Mohamed*

*(P.S.L.)*

*Notre guide et notre exemple*

*bien-aimé. Qu'il nous oriente dans le*

*droit chemin.*

*A mes très chers parents*

*A qui je dois tout, et pour qui aucune dédicace ne saurait exprimer*

*mon profond amour, ma gratitude, ni mon infinie reconnaissance*

*pour l'ampleur des sacrifices et des souffrances que vous avez*

*enduré pour pouvoir m'éduquer, pour mon bien être, vous n'avez*

*jamais cessé de lutter.*

*Vos prières ont été pour moi un grand soutien moral tout au long de*

*mes études.*

*Ce modeste travail, qui est avant tout le vôtre, n'est que la*

*consécration de vos grands efforts et vos immenses sacrifices. Sans*

*vous je ne saurais arriver où je suis. J'espère rester toujours digne*

*de votre estime.*

*Puisse Dieu tout puissant vous préserver du mal, vous combler de*

*santé, de bonheur et vous accorder une longue et heureuse vie afin*

*que je puisse vous rendre un minimum de ce que je vous dois.*

*A mon très cher frère Anass*

*Pour toute l'ambiance dont tu m'as entouré, pour toute la spontanéité et ton élan chaleureux. Je ne saurai traduire sur du papier l'affection que j'ai pour toi, je n'oublierai jamais ces merveilleux moments passés ensemble. Intelligent que tu es, Je t'exprime à travers ce travail mes sentiments de fraternité et d'amour. J'implore Allah de te réserver un avenir meilleur dans ta profession d'ingénieur. Mon affection et ma tendresse envers toi ne peuvent être exprimées ni traduites par ces quelques mots imparfaits. Que Dieu te garde et te procure la santé et longue vie.*

*À ma chère petite sœur Jannate que j'aime tant*

*Plus qu'une sœur, tu es une amie. La prunelle de mes yeux, tellement différente de moi mais qui me complète parfaitement. Tu es mon ange gardien, toujours présente à mes côtés pour me soutenir, m'aider et m'encourager. Je ne te remercierai jamais assez pour tout ce que tu as fait pour moi. Mon affection et ma tendresse envers toi ne peuvent être exprimées ni traduites par ces quelques mots imparfaits. Que Dieu te garde et te procure la santé et longue vie.*

*A la mémoire de mes grands parents paternels et mon grand-père maternel*

*Je vous dédie cette thèse pour votre amour inconditionnel. J'aurais tant aimé que vous soyez présents. Que Dieu ait vos âmes dans sa sainte miséricorde.*

*A la mémoire de ma très chère tante maternelle*

*Je vous dédie cette thèse pour votre amour inconditionnel. J'aurais tant aimé que vous soyez présents. Que Dieu ait vos âmes dans sa sainte miséricorde. Tu me manques tant, je prie pour toi chaque jour espérant te revoir là où tu es au paradis.*

*A ma chère grand-mère maternelle*

*Je vous dédie cette thèse pour vos attentions particulières, vos prières et votre amour inconditionnel. Merci pour tout et que Dieu vous donne bonne santé et longue vie parmi nous*

*A mes chères tantes maternelles et paternelles*

*Je vous dédie cette thèse pour vos attentions particulières, vos prières et votre amour inconditionnel. Merci pour tout et que Dieu vous donne bonne santé et longue vie parmi nous.*

*A mes chères cousines maternelles Rabab et Ihsane Sibar*

*Je vous dédie tous ce travail pour votre soutien, amour et encouragements.  
Vous trouvez dans ce travail, l'expression de mon amour en vous souhaitant beaucoup de bonheur.*

*A tous les membres de ma famille petits et grands*

*Je vous dédie tous ce travail pour votre soutien, amour et encouragements.  
Vous trouvez dans ce travail, l'expression de mon amour en vous souhaitant beaucoup de bonheur.*

*A mes très chères amours Dr.M.Oumaima et Dr.M.Hajar :*

*Ces quelques lignes, ne sauraient traduire le profond amour que je vous porte. Votre bonté, votre précieux soutien, vos encouragements tout au long de mes années d'études, votre amour et votre affection, ont été pour moi l'exemple de persévérance.  
Que ce travail soit l'expression de mon estime pour vous et que Dieu vous protège, vous accordé santé, succès et plein de bonheur dans votre vie.*

*A mes très chers amis(e)s :*

*Dr. Fatimzahra Lapardé ; Dr. Khadija Tadlaoui ; Dr. Zineb Naïmi ; Dr. Ilham Maâli ; Dr. Dalila Sounny Slitine ; Dr. Rim Lemtouni ; Dr. Abir Ouchen ; Dr. Bouchra M'raouni ; Dr. Zineb Asri ; Dr. Meryem Moro ; Dr. Khaoula Nini ; Dr. Nadia Lakhouaja ; Dr. Fatima Ezzahra Messaoudi ; Dr. Imane Daha ; Dr. Loubna Mekhchoun ; Dr. Fatima Lagroubou ; Dr. Najwa Imad ; Dr. Mariem Louktam ; Dr. Doha Khayat ; Dr. Imane Zouidine ; Dr. Sana Morssaoui ; Dr. Nassima Kadri ; Dr. Oumaima Belghiti ; Dr. Douaa Elmajdoubi ; Dr. Naïma Elazzam ; Dr. Chaymae Ouali ; Dr. Hasna Loulida ; Dr. Ilham Lemkadmî ; Dr. Houda Khaya ; Dr. Asmaâ Lahrougi ; Dr. Hamza Meskini ; Dr. Houssin Rhal ; Dr. Badr Nacer Amajid ; Dr. Youssef Ammor ; Dr. Mehdi Mekroum ; Dr. Hamza Lagtarna ; Dr. Med Amine Nouri ; Dr. Mehdi Maskouf ; Dr. Ilyass Lachgar ; Dr. Youssef Moudni ; Dr. Abdelfattah Maatoubi ; Dr. Othmane Lamouahî*

*Vous trouverez ici l'expression de mes sentiments les plus sincères.  
Avec tout mon respect, je vous souhaite un avenir souriant.  
A tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce travail.*

*A mes chers proches :*

*Malik Belhaj; Khalil Daoudi; Loubna syouri; Anas Hamma;  
Reda Drissi El Bouzaïdi*

*Vous trouverez ici l'expression de mes sentiments les plus sincères.  
Avec tout mon respect, je vous souhaite un avenir souriant.  
Que ce travail soit l'expression de mon estime pour vous et que Dieu vous protège, vous accorde santé, succès et plein de bonheur dans votre vie.*

*A tous les ami(e)s, confrères et consoeurs de la Faculté de Médecine et de  
Pharmacie de Marrakech*

*A tous les malades... Je leur souhaite prompt rétablissement.*



# **REMERCIEMENTS**



*À mon maître et président de thèse :*

*Professeur Mohamed CHAKOUR*

*Mes sincères remerciements pour bien vouloir présider notre jury de thèse, vous nous offrez le grand honneur et le grand plaisir.*

*Vos qualités humaines et professionnelles sont connues de tous et susciteront toujours notre admiration.*

*Veillez trouver dans ce travail le témoignage de notre gratitude et notre profond respect.*

*À mon maître et rapporteur de thèse :*

*Professeur Mustapha AIT AMEUR*

*Je suis très sensible à l'honneur que vous m'avez fait en me confiant ce sujet.*

*C'est avec un grand plaisir que je me suis adressé à vous dans le but de bénéficier de votre encadrement, travailler avec vous a été très agréable pendant cette période. J'ai trouvé auprès de vous le maître, le conseiller et le guide qui m'a reçu en toute circonstance avec sympathie et bienveillance.*

*Votre modestie et votre simplicité font de vous en plus de vos qualités professionnelles, une référence de bon sens de compétence.*

*La gentillesse et la bienveillance avec lesquelles vous avez guidé mes pas dans ce travail ont suscité ma bonne volonté de donner de mon mieux.*

*Veillez trouver dans ce travail l'expression de ma haute considération, ma profonde reconnaissance et ma sincère gratitude.*

*À mon maître et juge de thèse :*

*Mohammed ZYANI*

*Merci d'avoir accepté de juger mon travail. Votre compétence, votre rigueur et vos qualités humaines exemplaires ont toujours suscité notre admiration.*

*Nous avons beaucoup apprécié votre vigueur scientifique et votre dynamisme professionnel.*

*Veillez croire à l'expression de notre grande admiration et notre profond respect.*

*À mon maître et juge de thèse :*

*Brahim ADMOU*

*Vous nous avez fait un grand honneur en acceptant de siéger parmi les membres de jury de cette thèse.*

*Nous avons beaucoup apprécié votre vigueur scientifique et votre dynamisme professionnel.*

*Veillez trouver ici, cher maître, le témoignage de notre profonde gratitude et nos vifs remerciements.*

*À mon maître et juge de thèse :*

*Professeur Hassan QACIF*

*Je tiens à vous exprimer toute ma reconnaissance pour l'honneur que vous me faites de bien vouloir juger ma thèse.*

*Vos qualités humaines et professionnelles, font de vous un enseignant aimé de tous.*

*Veillez trouver dans ce travail le témoignage de ma profonde estime et mon grand respect.*



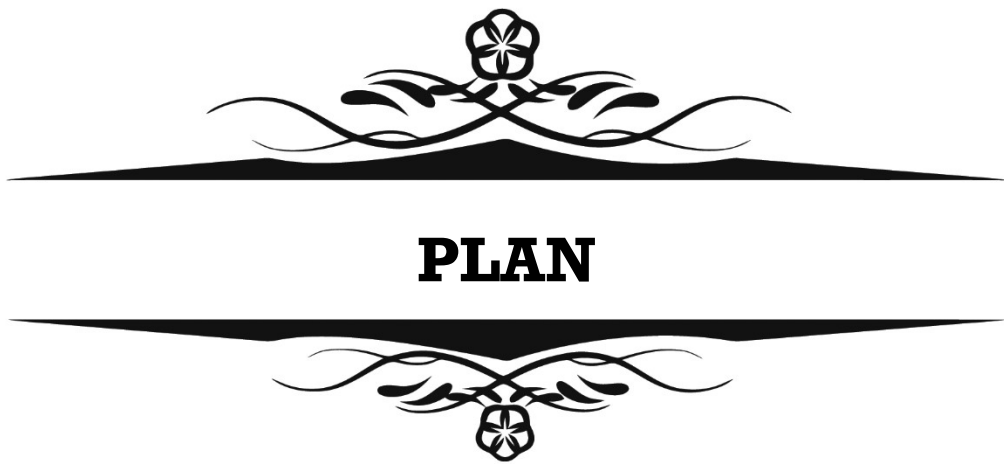
# **ABRÉVIATIONS**



## Liste des abréviations

|             |   |
|-------------|---|
| <b>TS</b>   | : Transfusion sanguine                      |
| <b>CTS</b>  | : Centre de transfusion sanguine            |
| <b>CNTS</b> | : Centre national de transfusion sanguine   |
| <b>HMA</b>  | : Hopital militaire Avicenne                |
| <b>SIDA</b> | : Syndrome d'Immunodéficience Acquise       |
| <b>TPHA</b> | : Treponema Pallidum HaemagglutinationAssay |
| <b>UI</b>   | : Unité Internationale                      |
| <b>VHB</b>  | : Virus d'Hépatite B                        |
| <b>VHC</b>  | : Virus d'Hépatite C                        |
| <b>VHE</b>  | : Virus d'Hépatite E                        |
| <b>VIH</b>  | : Virus de l'Immunodéficience Humaine       |
| <b>Ag</b>   | : Antigène                                  |
| <b>Ac</b>   | : Anticorps                                 |
| <b>Ig</b>   | : Immunoglobuline                           |
| <b>GR</b>   | : Globule rouge                             |
| <b>CGR</b>  | : Concentré de globule rouge                |
| <b>PLT</b>  | : Plaquette                                 |
| <b>RH</b>   | : Rhésus                                    |
| <b>CIQ</b>  | : Contrôl interne de la qualité             |

|              |   |
|--------------|---|
| <b>DP</b>    | : Double population                                       |
| <b>EDTA</b>  | : Ethylène Diamine Tétracétate                            |
| <b>TIA</b>   | : Test indirect à l'antiglobuline                         |
| <b>TDA</b>   | : Test direct à l'antiglobuline                           |
| <b>AI</b>    | : Agglutinine irrégulière                                 |
| <b>RAI</b>   | : Recherche des agglutinines irrégulières                 |
| <b>ECDL</b>  | : Epreuve de compatibilité directe au laboratoire         |
| <b>AHG</b>   | : Antiglobuline humaine                                   |
| <b>DTT</b>   | : Dithiothréitol  |
| <b>LISS</b>  | : Solution basse force ionique                            |
| <b>CMH</b>   | : Complexe majeur d'histocompatibilité                    |
| <b>PCR</b>   | : Polymerase Chain Reaction                               |
| <b>LCT</b>   | : Lymphocytotoxicité                                      |
| <b>IC</b>    | : Immunocapture   |
| <b>MAIPA</b> | : Monoclonal Antibody Immobilization Of Platelet Antigens |
| <b>IFM</b>   | : Incompatibilité foetomaternelle                         |
| <b>MHNN</b>  | : Maladie hémolytique du nouveau né                       |



|   |           |
|---|-----------|
| <b>INTRODUCTION</b>   | <b>1</b>  |
| <b>CHAPITRE 1: GENERALITES</b>  | <b>5</b>  |
| I. Intérêt des examens immuno-hématologiques en sécurité transfusionnelle   | 6         |
| II. Progrès et évolution des examens immuno-hématologiques  | 8         |
| III. Aspects législatifs organisant la réalisation des Examens immuno-hématologiques au Maroc : (Textes de loi)         | 11        |
| <b>CHAPITRE 2: LES EXAMENS IMMUNO-HEMATOLOGIQUES AU CENTRE DE TRANSFUSION DE L'HOPITAL MILITAIRE AVICENNE MARRAKECH</b> | <b>13</b> |
| <b>I. Examens immuno-hématologiques systématiques sur don du sang</b>   | <b>14</b> |
| <b>A. Groupage sanguin ABO-RH1</b>  | <b>14</b> |
| 1. Définition   | 14        |
| 2. Principe   | 18        |
| 3. Mode opératoire et réactifs à utiliser   | 19        |
| 4. Interprétation   | 28        |
| 5. Indications  | 30        |
| <b>B. Phénotypage étendu RH-Kell1</b>   | <b>31</b> |
| 1. Définition   | 31        |
| 2. Principe   | 36        |
| 3. Mode opératoire et réactifs à utiliser   | 37        |
| 4. Interprétation   | 41        |
| 5. Indications  | 41        |
| <b>C. Recherche des agglutinines irrégulières : RAI</b>   | <b>43</b> |
| 1. Définition   | 43        |
| 2. Principe   | 45        |
| 3. Mode opératoire et réactifs à utiliser   | 47        |
| 4. Interprétation   | 50        |
| 5. Indications  | 52        |
| <b>D. Épreuve directe de compatibilité au laboratoire : EDCL</b>  | <b>53</b> |
| 1. Définition   | 53        |
| 2. Principe   | 53        |
| 3. Mode opératoire  | 54        |
| 4. Interprétation   | 57        |
| 5. Indications  | 58        |
| <b>II. Examens immuno-hématologiques non systématiques</b>  | <b>58</b> |
| <b>A. Phénotypage élargi à d'autres systèmes (Kell2 ; MNS ; Lutheran ; Lewis ; Duffy ; Kidd)</b>                        | <b>58</b> |
| 1. Définition   | 58        |
| 2. Principe   | 60        |
| 3. Mode opératoire et réactifs à utiliser   | 61        |
| 4. Interprétation   | 67        |
| 5. Indications  | 68        |
| <b>B. Test direct à l'anti globuline (TDA) : Test de coombs direct</b>  | <b>69</b> |

|   |            |
|---|------------|
| 1. Définition   | 69         |
| 2. Principe   | 69         |
| 3. Mode opératoire et réactifs à utiliser   | 70         |
| 4. Interprétation   | 75         |
| 5. Indications  | 76         |
| C. Test indirect à l'anti globuline (TIA) : Test de coombs indirect                             | 76         |
| 1. Définition   | 76         |
| 2. Principe   | 77         |
| 3. Mode opératoire et réactifs à utiliser   | 79         |
| 4. Interprétation   | 81         |
| 5. Indications  | 82         |
| <b>III. Automate IH500</b>  | <b>83</b>  |
| <b>IV. Les perspectives du futur</b>  | <b>92</b>  |
| A. Elution  | 92         |
| 1. Définition   | 92         |
| 2. Principe   | 92         |
| 3. Mode opératoire  | 93         |
| 4. Interprétation   | 97         |
| 5. Indications  | 97         |
| B. Adsorption   | 98         |
| 1. Définition   | 98         |
| 2. Principe   | 98         |
| 3. Mode opératoire et réactifs à utiliser   | 99         |
| 4. Interprétation   | 105        |
| 5. Indications  | 107        |
| C. Typage des antigènes d'histocompatibilité : HLA  | 108        |
| 1. Définition   | 108        |
| 2. Principe   | 109        |
| 3. Mode opératoire et interprétation  | 110        |
| 4. Indications  | 119        |
| D. Recherche des anticorps anti plaquettes : HPA  | 120        |
| 1. Définition   | 120        |
| 2. Principe   | 121        |
| 3. Mode opératoire  | 121        |
| 4. Interprétation   | 125        |
| 5. Indications  | 125        |
| E. Biologie moléculaire : Détermination du génotype foetal RHD (RH1)<br>dans le plasma maternel | 126        |
| <b>V. Recommandations</b>   | <b>130</b> |
| <b>CONCLUSION</b>   | <b>140</b> |
| <b>ANNEXES</b>  | <b>143</b> |
| <b>RÉSUMÉS</b>  | <b>167</b> |
| <b>BIBLIOGRAPHIE</b>  | <b>174</b> |



# **INTRODUCTION**



La transfusion sanguine est une thérapeutique aux confins de l'hématologie et de l'immunologie impliquant la médecine, la biologie, la bio-industrie et la sociologie et reposant sur l'éthique. Il s'agit de l'une des spécialités médicales qui revêt de la plus grande importance dans le domaine de la santé.

Le sang c'est la vie ! Le sang perfuse les différents organes de l'organisme humain leur permettant ainsi d'accomplir leurs fonctions. Il convient alors de dire : faire un don de sang revient à faire un don de la vie ! Il s'agit de l'une des contributions les plus importantes qu'une personne puisse apporter à la société et l'un des actes les plus altruistes. « Toutes les deux secondes, chaque jour qui passe, quelqu'un dans le monde à besoin d'une transfusion sanguine pour survivre .... » .

En effet, la transfusion sanguine permet de sauver chaque jour des milliers de vie, que ce soit pour soigner les personnes touchées par des maladies de sang tel que la thalassémie et la drépanocytose, les personnes atteintes de cancer, les grands brûlés ou les personnes souffrantes d'hémorragies suite à une intervention chirurgicale, un accident de la voie publique ou un accouchement.

Au sens large du terme, la TS regroupe les étapes suivantes(1) :

- don du sang
- transformation et qualification biologique du sang
- sa conservation
- sa réinjection.

La transfusion sanguine est définie par l'OMS comme étant le transfert de sang ou de l'un de ses constituants d'un individu (appelé donneur) un autre (appelé receveur)(2). Elle consiste à administrer le sang ou l'un de ses composants (globules rouges, plaquettes, granulocytes, plasma, protéines) provenant d'un ou plusieurs sujets sains appelés "donneurs" vers un ou plusieurs sujets malades appelés "receveurs". Le fait que le sang d'un seul donneur

puisse être utilisé pour plusieurs malades tient à ce que, désormais les indications réelles du sang total étant très restreintes, le sang est fractionné en ses composants qui sont alors utilisés séparément.

Afin de réduire et au mieux d'éliminer les risques d'hémolyse immunologique liés aux transfusions de PSL et surtout des culots globulaires, la définition préalable des caractéristiques immunologiques des produits à transfuser et des patients receveurs s'imposent. De ce fait, des examens immunohématologiques préalables sont nécessaires.

L'immunohématologie est la science consacrée à l'étude des propriétés antigéniques du sang, des réactions immunologiques correspondantes, et des pathologies qui y sont associées. Sont ainsi concernés les groupes sanguins, le système HLA, certaines pathologies auto-immunes, les incompatibilités fœto-maternelles, les réactions immuno-allergiques touchant les éléments figurés du sang, etc.(3) Elle est donc une partie de la médecine commune à l'hématologie et à l'immunologie.

Cette activité spécialisée est régie par l'arrêté du 26 avril 2002 modifiant l'arrêté du 26 novembre 1995 relatif à la bonne exécution des analyses de biologie médicale(4). Les champs d'application concernent les analyses d'immuno-hématologie érythrocytaire suivantes(4) :

- le groupage ABO-RH1 (RhD) ;
- le phénotypage RH-KEL 1 (Rh-K) ;
- le phénotypage étendu ;
- la recherche d'anticorps anti-érythrocytaires (RAI) ;
- le titrage des anticorps anti-érythrocytaires autres que anti-A, anti-B et dosage pondéral des anti RH ;
- l'épreuve directe de compatibilité au laboratoire ;
- le test direct à l'antiglobuline ;

Notre travail est une étude rétrospective sur la praticabilité des examens immuno-hématologiques en transfusion sanguine ainsi qu'en dehors de la TS, au sein du CTS de l'HMA de Marrakech. Et dont l'objectif est :

- Faire un état des lieux des examens biologiques immunohématologiques réalisés Jusqu'à présent.
- Comparer notre expérience sur les examens immuno-hématologiques au centre de transfusion de l'hôpital militaire Avicenne de Marrakech avec celle réalisé à l'échelon national et international.
- Proposer des recommandations pour leur développement.



**CHAPITRE: GENERALITES**

## I. Intérêt des examens immuno-hématologiques dans la sécurité transfusionnelle :

La sécurité transfusionnelle repose sur la maîtrise du risque immunologique et la réduction des infections transmissibles par voie sanguine(5).

Toutefois, la décision de transfuser un malade ne peut être prise à la légère devant tous les risques et les complications inhérents à une transfusion sanguine notamment, les accidents immunologiques, la transmission de maladies infectieuses sans oublier les accidents de surcharge. Cet acte salvateur n'est donc pas sans danger(6).

Certes, l'évolution des connaissances scientifiques médicales en hématologie ont permis un meilleur savoir-faire du processus de transfusion sanguine et une meilleure maîtrise des différentes étapes visant à rendre cet acte encore plus sûr.

Néanmoins, l'utilisation du sang ne demeure pas sans danger d'où la nécessité de poser l'indication de ce geste thérapeutique et surtout de maîtriser toutes les étapes de la chaîne transfusionnelle notamment les bilans immuno-hématologiques.

La base de la sécurité immuno-hématologique est la compatibilité entre les caractéristiques érythrocytaires du donneur et celles du receveur. Sur le plan immuno-hématologique, l'ensemble des antigènes présents à la surface des hématies d'un individu déterminent le phénotype érythrocytaire. Seul un nombre limité d'antigènes érythrocytaires composant ce phénotype érythrocytaire est recherché en pratique courante(7).

Seule une parfaite connaissance des données immuno-hématologiques phénotypiques et moléculaires des donneurs et des receveurs permettra de déterminer le périmètre véritable de la sécurité transfusionnelle.

De ce fait, des examens immuno-hématologies préalables sont nécessaires qui ont pour but d'éviter la rencontre in vivo entre les antigènes et les anticorps correspondants . On parle de l'immuno-hématologie receveur .Le but étant de ne pas apporter le ou les antigènes correspondants aux anticorps présents dans le plasma du patient, de ne pas apporter les anticorps correspondants aux antigènes du patient et d'éviter l'apparition d'anticorps chez certains patients.

L'exigence de compatibilité phénotypique entre donneurs et receveurs peut se situer à plusieurs niveaux. Selon les pays, la pratique transfusionnelle, lorsque la recherche d'anticorps anti érythrocytaires est négative, est d'avoir une compatibilité donneur-receveur au niveau ABO-RH1 seulement, ou au niveau ABO, RH et KEL1 .

La compatibilité au niveau ABO, RH, KEL1, FY, JK et MNS n'est évoquée que dans certains cas. En cas de compatibilité au niveau ABO-RH1 seulement, le risque d'allo-immunisation serait associé à la différence ethnique entre donneurs et receveurs, reflétant le polymorphisme des systèmes RH, KEL, FY et JK, notamment(7).

Au total, il apparaît que la sécurité transfusionnelle répond à deux exigences : maîtriser le risque immunologique et prévenir l'allo-immunisation antiérythrocytaire. Maîtriser le risque immunologique sous-entend éviter la survenue de réactions hémolytiques consécutives à une transfusion dite incompatible. Les réactions hémolytiques peuvent être liées à la présence d'anticorps anti-érythrocytaires naturels et/ou immuns.

Afin de réduire et au mieux d'éliminer les risques d'hémolyse immunologique liés aux transfusions de PSL et surtout des culots globulaires, la définition préalable des caractéristiques immunologiques des produits à transfuser et des patients receveurs s'impose.




Le caractère immunogène des systèmes de groupes érythrocytaires fait qu'il y a un risque immuno-hémolytique devant une transfusion de culots globulaires.

## **II. Progrès et évolution des Examens immunohématologiques :**

### **Les grandes étapes du développement de la transfusion sanguine :**

De tout temps, l'Homme a été fasciné par le sang, auquel il a conféré des significations multiples et bien souvent contradictoires.

#### **A. Les époques significatives :**

-  **1900- 1910** : découverte de la « barrière immunologique » et de la transmission de maladie.
-  **Les deux guerres mondiales et l'entre-deux guerres** : anticoagulation et la conservation du sang et organisation des réseaux de solidarité.
-  **1952 et après** : poches plastiques et séparation des composants du sang.

#### **B. Evolution et progrès des examens immunohématologique dans le cadre d'amélioration de la sécurité transfusionnelle :**

- **En 1956** : Réalisation sur les dons du sang des groupages sanguins ABO et antigènes C c E e si la personne était de rhésus négatif, le dépistage de la Syphilis et la détermination de l'hématocrite.

- **En 1959** : Détection des Anticorps immuns anti A et B.
- **En 1962** : le CPD (Citrates, Phosphate, Dextrose) est additionné avec l'adénine afin d'augmenter la conservation du sang jusqu'à 35 jours
- **En 1971** : Dépistage de l'antigène HBs du Virus de l'hépatite B.
- **En 1971** : Un groupe à Boston développe la première méthode d'aphérèse semi-automatique pour le prélèvement de plaquettes
- **En 1978** : Mise au point de la solution SAG (Saline, Adénine, Glucose) et sera après accouplée avec du mannitol (SAG-mannitol), permettant une conservation du sang de 42 jours
- **En 1983** : Recherche des anticorps anti-érythrocytaires
- **En 1985** : Détection des anticorps anti-VIH
- **En 1986** : Paludisme : Détection des anticorps antipaludéens
- **En 1988** : Virus des hépatites B et C, Dosage ALAT et Détection anticorps anti-HBc
- **En 1989** : Détection du Virus HTLV (Anti-HTLV 1-2) aux Antilles et en Guyane, en 1991 en métropole
- **En 1990** : Détection des anticorps anti-VHC
- **De 1985 à 1990** (affaire du sang contaminé) : 4400 personnes sont contaminées par le virus du sida après administration de produits sanguins.
- **1991** : Virus HTLV Détection des anticorps anti-HTLV en métropole.
- **En 1993** : En France, de nombreuses lois sont signées pour garantir la sécurité des donneurs et des receveurs lors du don et de la transfusion.

- **En 1998** : En France, filtration systématique des prélèvements de sang (sang total, plasmas, plaquettes) afin d'éliminer les globules blancs (déleucocytation).
- **En 2000** : création de l'Établissement Français du Sang, opérateur unique de la transfusion sanguine en France. Les employés ne sont pas bénévoles, ils sont salariés de l'Établissement (7).
- **En 2001** : un dépistage systématique du génome viral (DGV) du virus du SIDA et du virus de l'hépatite C est fait sur chaque don. Cette recherche directe du virus par biologie moléculaire permet de dépister une éventuelle contamination du donneur avant sa séroconversion (apparition des anticorps).
- **En 2002** (l'arrêté du 26 Avril 2002) (8): Interdiction de réaliser une identification de groupe sanguin sur sang de cordon afin de limiter cette analyse au seul cas réellement légitime que constitue la prévention de l'allo immunisation anti RH1 de la femme RH:-1.
- **En 2003** : virus de l'hépatite C : **Arrêt du dosage des ALAT**
- **En 2005** : Virus de l'hépatite B : Dépistage du génome viral unitaire du VHB dans les DOM
- **En 2006** : Maladie de Chagas : Dépistage Anti-T.cruzi aux DOM Antilles
- **En 2007** : Maladie de Chagas : Dépistage Anti-T.cruzi si séjour zone endémique
- **En 2008** : Dosage de l'hémoglobine et hémogramme lors du don de sang
- **En 2013/2014** : La communauté transfusionnelle a accordé une attention particulière aux maladies transmises par les arbovirus émergents. Afin de prévenir la transmission du ZIKV par transfusion sanguine, une PCR a été mise en œuvre chez les donneurs de sang.
- **En 2016** : Evolution des conditions d'accès au don (9)

Depuis le 10 juillet à la suite d'une décision de Marisol Touraine, ministre en charge de la Santé, l'arrêté déposé le 5 avril 2016 met fin à l'éviction définitive des donneurs

homosexuels de sexe masculin. Ils peuvent à nouveau, sous certaines conditions, donner leur sang. Ils ne pouvaient plus le faire depuis la mesure adoptée par la France en 1983.

- **En 2018 / 2019** :Acquisition en série d'anticorps anti-érythrocytaires de spécificités différentes (10). L'historique transfusionnel seul n'est pas une voie complètement fiable pour identifier tous les individus qui présenteront une formation en série d'anticorps (11).
- **En 2019** : le retrait du test de dépistage de l'Ag HBs chez les donneurs de sang sous la condition qu'un test de biologie moléculaire sensible soit en place et que le dépistage des Acs anti-HBc se poursuive (12).
- **En 2020 (Au Maroc : CTS HMA Marrakech)** : Test covid-19 chez tous les donneurs et receveurs : PCR+sérologie.

### **III. Aspects législatifs organisant la réalisation des Ex. IH dans le cadre de TS au Maroc : (Textes de loi)**

La transfusion sanguine au Maroc a connu comme partout dans le monde une grande évolution depuis la deuxième guerre mondiale, bien marquée surtout après l'indépendance, et parallèlement à l'évolution du réseau hospitalier nationale, et au progrès scientifiques en matière de transfusion sanguine.

L'histoire de la transfusion sanguine au Maroc a commencé en 1943 par la création du 1er CTS à Fès par le Médecin Commandant J. Julliard. Puis à Casablanca en 1948, avant la création du CNTS à Rabat en 1956 (13). Le CTS des FAR, quant à lui, démarre en 1991 sous la direction du Médecin- Colonel S. NEJMI et du Médecin- Commandant M. Naji.

Depuis l'indépendance jusqu'à l'adoption de l'arrêté ministériel conjoint du 27 novembre 1986 (Mode de gestion SEGMA), le réseau transfusionnel national n'a pas bénéficié d'une attention particulière quant à son organisation, la révision de ses structures son fonctionnement ou la formation de ses cadres techniques et gestionnaires.

La politique du Ministère de la santé s'étant orientée beaucoup plus vers le développement et l'organisation du réseau de soins de santé de base ambulatoires et du réseau hospitalier.

Tout un texte réglementaire ayant permis d'organiser la réalisation des examens immuno-hématologiques dans le cadre de TS au Maroc. (Voir annexe1)



**CHAPITRE 2**

**LES EXAMENS IMMUNOHEMATOLOGIQUES AU CENTRE  
DE TRANSFUSION DE L'HOPITAL MILITAIRE AVICENNE  
MARRAKECH**

## I. Les examens immuno-hématologiques systématiques:

### A. Groupage sanguin ABO-RH1:

#### 1. Définition:

On note :

- La présence ou l'absence d'antigènes principaux A et/ou B à la surface des globules rouges des tissus et des sécrétions.
- La présence d'anticorps naturels et réguliers dans le sérum qui correspondent à l'antigène ou aux antigènes **absents** à la surface des globules rouges (14).

#### ❖ Aspect immunologique :

##### - Les antigènes ABO érythrocytaires :

Les antigènes du système ABO sont retrouvés au niveau de l'organisme à la surface de certaines cellules notamment les hématies, les leucocytes, les cellules épithéliales ; les cellules endothéliales des vaisseaux et au niveau du spermatozoïde mais aussi au niveau des organes tels que la peau, le rein, le colon et les glandes salivaires (sous forme des glycoprotéines).

Ils sont de nature glucidique ; caractérisés par deux sucres possibles à la surface de l'érythrocyte : un Galactose (Ag B) ; ou un N-Acétyl-Galactosamine (Ag A) ; ces sucres sont fixés sur une substance de base appelée : Substance H ; elle-même osidique.

Le système ABO comprend quatre antigènes : A (001), B (002), AB (003) et A1 (004), Le système H comprend un antigène de grande fréquence : H, précurseur biochimique des antigènes A et B (15).

Les deux principaux antigènes A et B portés par des oligosaccharides définissent les 4 phénotypes érythrocytaires :

- ❖ Le groupe A, si l'antigène A est seul présent sur les hématies.

- ❖ Le groupe B, si l'antigène B est seul présent sur les hématies.
- ❖ Le groupe AB, si les antigènes A et B sont tous présents.
- ❖ Le groupe O, si aucun antigène n'est présent (ni l'antigène A, ni l'antigène B).

Von Dungern mettant en évidence en 1911 (16) des différences individuelles de l'antigène A, a subdivisé le groupe A en deux sous-groupes A1 et A2 (et par conséquent le groupe AB en A1B et A2B. ces hématies sont agglutinées par les réactifs anti-A mais seules les hématies A1 et A1B sont agglutinées par l'anticorps anti-A1 polyclonal.

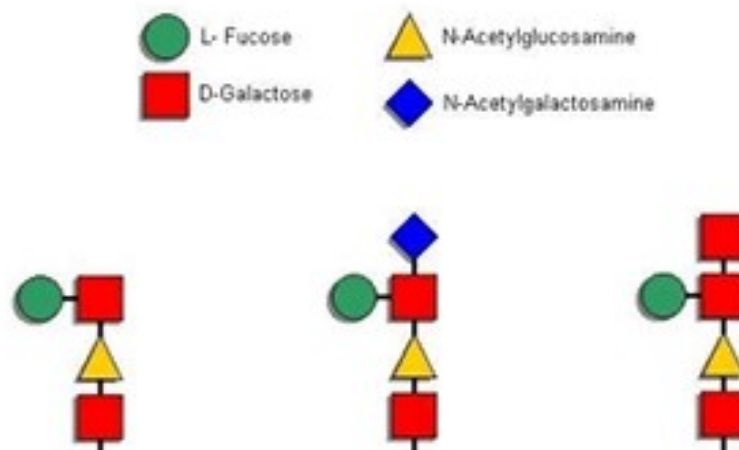


Figure 1: Présentation schématique des antigènes du système ABO (17)

-Les anticorps naturels ANTI-A et ANTI-B = iso-agglutinines :

Les anticorps anti-A et anti-B, dirigés contre les antigènes du système ABO, sont des anticorps naturels réguliers, c'est à dire qu'ils existent de façon constante chez tout individu adulte qui ne possède pas le(s)antigène(s) A et/ou B, en dehors de toute stimulation antigénique.

Il s'agit d'immunoglobulines de type M (IgM), retrouvés dès les premiers mois de vie (3-6mois) en dehors de toute allo-immunisation apparente. Ils seraient en fait suscités par la flore

bactérienne notamment la flore digestive (enterobacteriaceae) dont les constituants comportent des motifs antigéniques voisins des antigènes A et B.

Ces anticorps naturels ont les caractères sérologiques suivants:

- Ils sont capables d'**agglutiner** les hématies en suspension saline.
- Ils ont un **faible pouvoir hémolysant** in vitro.
- Ils sont toujours plus actifs à 4° qu'à 37°, leur optimum thermique est bas.
- Ils sont thermolabiles: leur activité agglutinante disparaît après un chauffage de 10 minutes à 70°.

-Les Anticorps immuns irréguliers :

Il s'agit le plus souvent d'IgG. Ils apparaissent à la suite de stimulations antigéniques variées (des globules rouges étrangers).

Les caractères sérologiques sont :

- Ils traversent le placenta.
- Des anticorps chauds dont l'optimum thermique est de 37°.
- Ils sont de nature incomplète, n'induisant pas d'agglutination en sérum physiologique et sont révélés par la réaction de Coombs.
- Ils possèdent un pouvoir hémolytique prononcé in vitro en présence de complément.
- Ils sont relativement thermostables et résistent à un chauffage à 70° pendant 10 mn.

-Cas particulier : le phénotype Bombay:

Le phénotype BOMBAY a été décrit pour la première fois en Inde. Il est extrêmement rare (18) et extrêmement dangereux : en apparence de groupe O, ce phénotype est caractérisé par l'absence d'antigène H, de l'antigène A et de l'antigène B **ET** donc la présence des anticorps anti-H , anti-A et anti-B.

Ces derniers provoqueront des réactions d'agglutination avec toutes les hématies à l'exception des hématies « Bombay ».

Un sujet étiqueté « Bombay » ne peut être transfusé que par des hématies Bombay.

| Groupe Sanguin | Antigène présent à la surface du globule rouge | Anticorps présent dans le plasma | Gènes |
|----------------|--|----------------------------------|-------|
| A              | A  | B                                | H et  |
| B              | B  | A                                | H et  |
| AB             | A et B   | Aucun                            | H, A, |

**Figure 2 : Les antigènes et les anticorps du système ABO**

| Groupe sanguin | Ag présent sur le GR | Ac présent dans le plasma |
|----------------|----------------------|---------------------------|
|                |                      |                           |

**Figure 3: Phénotype Bombay**

***- Le système RH :***

Le système RH a été découvert en 1940 par Landsteiner et Wiener (19).

Il comprend une cinquantaine d'antigènes mais seuls 5 d'entre eux présentent un intérêt clinique en médecine transfusionnelle. Il s'agit des antigènes D(RH1), C(RH2), E (RH3), c(RH4) et e(RH5).

Ils sont fortement immunisants et dont le plus important est l'Ag D :

- Sa présence définit le caractère Rhésus+ (85% des sujets) (20)
- Son absence définit le caractère Rhésus-

Ils sont de nature polypeptidique (contrairement au système ABO où il s'agit de glycoprotéine).

## 2. Principe :

### a. Principe du groupage ABO

La détermination du groupe sanguin ABO est basée sur :

- La présence ou absence des antigènes A et/ou B à la surface des GR.
- La présence « régulière » d'agglutinines « naturelles » antiA et/ou antiB

correspondant aux antigènes absents des GR.

De ce fait, le groupage ABO comporte deux étapes :

- La recherche des antigènes érythrocytaires = **Epreuve de Beth-Vincent**
- La recherche des anticorps plasmatiques = **Epreuve de Simonin**

L'identification du groupage ABO se fait par deux méthodes complémentaires obligatoires : la méthode de Beth-Vincent et la méthode de Simonin (21).

#### - *Épreuve de Beth-Vincent ou épreuve globulaire :*

Il s'agit d'un test d'agglutination des globules rouges avec des sérums tests. Elle consiste à rechercher les antigènes A et B sur la membrane érythrocytaire en utilisant un sérum test contenant des Ac connus. La présence ou l'absence d'agglutination permet de déterminer l'Ag (22).

#### - *Épreuve de Simonin ou épreuve plasmatique :*

Elle consiste à rechercher les anticorps anti-A et anti-B correspondant aux antigènes globulaires absents en utilisant des hématies-test connus. Elle permet d'identifier les Ac naturels réguliers du plasma (22).

Ces deux épreuves sont validées par des témoins :

- **Témoin allo** qui garantit l'épreuve sérique.
- **Témoin AB** qui garantit l'épreuve globulaire (abandonné car on utilise que des sérums tests contenant des anticorps monoclonaux spécifiques).
- **Témoin auto** pour vérifier l'absence d'auto-anticorps.

Le groupage ABO obéit à la règle 3X2 qui repose sur deux réalisations exécutées par deux techniciens différents avec deux lots de réactifs différents. La saisie manuelle des résultats doit aussi passer par une double saisie effectuée par deux personnes différentes.

Un 3eme groupage sanguin est effectué sur les poches du sang avant l'enregistrement, en réalisant juste l'épreuve globulaire afin de voir la concordance entre les résultats obtenus à partir des tubes échantillons et des poches de sang.

**b. Principe du phénotypage RH1 (Ag D)**

La détermination du phénotypage RH1 comporte obligatoirement l'utilisation d'un réactif antiRH1 d'origine monoclonale et du réactif témoin dépourvu de toute activité anticorps mais dont la capacité d'agglutination d'hématies sensibilisées est strictement identique à celle du réactif antiRH1 (23).

Le groupage Rh standard est réalisé à la température du laboratoire (22°C) , il consiste à rechercher l'Ag D(RH1) par technique d'agglutination directe entre l'antigène D porté sur les hématies à tester et le sérum test anti-D.

Cette recherche est effectuée en association avec la recherche des Ag A, Ag B par des Ac anti-A et anti-B lors du groupage ABO-RH1 sur plaque d'opaline et carte Gel.

### **3. Mode opératoire et réactifs :**

➤ **Les exigences réglementaires (24):**

Selon la réglementation en vigueur, en technique manuelle, une détermination de groupage sanguin ABO et de phénotypage RH1 repose sur deux réalisations concordantes exécutées par deux techniciens différents. En revanche, dans les conditions réglementaires d'automatisation et d'informatisation, une détermination correspond à une seule réalisation.

Le groupage ABO-RH1 n'est considéré comme définitif et validé pour être utilisé pour transfuser qu'après une seconde détermination sur un autre prélèvement ; cela en raison du caractère malheureusement non encore exceptionnel des erreurs d'identification au moment du prélèvement.

➤ **Prélèvement :**

Les prélèvements sont effectués (pour la qualification immuno-hématologique) par des infirmiers qualifiés. Ils sont réalisés par phlébotomie correcte de la veine du pli du coude dans un tube EDTA et /ou un tube citraté.

✓ **Tube EDTA** : tube à bouchon violet contenant l'anticoagulant « Ethylène Diamine Tétra-acétate », puissant chélateur du  $Ca^{2+}$  (facteur activateur de la coagulation).

✓ **Tube citraté** : tube à bouchon bleu contenant l'anticoagulant « citrate trisodique » qui existe sous deux concentrations : 0,109 M (3,2%) et 0,129 M (3,8%). Il exerce son activité anticoagulante en formant un complexe ionisé avec le calcium.

➤ **Réactifs :**

i. Réactifs pour le groupage ABO

❖ Les sérums-test :

Les 3 types sérum-test utilisés dans le groupage ABO sont :

- Sérum-test Anti-A agglutinant (IgM monoclonal murin).
- Sérum-test Anti-B agglutinant (IgM monoclonal murin).
- Sérum-test Anti-AB agglutinant (IgM monoclonal murin)



**Figure4** : sérums-test anti-A, anti-B et anti-AB

Ces antisérums sont préparés commercialement, conservés entre 2 et 8°C et contenant un agent bactériostatique. Ces sérums sont soit des anticorps d'origine humaine soit des anticorps monoclonaux murins. Pour faciliter leur identification, le réactif anti A contient un colorant Bleu, le réactif anti B un colorant jaune, le réactif anti AB est incolore.

❖ Les hématies-test :

Ce sont des hématies humaines préparées à partir d'un sang prélevé sur anticoagulant.

Elles sont lavées 3 fois en eau physiologique puis remises en suspension dans une solution conservatrice (isotonique) avec une dilution de 5 %.



Figure 5 : Les hématies test A+, B+ et O+

ii. Réactif pour le phénotypage RH1 (Ag D)

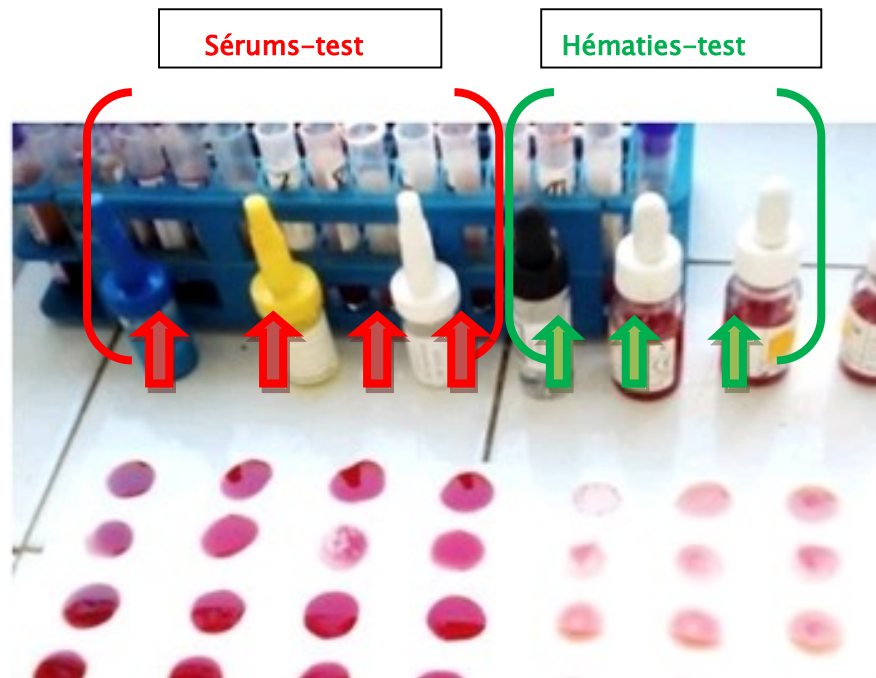


**Figure 6: Sérum-test anti-D**

**Mode opératoire :**

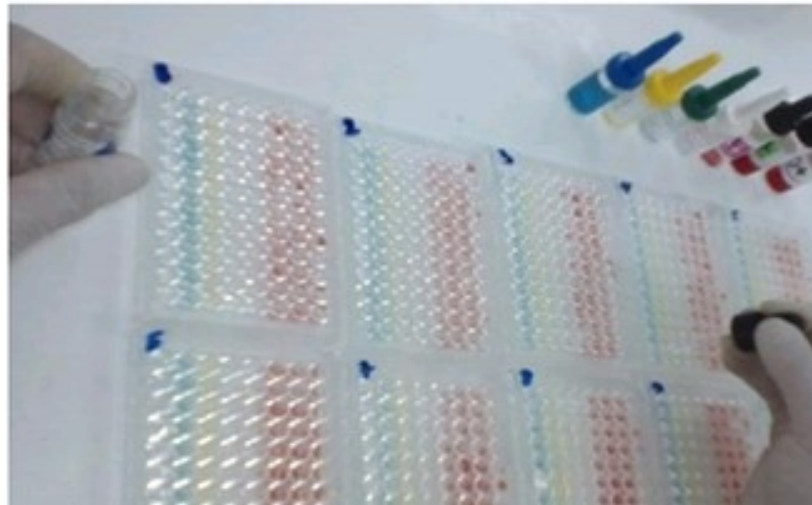
i. Mode opératoire du groupage ABO :

- Sur plaque d'opaline :
  - La présence d'agglutination nette sur fond blanc indique une réaction positive.
  - L'absence d'agglutination indique une réaction négative.

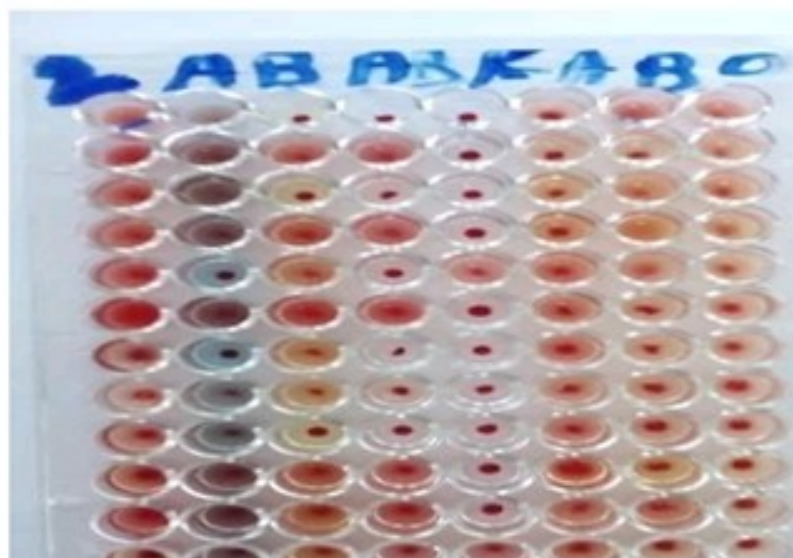


**Figure 7 :** Groupage du système ABO sur plaque d'opaline chez 5 patients (utilisant respectivement de gauche à droite : les sérums test anti-A, anti-B, anti-AB et l'anti-D et les hématies-test A+, B+, O+)

- Sur microplaque :
  - La réaction est positive en présence d'agglutination visualisée par des agglutinats qui ne se dissolvent pas après agitation manuelle.
  - La réaction négative se traduit par des hématies qui sédimentent au fond du puit de la microplaque et qui redeviennent en suspension après agitation manuelle.



**Figure 8** : Groupage du système ABO sur microplaque (Technique manuelle)



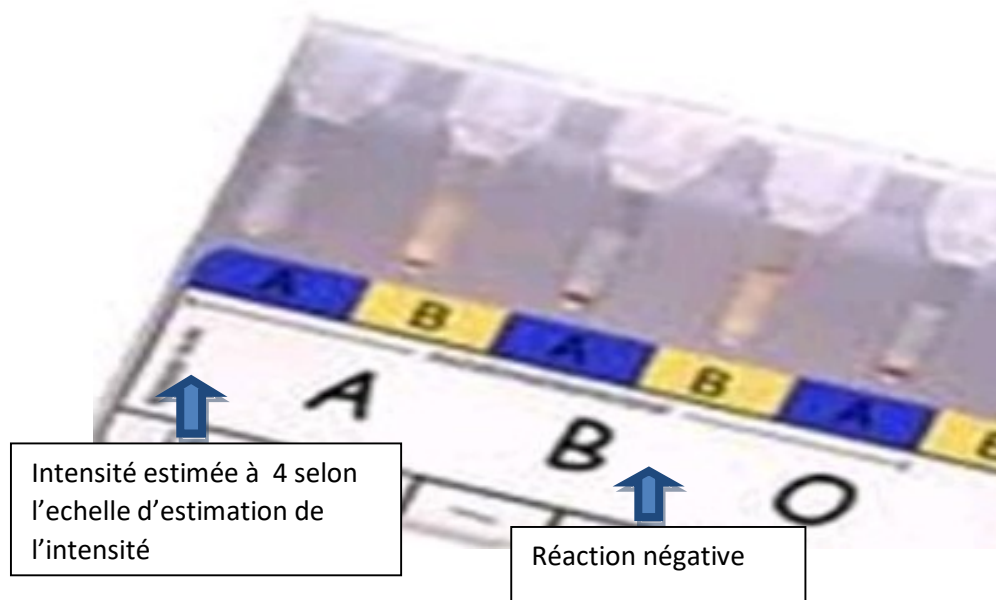
**Figure 9** : Image montrant le résultat de groupage du système ABO sur microplaque (utilisant un automate)

- Sur carte-gel :

Le test associe les principes d'agglutination et de filtration sur gel.

La réaction est obtenue et lue après centrifugation de microtubes spécialement conçus, remplis de gel imprégné de réactif spécifique de l'antigène érythrocytaire à déterminer.

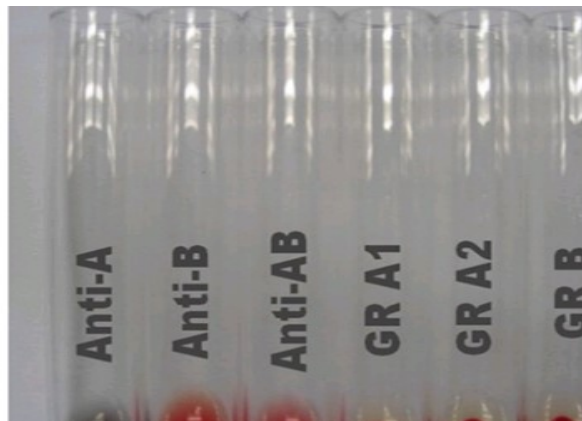
La suspension des globules rouges est déposée dans la cupule de chaque microtube et immédiatement centrifugée. Les GR non agglutinés sont collectés au fond du microtube, tandis que les agglutinats sont retenus dans la hauteur de gel en fonction de leur taille. Leur position dans le gel détermine l'intensité de la réaction.



**Figure 10 :** Technique de groupage ABO sur carte-gel

- ❖ Sur tube :

La réaction est positive en présence d'agglutination visualisée par des agglutinats qui ne se dissolvent pas après agitation manuelle du tube.



**Figure 11** : Technique de groupage du système ABO Sur tube

ii. Mode opératoire pour le phénotypage RH1 (Ag D)

❖ Sur plaque d'opaline :

- ❖ Si les hématies se remettent aisément en suspension sans se fragmenter, la réaction est négative.
- ❖ Si le culot des hématies se « fragmente » difficilement en un ou plusieurs blocs, voire pour les réactions faibles en fin granité ; la réaction est positive.



**Figure 12** : phénotypage rhésus associé au système ABO sur plaque d'opaline

|   |              |
|---|--------------|
| <b>1 goutte de sang de la personne</b>  | <b>LECTU</b> |
| <b>Présence d'agglutinations</b><br> | <b>Rh</b>    |
| <b>Absence d'agglutinations</b><br>  | <b>Rh</b>    |

Figure 13 : schéma de résultat de phénotypage rhésus standard.

❖ Sur carte-gel :

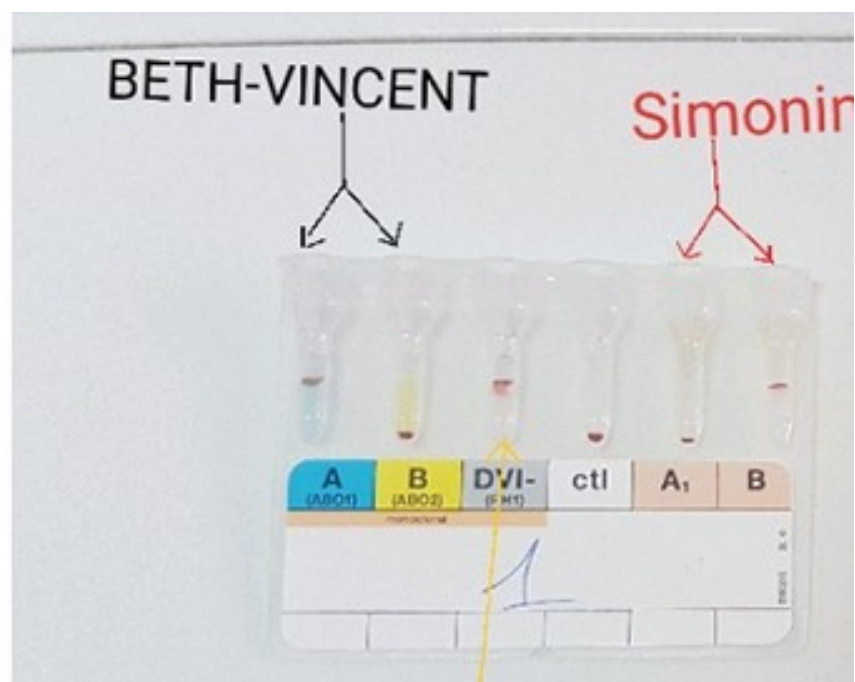


Figure 14 : Technique de phénotypage rhésus associé au système ABO sur carte-gel (Sujet A Rhésus positif)

#### **4. Interprétation (24) :**

Comme pour toute analyse phénotypique, la validation analytique du groupage sanguin ABO-RH1 repose sur :

- Les résultats conformes de contrôles internes de la qualité (CIQ)
- L'absence d'ambiguïté réactionnelle avec chaque réactif
- L'absence de double population (DP)
- De la cohérence absolue des réactions observées entre les épreuves globulaires et plasmatiques pour groupage ABO
- De la négativité du témoin réactif réalisé dans le cadre de la détermination du phénotype RH1
- De l'absence de divergence entre deux réalisations ou de discordance avec une antériorité de résultat.

##### **a. Interprétation des résultats du groupage ABO :**

Les résultats des 2 épreuves globulaire et plasmatique doivent être concordants pour les 2 techniciens :

- Lorsque les antigènes du système ABO sont présents sur les hématies à tester, les anticorps correspondants sont absents du plasma à tester.
- Lorsque les antigènes du système ABO sont absents des hématies à tester les anticorps correspondants sont présentes dans le plasma à tester.
- Si les résultats sont discordants, il faut refaire le groupage avec un 3ème lot de réactif. - Le groupage sanguin est validé si les témoins sont négatifs.

| Groupe sanguin | Beth-Vincent |        |         | Simonin |   |
|----------------|--------------|--------|---------|---------|---|
|                | Anti-A       | Anti-B | Anti-AB | A       | E |
| A              | +            | -      | +       | -       | + |
| B              | -            | +      | +       | +       | - |
| AB             | +            | +      | +       | -       | - |
| O              | -            | -      | -       | +       | + |

**Figure 15 :** Interpretation des epreuves Beth-Vincent et Simonin

**b. Interprétation des résultats du phénotypage RH1 (Ag D) :**

Résultats des deux techniques concordants = Groupage RH correct La présence d'agglutinat indique une réaction positive et signifie que le sujet est porteur de l'antigène D, il est dit sujet « RH1 positif ».

En revanche leur absence traduit une réaction négative qui doit être compléter obligatoirement par la recherche de l'antigène D faible chez les donneurs de sang, les femmes enceintes et les nouveau-nés de mère RH1 négatif. Seule l'absence du D faible, permet d'étiqueter ces catégories de RH1 négatif.

La recherche de l'Ag D faible se fait chez les donneurs ayant un phénotype Rh1 négatif, par une technique sensible : Le test du Coombs indirect ou test indirect à l'antiglobuline(TIA). (Voir annexe2).

| Groupage Rhésus | Anti-D |
|-----------------|--------|
| Rh positif      | +      |
| Rh négatif      | -      |

**Figure 16 :** Interpretation du groupage RH

## 5. Indications :

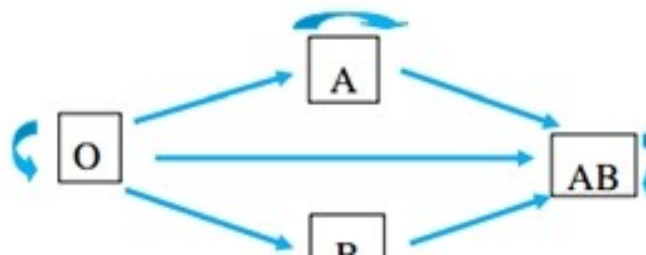
❖ **Avant toute transfusion sanguine ou don de sang.** En effet, l'injection de produit sanguin d'un donneur non compatible avec le groupe sanguin du receveur peut entraîner des accidents transfusionnels dramatiques.

➤ *les règles transfusionnelles (20) :*

Il faut noter l'intérêt clinique de ces anticorps naturels anti-A et anti-B . En effet, en se fixant à la surface d'hématies étrangères non compatibles dans le système ABO, ils sont capables d'induire une réaction d'hémolyse massive souvent mortelle.

On comprend alors les lois de compatibilité ABO qui doivent absolument être respectées dans la transfusion de culots globulaires :

- Un sujet de groupe O possède des anti-A et anti-B et ne peut être transfusé qu'avec des globules O.
- Un sujet de groupe A possède des anti-B et ne peut être transfusé qu'avec des globules A ou O.
- Un sujet de groupe B possède des anti-A et ne peut être transfusé qu'avec des globules B ou O.
- Un sujet de groupe AB ne possède pas d'anticorps naturels et peut être transfusé avec des globules A, B, AB ou O.



**Figure 17 : Règles de compatibilité ABO**

- ❖ **Chez les femmes enceintes (25) pour déterminer le risque d'avoir une incompatibilité Rhésus entre la mère et le fœtus.**

Cette incompatibilité peut survenir chez les femmes enceintes de leur deuxième ou troisième enfant, dépourvues du facteur Rhésus (Rh-), et peut entraîner l'apparition d'une **anémie** sévère, qui s'accompagne d'œdème, de jaunisse, voire de lésions cérébrales et peut exiger une transfusion ou le remplacement du sang de l'enfant.

- ❖ **Pour la validation de l'identification d'anticorps antiérythrocytaires.**
- ❖ La réalisation du groupage permet également de **suivre l'évolution d'une greffe de moelle :**

A la suite d'une greffe de cellules souches hématopoïétiques, les lymphocytes du malade peuvent encore sécréter des anticorps malgré la destruction de la moelle osseuse par chimiothérapie et irradiation intensive du corps. Cette faible production d'anticorps entraîne un risque hémolytique pour le patient en cas de greffe ABO incompatible.

Après adaptation des lymphocytes, le groupage sanguin fait apparaître des doubles populations sur les différents antigènes non compatibles entre le greffon et le patient. Le groupage permet donc de déterminer le début de la production des nouvelles cellules du greffon avec l'apparition des doubles populations.

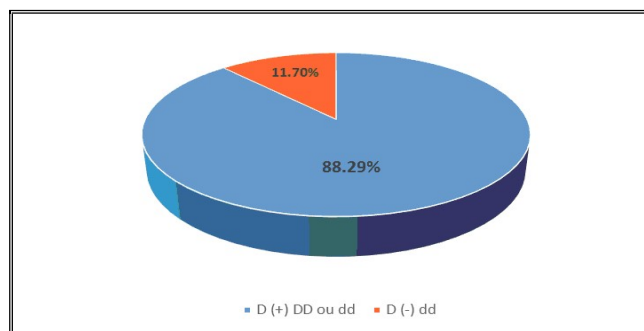
- ❖ **En médecine légale :**
  - Exclusion de paternité par identification des génotypes
  - Identification du groupe de liquide biologique (sang, urines ;...)

## **B. Phénotypage étendu RH-Kell1 :**

### **1. Définition :**

a. **Définition du phénotypage RH**

Après la découverte du système Rhésus en 1940, la problématique d'une nomenclature devint aigue en raison notamment de la double définition des antigènes de ce système avec la terminologie de Fisher, Race et Sanger (26) CcDdEe, et celle de Wiener, Rh/hr, qui aboutit à la coexistence de la désignation anti-D, anti-c, anti-e .... En Europe et anti-Rho, anti-hr', anti-hr'' ... En Amérique. Celle de Fisher et Race est la plus utilisé.



**Figure 18** : Prévalence des phénotypes Rh D sur les dons de sang effectués au CTS de l'HMA de Marrakech(27)

❖ **Aspect immunologique :**

- Les antigènes Rhésus :

➤ *Les caractéristiques des antigènes Rhésus :*

Caractérisés par une localisation strictement érythrocytaire.

Dans ce système, cinq antigènes principaux méritent d'être connus (surtout en pratique transfusionnelle) ; les antigènes D (RH1), C (RH2), E (RH3), c (RH4) et e (RH5), ils permettent de définir 8 halotypes, 18 phénotypes et 32 génotypes.

L'antigène Rhésus standard ou classique est l'antigène D, présent chez 85% des individus et responsable de la majorité des accidents en transfusion.

Les antigènes du système rhésus sont des antigènes :

- ✓ Restreints au GR
- ✓ Ils sont abondants sur le GR
- ✓ Ils sont codominants
- ✓ Ils sont antithétiques:
  - ❖ tout GR C négatif est systématiquement c positif et inversement
  - ❖ tout GR E négatif est systématiquement e positif
  - ❖ l'absence de l'un implique la présence de l'autre en double dose.
- ✓ Ils sont des Ags immunogènes surtout l'Ag D, leurs immunogénétique par ordre croissant est : **D > E > c > e > C.**

➤ *Les phénotypes du système Rhésus et leurs fréquences :*

- **Phénotypes courants :**

Tableau I : Prévalence des phénotypes Rh étendu sur les dons de sang effectués au CTS de l'HMA de Marrakech (28)

| Phénotype | Effectif | Prévalence en % |
|-----------|----------|-----------------|
| CcDee     | 2716     | 39.28           |
| CcDee     | 1414     | 20.45           |
| CCDee     | 953      | 13.78           |
| Ccdee     | 619      | 8.95            |
| CcDEe     | 596      | 8.62            |
| CcDEe     | 481      | 6.95            |
| CcDEE     | 80       | 1.15            |
| Ccdee     | 35       | 0.50            |
| CCDEe     | 7        | 0.10            |
| CcdEe     | 5        | 0.07            |
| CcDEE     | 4        | 0.05            |
| CcdEe     | 2        | 0.02            |
| CCdee     | 1        | 0.01            |

- **Variations phénotypiques:**

Ces variations phénotypiques sont dû au polymorphisme génétique, et donnent des variants du D, des variants du C et c, des variants du E et e.

\* Les variants D (29):

- **Antigène D faible ou Du :**

Les hématies du D faible ne sont pas agglutinées par tous les antiD en test de routine, par contre elles sont beaucoup mieux détectées par l'utilisation de techniques plus sensibles telles que le test de coombs indirect ou des hématies préalablement traitées par protéase.

Les GR D faible sont considéré comme GR RH+.

- **Antigène D partiel :**

On considérant l'antigène RH1 « normal » comme une mosaïque d'épitopes, tous présents chez le sujet RH1 et tous absents chez le sujet RH :-1. Certains sujets, nommés RH1 « partiels » peuvent ne présenter qu'une partie de cette mosaïque.Ce sont des modifications qualitatives de la protéine RH1.

Ces modifications peuvent donner lieu à une alloimmunisation anti-RH1 (anti-D), en cas de présence d'une stimulation obstétrico-transfusionnelle par l'antigène RH1 « complet ». Il s'agit bien d'une immunisation contre la partie manquante.

\* Les variants C et c : Exemple : Ag Cw, Ag Cx, Ag Cg,...etc.

\* Les variants E et e : Exemple : Ag faible Eu, Ag Ew, Ag Es,...etc.

- **Les anticorps Rhésus :**

Contrairement, aux allo-anticorps du système ABO, les allo-anticorps dirigés contre les antigènes du système rhésus **sont toujours acquis** soit lors des transfusions, soit lors de grossesses ( le fœtus portant des antigènes d'origine paternelle et immunisant sa mère ) sauf l'antigène anti E qui est naturel .

Ces allo-anticorps acquis sont dits immuns, n'apparaissant qu'après stimulations antigénique, ils sont irréguliers le plus souvent de classe IgG (en particulier IgG1 et IgG3).

Ces anticorps peuvent être à l'origine de la maladie hémolytique néonatale par leur pouvoir de traverser la barrière placentaire.

➤ Les caractéristiques des anticorps Rhésus :

- Ce sont des AC de nature immune de type IgG rarement IgA .
- Ce sont des AC chaud : optimum thermique 37°C.
- Ils n'agglutinent que très rarement les GR RH+ en suspension saline mais nécessite des techniques plus sensibles.
- Ils sont hémolysants.

b. **Définition du phénotypage Kell**

Le système Kell est le troisième système est important en transfusion. La présence ou l'absence d'un antigène dénommé antigène K définit le groupe Kell+ ou Kell-.

Le système Kell est le système le plus immunogène après le système Rhésus, les anticorps dirigés contre ses antigènes sont toujours d'origine immune.

L'importance du système Kell est due à l'antigène K qui possède un fort pouvoir immunogène. Il figure parmi les antigènes les plus immunogènes après l'antigène D (30,31).

l'antigène K ( k1 ) est présent chez 5 à 10 % des sujets de race blanche.

Les antigènes Kell dont l'expression se trouve restreinte à la lignée érythrocytaire, sont bien développés à la naissance.

Pour les anticorps anti-Kell, ils résultent généralement d'une allo-immunisation par transfusion sanguine. Ce sont des IgG, L'anti-K est le plus fréquent et aussi le plus dangereux.

## 2. **Principe :**

Le phénotypage RH-Kell1 consiste à rechercher les antigènes des systèmes RH et K exprimés sur la membrane du globule rouge, au moyen d'anticorps de spécificité connue.

Il comprend l'étude conjointe de seulement 4 antigènes du système de groupe sanguin Rhésus (RH) , les Ag RH2 (C) (32), RH3 (E) (33), RH4 (c) (34) et RH5 (e) (35), et du premier Ag du système Kell l'antigène Kell1 (K) (36).

Il consiste à rechercher par deux personnes différentes, les Ag C, c, E, e, K à la surface des hématies par technique d'agglutination directe entre ces antigènes porté sur les hématies à tester et les sérum test spécifiques.

Une réalisation du phénotype RH-Kell1 comporte obligatoirement l'utilisation de réactifs monoclonaux antiRH2, antiRH3, antiRH4, antiRH5, antiKell1 et du (des) réactif(s) témoin(s) adéquat(s) (37).

Pour le réactif témoin, la capacité d'agglutination d'hématies sensibilisées *in vivo* doit être strictement identique à celle du ou des réactifs utilisés pour déterminer la présence ou l'absence des antigènes.

Si ces réactifs ne sont pas constitués de la même solution, le réactif témoin doit être aligné sur le réactif qui présente la capacité d'agglutination la plus importante.

Dans l'état actuel de la législation, un phénotype RH-Kell1 est dit « valide » lorsqu'on dispose de deux résultats issus de deux prélèvements différents à raison d'une détermination par prélèvement.

### **3. Mode opératoire et réactifs à utiliser :**

#### **➤ Les exigences réglementaires (38) :**

- Une détermination repose sur deux réalisations exécutées par deux personnes différentes.

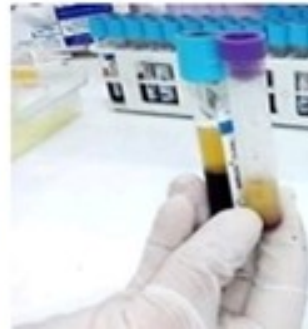
- La saisie des résultats, lorsqu'elle est manuelle, nécessite une double saisie effectuée par deux personnes différentes.

#### **➤ Prélèvement :**

Ils sont réalisés par phlébotomie correcte de la veine du pli du coude dans un tube EDTA et /ou un tube citraté.



**Figure 19** : Prélèvement par phlébotomie



**Figure 20** : Tube EDTA et citraté

➤ **Réactifs :**

On utilise le même matériel pour faire le phénotype sur plaque d'opaline ou sur microplaque.

- ✓ Sérum-test Anti-C agglutinant (IgM monoclonal).
- ✓ Sérum-test Anti-E agglutinant (IgM monoclonal).
- ✓ Sérum-test Anti-c agglutinant (IgM monoclonal).
- ✓ Sérum-test Anti-e agglutinant (IgM monoclonal).
- ✓ Sérum-test Anti-Kell agglutinant (IgM monoclonal).



**Figure 21** : les sérums-test Anti-C, Anti-E, Anti-c, Anti-e et Anti-K

➤ **Mode opératoire :**

- Technique d'agglutination **sur plaque** pour la recherche des antigènes (C, E, c, e et K) :

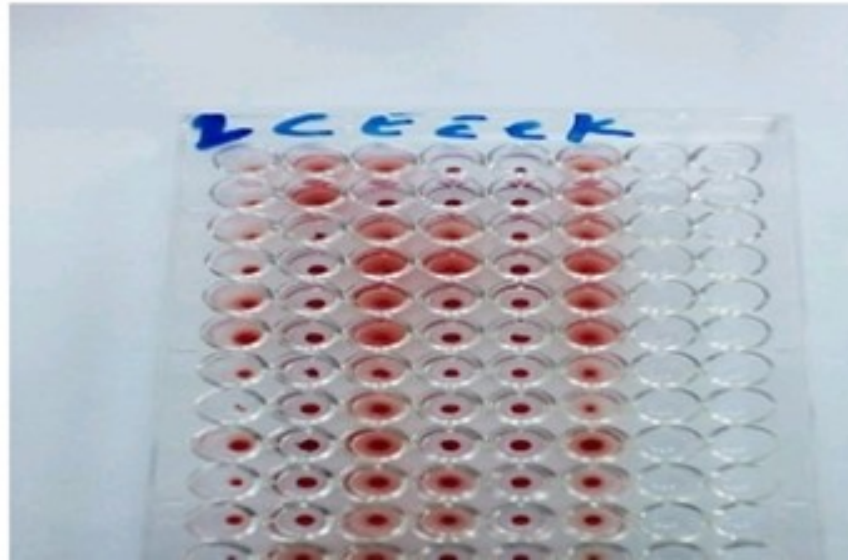
En faisant pivoter légèrement la plaque d'opaline, on contrôle l'apparition d'une agglutination dans un délai de 1 minute.



**Figure 22 : résultats du test d'agglutination direct sur plaque**

- Technique d'agglutination **sur microplaques** pour la recherche des antigènes (C, E, c, e et K) :

La présence d'agglutination indique que l'échantillon testé possède l'antigène correspondant. L'absence d'agglutination avec le réactif constitue un résultat négatif et indique que l'échantillon testé est dépourvu de l'antigène correspondant.



**Figure 23 :** Technique d'agglutination sur microplaques pour la recherche des antigènes (C, E, c, e et K)

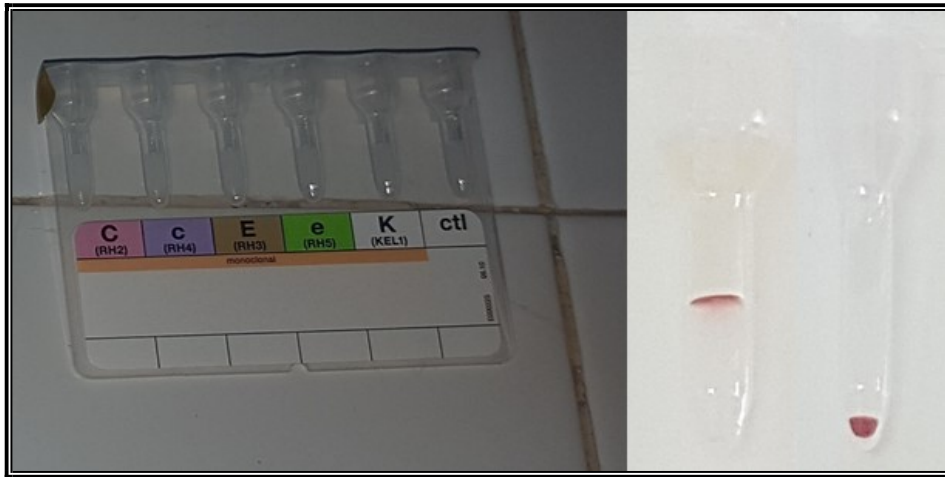
- **Technique sur carte-gel :**

Le phénotypage Rhésus(C, c, E, e) est effectué sur carte gel à la température du laboratoire 22°C.

La méthode du phénotypage pratiquée sur carte Gel est la suivante :

1. Préparer une suspension de globules rouges
  - En distribuant 1 ml de Scan Liss (LowIonicStrength Saline) dans un tube à usage unique, identifié
  - Rajouter 10 µl de culot globulaire puis on a mélangé.
2. Identifier la carte par le numéro d'échantillon correspondant, Remettre en suspension les globules rouges avant utilisation.
3. Distribuer 50 µl de suspension globulaire dans la cupule de chaque microtube de la carte.
4. Incuber le mélange pendant 15mn à 37°C

5. Centrifuger 10 minutes dans une centrifugeuse.
6. Lecture des réactions.



**Figure 24 :** Carte gel phénotype Rh + Kell avant emploi et exemple de réaction+ et -

#### 4. Interprétation des résultats :

La présence d'agglutination indique que l'échantillon testé possède l'antigène correspondant.

L'absence d'agglutination avec le réactif constitue un résultat négatif et indique que l'échantillon testé est dépourvu de l'antigène correspondant.

Le résultat des deux méthodes doit être concordant.

#### 5. Indications (39) :

- En absence d'antécédents transfusionnels connus :

1. Dans le contexte médical :

La prescription des examens groupes sanguins ABO-RH1 et phénotype RH-KEL1 est faite dès lors que l'indication d'une transfusion est posée ou que le diagnostic est associé à une

probabilité élevée de nécessité de transfusion, et ce en l'absence de déterminations antérieures, valides et disponibles.

- Pour objectif de prévenir la survenue d'un accident hémolytique, pour les patients ayant développé un ou des alloanticorps antiérythrocytaires contre au moins l'un des antigènes suivants : RH1, RH2, RH3, RH4, RH5 et KEL1.
- Patients atteints d'hémoglobinopathies; patients atteints d'affections chroniques dont la survie prolongée est conditionnée par des transfusions itératives de CGR comme dans les myélodysplasies; patients présentant un groupe sanguin rare.
- Le phénotypage RH-KEL1 est indiqué chez la jeune fille ou femme avant la ménopause afin de prévenir l'allo-immunisation.
- Chez les patients à greffer.

## **2. Dans un contexte périnatal :**

Les Ac maternels dirigés contre les Ag RH-Kell1 présentent un risque d'hémolyse fœtale ou néonatale.

A ce titre ; la surveillance immunohématologique pendant la grossesse inclut la recherche des AC anti-érythrocytaires (RAI) et les typages ABO RH1 et RH Kell1 de la mère afin de déterminer les AC correspondant à ces Ag qu'elle est susceptible de fabriquer.

## **3. Dans le contexte de validation de l'identification d'AC antiérythrocytaires.**

### **4. Dans le contexte pré-interventionnel :**

- Il n'est pas recommandé de prescrire les examens groupes sanguins ABO-RH1 et phénotype RH-KEL1 en cas d'intervention à risque de transfusion ou de saignement nul à faible.
- Il est recommandé de prescrire les examens groupes sanguins ABO-RH1 et phénotype RH-KEL1 en cas d'intervention à risque de transfusion intermédiaire ou

élevé ou de saignement important, et ce en l'absence de déterminations antérieures, valides et disponibles.

- Il est recommandé, lorsque la check-list « Sécurité au bloc opératoire » mentionne un risque de saignement important, de vérifier la présence des résultats des examens des groupes sanguins ABO-RH1 et phénotype RH-KEL1.
- Dans le cas où le patient a des antécédents de transfusion connus, quelque soit le contexte :
  - Il est recommandé d'utiliser les résultats antérieurs de groupes sanguins ABO-RH1 et phénotype RH-KEL1 après avoir vérifié la concordance stricte des informations d'identité du patient figurant sur les résultats et sur les données d'admission.
  - Le phénotypage RH-KEL1 est indiqué chez les patients devant recevoir des transfusions itératives, chez les patients à greffer, chez les patients présentant un anticorps irrégulier et en présence d'antécédents de transfusion connus afin d'éviter le conflit immuno-hématologique (40).

## **C. Recherche des agglutinines irrégulières : RAI**

### **1. Définition :**

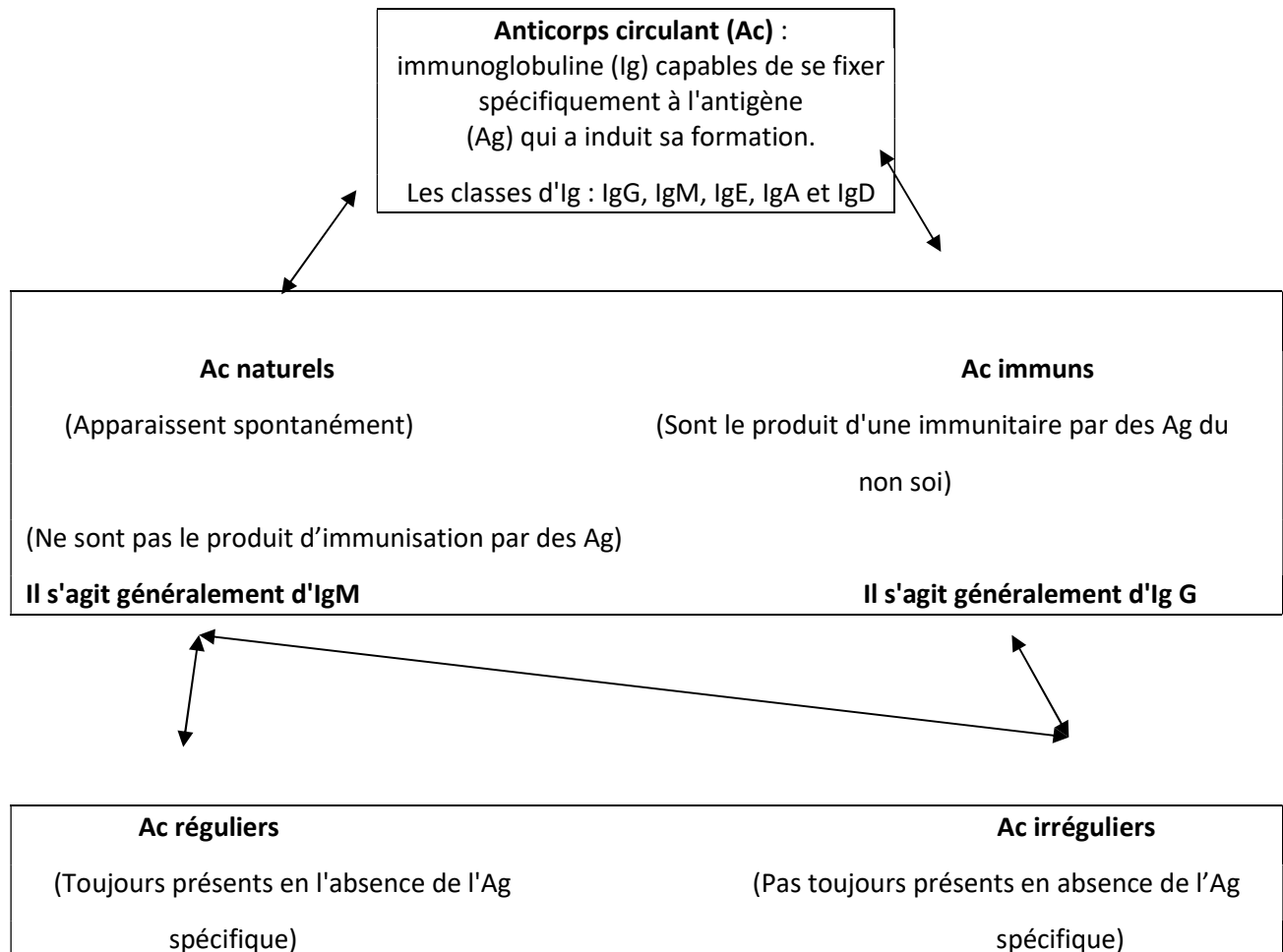
La recherche des anticorps anti-érythrocytaires est une analyse biologique essentielle pour la prévention et le diagnostic des accidents immunohémolytiques transfusionnels et le diagnostic des incompatibilités foeto-maternelles.

La validité de cette recherche est habituellement de 3 jours (72 heures) pour la transfusion de concentrés de globules rouges (CGR) (20).

- Le délai peut être porté à 21 jours si la RAI est négative dans le cadre de protocoles particuliers sur indication formelle du prescripteur

- Le délai peut être réduit en cas de transfusions répétées rapprochées.

Origine de la présence d'Ac irréguliers chez un patient :



- Donc : 2 types d'Ac irréguliers :
  - ✓ Ac immuns (toujours irréguliers)
  - ✓ Ac naturels irréguliers

**Tableau II : Caractéristiques sérologiques des Ac naturels et Ac immuns (41).**

| Caractéristiques sérologiques | Ac naturels                               | Ac immuns                                  |
|-------------------------------|---|--|
| Apparition                    | Sans pré-immunisation apparente préalable | Avec pré-immunisation (contact avec un Ag) |
| Présence                      | Réguliers/ irréguliers                    | Toujours irréguliers                       |
| Optimum thermique             | 0° à 20° (Ac froids)                      | 37° (Ac chauds)                            |
| Fixation complément           | ++  | +  |
| Transfert placentaire         | Non                                       | Oui  |
| Classe d'Ig                   | IgM                                       | IgG  |
| Pouvoir agglutinant           | agglutination directe<br>(Ac complet)     | agglutination indirecte<br>(Ac incomplet)  |

## **2. Principe :**

La R.A.I, à pour objectif, la mise en évidence et l'identification des anticorps anti-érythrocytaires en mettant en présence le serum (ou le plasma à étudier) avec une gamme d'hématies-tests O phénotypées dans la plupart des systèmes de groupes sanguins.

La présence d'anticorps se traduit classiquement par une réaction d'agglutination.

La recherche des agglutinines irrégulières comporte deux étapes dont l'enchaînement est sous la responsabilité du biologiste :

❖ Une étape de dépistage

- Au terme de laquelle le laboratoire pourra répondre « dépistage positif » ou «dépistage négatif ».

- Suite à un dépistage positif une identification doit être mise en œuvre.

La présence d'AI est recherchée dans le sérum d'un patient –par agglutination active indirecte (COOMBS indirect et test enzymatique), –à l'aide de 3 séries d'hématies de groupe O et de phénotypes connus (les Ag des 3 séries d'hématies doivent correspondre à l'ensemble des AI recherchés).

Les 3 lots d'hématies tests de groupe O doivent permettre la détection des Ac correspondants aux Ag RH1 (D), RH2(C), RH3 (E), RH4 (c), RH5 (e), KEL 1 (K), KEL 2 (Cellano k), KEL 4 (Kpb), FY1 (Fya), FY 2 (Fyb), JK1 (Jka),JK2 (Jkb), MNS1 (M), MNS2 (N), MNS3 (S), MNS4 (s), LE1 (Lea), LE2 (Leb), P1, LU1 (Lua) LU2 (Lub).

- Les phénotypes RH suivants doivent être obligatoirement représentés sur la gamme de dépistage :

- RH: 1, 2, -3, -4, 5 (DCe)

- RH: 1, -2, 3, 4, -5 (DcE)

- RH: -1, -2, -3, 4, 5 (dce)

Une expression du phénotype « homozygote » doit être respecté pour les Ag FY1, JK1, JK2, MNS3 et recommandée pour les Ag FY2 et MNS4.

❖ Une étape d'indentification :

❖ Si le dépistage d'AI est positif, l'identification de ou des AI doit être réaliser.

❖ Elle consiste à déterminer la spécificité du ou des anticorps présents en confrontants les réactions positives et négatives obtenues avec la distribution des antigènes sur la gamme d'hématies–tests utilisée.

- ❖ l'identification est réalisée selon le même principe que précédemment, mais en utilisant 10 séries d'hématies phénotypées de groupe O (panel d'identification).
- ❖ L'ensemble de ces hématies de groupe O doit comporter les antigènes suivants : Ag RH1 (D), RH2 (C), RH3 (E), RH4 (c), RH5 (e), RH8 (Cw), KEL 1 (K), KEL 2 (Cellano k), KEL3 (Kpa), KEL 4 (Kpb), FY1 (Fya), FY 2 (Fyb), JK1 (Jka), JK2 (Jkb), MNS1 (M), MNS2 (N), MNS3 (S), MNS4 (s), LE1 (Lea), LE2 (Leb), P1, LU1 (Lua), LU2 (Lub).
- ❖ Les phénotypes suivants doivent être représentés au moins sur 2 hématies : KEL1, FY1;-2, JK 1;-2, JK-1;2, MNS 3;-4, MNS -3;4, P-1.
- ❖ Les AI identifiés pourront ensuite être dosés.
- ❖ La durée légale de validité des AI identifiée est de 3 jours.

### 3. Mode opératoire et réactifs à utiliser :

➤ **Conditions :**

- La RAI doit être réalisée sur un prélèvement frais et conservé dans de bonnes conditions à + 4 °C (42).
- Elle a une validité maximum de 3 jours pour la transfusion de concentrés de globules rouges (CGR).

➤ **Réactifs :**

Hématies phénotypées de groupe O :

- ❖ **panel de dépistage** : 3 séries d'hématies dont l'éventail des Ag couvre l'ensemble des AI recherchés :      →      **Dépistage** des AI
- ❖ **panel d'identification** : 10 séries d'hématies      →      **identification** des AI (si le dépistage est positif).

➤ **Mode opératoire :**

➤ en technique de **gel-filtration** ou **immunoadhérence** :

❖ Panel de dépistage :

- Un panel de dépistage est utilisé. Ce panel est constitué généralement 3 lots d'hématies, l'ensemble de ces lots d'hématies devant posséder l'ensemble des Ag spécifiques des Ac irréguliers recherchés.
- Le sérum du patient est testé sur chacun de ces lots d'hématies :
  - ✓ *Test de Coombs indirect*
  - ✓ Éventuellement *test à la papaïne\**(non obligatoire).

|                    |               | Présence (+) ou absence (-) des Ag à la surface des hématies du lot |   |      |   |       |   |      |     |     |     |       |   |   |    | Résultat |                 |                 |                      |                |    |    |     |     |     |  |
|--------------------|---------------|---|---|------|---|-------|---|------|-----|-----|-----|-------|---|---|----|----------|-----------------|-----------------|----------------------|----------------|----|----|-----|-----|-----|--|
|                    |               | Rhésus  |   | Kell |   | Duffy |   | Kidd |     | MNs |     | Lewis |   | P | Cw | Luthéran |                 |                 | Coombs indirect 37°C | Papaïne * 37°C |    |    |     |     |     |  |
| Lots de GR         |               | D   | C | c    | E | e     | K | k    | Fya | Fyb | Jka | Jkb   | M | N | S  | s        | Le <sup>a</sup> | Le <sup>b</sup> |                      |                | PI | Cw | Lua | Lub | Kpa |  |
| Panel de dépistage | 1             | +   | + | -    | - | +     | - | +    | +   | -   | -   | +     | + | + | +  | +        | +               | -               | +                    | +              | +  | +  | +   |     |     |  |
|                    | 2             | +   | - | +    | + | -     | - | +    | -   | +   | +   | +     | + | - | +  | -        | -               | +               | +                    | -              | -  | -  | +   | +   |     |  |
|                    | 3             | -   | - | +    | - | +     | + | +    | +   | +   | +   | +     | + | - | -  | +        | -               | +               | S                    | -              | -  | +  | -   |     |     |  |
|                    | Auto contrôlé |   |   |      |   |       |   |      |     |     |     |       |   |   |    |          |                 |                 |                      |                |    |    |     |     |     |  |

**Figure 25 :** Panel de dépistage à l'aide du test de coombs indirect et test à la papaïne (43)

❖ Panel d'identification :

- Un panel d'identification comprenant 10 lots d'hématies est utilisé.
- L'ensemble de ces lots doit posséder l'ensemble des Ag spécifiques des Ac irréguliers recherchés.
- Cependant chaque lot possède moins d'Ag que le panel de dépistage.

Le sérum du patient est testé sur chacun de ces lots d'hématies :

- ✓ *Test de Coombs indirect*
- ✓ Éventuellement *test à la papaïne* (non obligatoire). (voir annexe 3).

**N.B :** Importance des techniques employées pour l'identification des agglutinines irrégulières.

✓ Il faut savoir que la majorité des Ag érythrocytaires peuvent être reconnus par Ac irréguliers par le test de Coombs indirect, alors que certains Ag érythrocytaires sont détruits ou affaiblis par la réaction à la Papaïne et donc ne peuvent être reconnus par les Ac irréguliers correspondants (44).

✓ Par exemple :

- Ag Fya et Fyb sont détruits par la papaïne.
- Ag M et N ainsi que S et s peuvent éventuellement être affaiblis.

|            |                        | Présence (+) ou absence (-) des Ag à la surface des hématies du lot |    |      |   |       |   |      |     |     |     |       |   |   |    | Résultat        |                 |                      |               |    |    |     |     |     |
|------------|------------------------|---|----|------|---|-------|---|------|-----|-----|-----|-------|---|---|----|-----------------|-----------------|----------------------|---------------|----|----|-----|-----|-----|
|            |                        | Rhésus  |    | Kell |   | Duffy |   | Kidd |     | MNs |     | Lewis |   | P | Cw | Luthéran        |                 | Coombs indirect 37°C | Papaïne* 37°C |    |    |     |     |     |
| Lots de GR | PANEL D'IDENTIFICATION | D   | C  | e    | e | K     | k | Fya  | Fyb | Jka | Jkb | M     | N | S | s  | Le <sup>a</sup> | Le <sup>b</sup> |                      |               | PI | Cw | Lua | Lub | Kpa |
|            |                        |   | 01 | +    | + | -     | + | +    | +   | +   | +   | +     | + | + | -  | +               | -               | -                    | +             | +  | +  | -   | +   | -   |
|            | 02                     | +   | +  | -    | + | -     | + | -    | +   | +   | -   | +     | - | + | +  | +               | +               | +                    | -             | -  | +  | -   |     |     |
|            | 03                     | +   | -  | +    | + | -     | + | -    | +   | -   | +   | +     | + | + | +  | -               | +               | -                    | -             | +  | +  | -   |     |     |
|            | 04                     | -   | +  | +    | - | +     | + | -    | +   | -   | +   | +     | - | + | -  | +               | -               | -                    | -             | -  | +  | -   |     |     |
|            | 05                     | -   | -  | +    | + | +     | + | +    | -   | +   | +   | -     | + | - | +  | -               | +               | S                    | -             | -  | +  | -   |     |     |
|            | 06                     | -   | -  | +    | - | +     | + | -    | +   | +   | +   | -     | + | - | +  | +               | -               | -                    | -             | -  | +  | -   |     |     |
|            | 07                     | -   | -  | +    | + | +     | + | +    | -   | -   | +   | +     | + | + | -  | -               | -               | -                    | -             | -  | +  | -   |     |     |
|            | 08                     | +   | -  | +    | + | +     | + | -    | -   | +   | -   | +     | + | + | +  | +               | -               | +                    | -             | -  | W  | -   |     |     |
|            | 09                     | -   | -  | +    | - | +     | + | +    | -   | +   | -   | +     | - | + | -  | -               | +               | +                    | -             | -  | +  | -   |     |     |
|            | 10                     | -   | -  | +    | - | +     | + | -    | +   | +   | -   | +     | + | - | +  | +               | -               | -                    | -             | +  | +  | -   |     |     |
|            | 11                     | -   | -  | +    | - | +     | + | +    | +   | +   | -   | +     | - | + | -  | -               | +               | S                    | -             | -  | +  | +   |     |     |
|            | Auto contrôle          |   |    |      |   |       |   |      |     |     |     |       |   |   |    |                 |                 |                      |               |    |    |     |     |     |

**Figure 26:** Panel d'identification utilisant le test de coombs indirect et test à la papaïne (44)

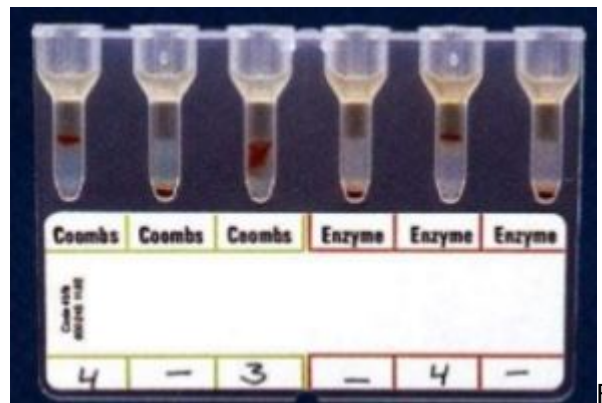


Figure 27 : Carte gel utilisant le test de coombs et l'enzyme à la papaïne

#### 4. Interprétation :

##### ❖ **Dépistage des agglutinines irrégulières :**

- Si cette étape de dépistage s'avère négative, la RAI est rendue négative, en revanche, si le dépistage est positif, une identification est alors obligatoire :
- → Des résultats négatifs [absence (-) d'agglutination] aux tests de Coombs indirect (et à la papaïne), avec les 3 lots d'hématies, prouvent l'absence d'agglutinine irrégulière (AI).
- → Des résultats positifs [présence (+) d'agglutination] aux tests de Coombs indirect (et à la papaïne), avec un lot au moins d'hématies, prouveraient la présence d'agglutinines irrégulières, qu'il faudra identifier puis titrer.

##### ❖ **Identification des agglutinines irrégulières :**

- La lecture du panel de d'identification permet d'identifier le ou les AI probable(s).
- L'identification de la spécificité nécessite de trouver une relation entre les réactions positives et négatives observées avec l'absence ou la présence d'un Ag sur les hématies testées correspondant à l'anticorps suspecté.
- L'identification fait appel aux connaissances des fréquences des différents phénotypes dans tous les systèmes de groupes sanguins, des anticorps les plus fréquemment rencontrés en

raison de l'immunogénicité des antigènes correspondants, des variations de la force antigénique d'un donneur d'hématies-tests à un autre, des différents types de réactions d'agglutination en fonction des systèmes concernés, des effets de dose de certains anticorps, des techniques préférentielles de mise en évidence des anticorps en fonction des procédés utilisés.

Plusieurs situations peuvent être rencontrées :

**1. L'identification la plus simple est celle qui met en évidence un anticorps unique à condition :**

- Qu'il soit en concentration suffisante pour agglutiner toutes les hématies testées quelle que soit leur expression phénotypique homozygote ou hétérozygote pour un antigène donné,
- Que le nombre de réactions positives observées soit suffisant, sinon, il faudra tester le sérum sur plusieurs hématies-tests supplémentaires possédant l'antigène concerné.

**2. Les résultats de l'étude des réactions positives et négatives obtenues avec les hématies-tests de la gamme d'identification font suspecter un mélange d'anticorps.**

- Chacune des spécificités suspectées doit être confirmée de façon séparée en utilisant plusieurs gammes différentes d'hématies-tests d'identification.

**3. Le sérum testé agglutine toutes les hématies-tests des différentes gammes d'identification.**

- Dans ce cas, il peut s'agir là encore d'un mélange complexe d'anticorps, d'un anticorps dirigé contre un antigène de grande fréquence ou « public », ou d'un auto-anticorps.
- On procède alors à la réalisation du témoin autologue :
  - s'il s'avère positif, il convient d'adsorber l'auto-anticorps pour déceler et identifier un éventuel allo-anticorps masqué.
  - s'il s'avère négatif, il s'agit d'un problème encore plus complexe concernant :

- ✓ l'identification correcte des anticorps qui nécessite de disposer de gammes d'hématies- tests (conservées en azote à  $-160\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) informatives ou dépourvues d'antigènes de grande fréquence,
  - ✓ mais aussi la disponibilité d'unités de sang rare, en cas de besoin transfusionnel.
- ❖ L'AI identifiée est ensuite titrée. Le sérum est alors conservé par congélation en vue de titrage ultérieurs. (Voir annexe 4)

## 5. Indications :

- chez tout patient susceptible d'être transfusé,
- avant toute transfusion ou toute nouvelle série de transfusions,
- après incident transfusionnel (dans le cadre du suivi d'hémovigilance),
- chez les patients polytransfusés,
- chez la femme enceinte,
  - ❖ Cette recherche est systématique (45-47):
- au moins à 2 reprises chez les femmes enceintes de phénotype RH1 primigeste et sans antécédent transfusionnel :
  - ✓ avant la fin du 3e mois (1er examen prénatal).
  - ✓ au cours des 8e ou 9e mois.
- au moins à 4 reprises :
  - ✓ chez les femmes de phénotype RH1 primigeste avec antécédent transfusionnel,
  - ✓ chez les femmes de phénotype RH1 à partir de la 2e grossesse (en raison de l'hémorragie fœto-maternelle à l'accouchement),
  - ✓ chez les femmes de phénotype RH :-1.

- à l'accouchement :
  - ✓ chez les femmes de phénotype RH :-1 avant l'injection d'« immunoglobuline anti-D »,
  - ✓ chez l'ensemble des femmes en cas de besoin transfusionnel,
- dans les huit semaines suivant l'accouchement.

## D. Épreuve directe de compatibilité au laboratoire : EDCL

### 1. Définition :

L'épreuve directe de compatibilité (EDCL), encore appelée cross-matching (« réaction croisée »), est un examen de laboratoire qui consiste à tester, dans les mêmes techniques que la recherche d'anticorps irréguliers, le sérum ou le plasma du malade vis-à-vis des concentrés érythrocytaires prévus pour sa transfusion.

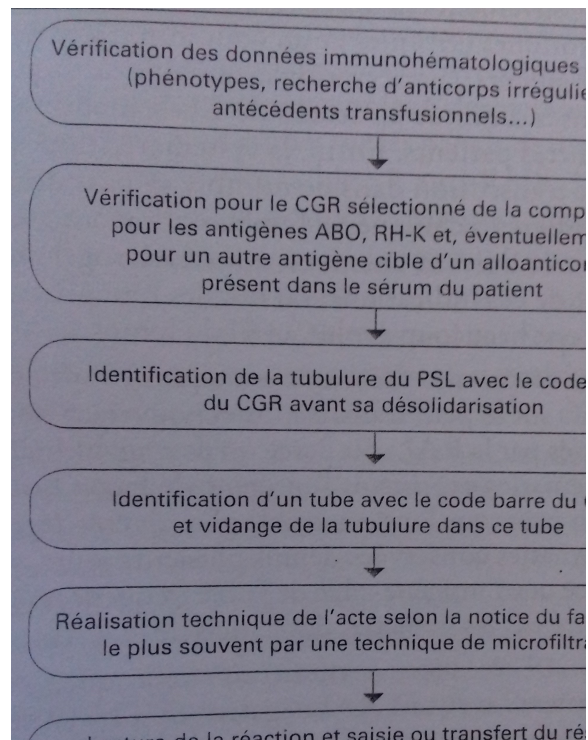
### 2. Principe :

Chez un patient porteur d'anticorps irréguliers anti-érythrocytaires, il est indispensable de sélectionner les unités de concentrés érythrocytaires qui vont lui être transfusées. Les hématies devront être dépourvues des antigènes contre lesquels les anticorps du receveur sont dirigés. L'épreuve de compatibilité est obligatoire chez ces patients.

- Avant la distribution, il faut effectuer une épreuve de compatibilité directe avec les hématies du donneur en présence du sérum pré-transfusionnel du receveur. Aucune réaction d'agglutination et/ou de lyse dans les techniques positives en R.A.I. ne doit être observée.
- Tout comme la RAI, l'EDCL est valable 3 jours (48). D'où la nécessité de définir clairement le moment où le patient sera transfusé.

### 3. Mode opératoire :

L'EDCL est certainement l'examen immunohématologique prétransfusionnel le plus long et le plus délicat. Il nécessite avant sa réalisation technique les étapes suivantes (49) :



**Figure 28 : Les grandes étapes de l'EDCL (50)**

-L'EDCL est réalisée à l'aide d'une technique similaire à celle de la RAI, soit à *minima* par un TIA à l'antiglobuline polyvalente ou anti-IgG.

- La méthode utilisée est le plus souvent identique à celle de la RAI mais ce n'est pas une obligation réglementaire.

-Actuellement, cette analyse est réalisée de façon très majoritaire en microfiltration, mais elle peut l'être par d'autres méthodes de sensibilité équivalente en microplaque. Les modalités techniques précises de réalisation de l'analyse sont donc similaires à celles de la RAI (50).

❖ Les modalités techniques :

➤ Technique de microfiltration :

| ScanGel*   | DG Gel*  | IDGel*   | Ortho              |
|--|--|--|--------------------|
| 10 µL de culot globulaire dans 1 mL de ScanLiss (suspension à 1 %) | 10 µL de culot globulaire dans 1 mL de DG Gel Sol (suspension à 1 %)   | 11 µL de culot globulaire dans 1 mL d'ID-Diluent 2               | Préparation saline |
| 50 µL de la suspension à 1 % dans un microtube de la carte         | 50 µL de la suspension à 1 % dans un microtube de la carte             | 50 µL de la suspension à 1 % dans un microtube de la carte       | Mélange            |
| Ajouter 25 µL de sérum ou plasma du patient                        | Ajouter 25 µL de sérum ou plasma du patient                            | Ajouter 25 µL de sérum ou plasma du patient                      | Ajouter            |
| Incuber 15 minutes à +37 °C  | Incuber 15 minutes à +37 °C  | Incuber 15 minutes à +37 °C                                      | Incuber à +3       |
| Centrifugation dans une centrifugeuse de ScanGel (10 minutes)      | Centrifugation dans une centrifugeuse DG Spin ou Dianafuge (9 minutes) | Centrifugation dans une centrifugeuse ID Centrifuge (10 minutes) | Centrifugation Sys |

**Figure 29:** Modalités techniques de réalisation de l'ECDL en microfiltration (50)

Test Indirect à l'antiglobuline

➤ Technique par simple mélange en tube :

Dans ce cadre il existe plusieurs techniques comme le montre le tableau ci-dessous, et dont la plus fréquemment utilisée est celle du du cross matching ayant recours à l'antiglobuline humaine (AHG).

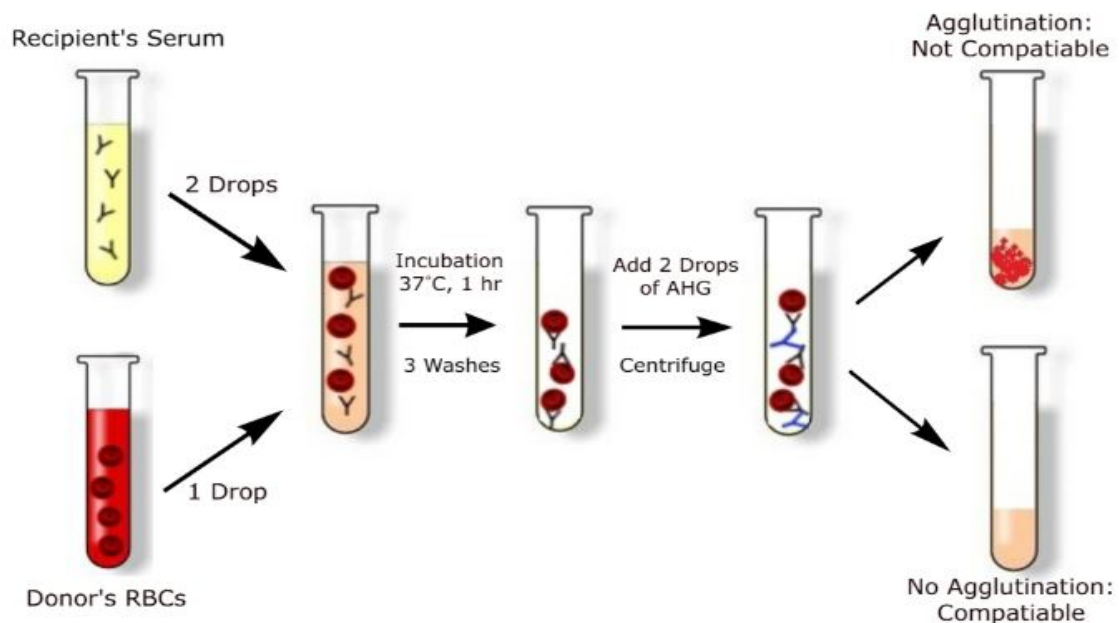
| Method of Cross Match                 | Detects Antibody of Type : |
|---------------------------------------|----------------------------|
| Saline Cross Match                    | IgM                        |
| Albumin Cross Match                   | IgG                        |
| Anti-Human Globulin (AHG) Cross Match | IgG                        |

**Figure 30 :** Modalités techniques de réalisation de l'ECDL en tube

▪ A titre d'exemple : Procédure de réalisation d'un Cross matching en tube utilisant l'AHG (51):

- 1- Préparation des échantillons sanguins du donneur et du receveur : (GR du donneur et serum/ plasma du receveur)
- 2- Préparation de 3-5% de suspension cellulaire saline de GR
- 3- Tube à hémolyse pour test
- 4- Dans le tube, on rajoute 2 gouttes du serum du receveur et une goutte de la suspension de GR du donneur
- 5- On mélange et on laisse incuber pendant 1H à 37°C
- 6- Décanter le mélange complètement et laver les cellules 3 fois par la suspension saline
- 7- On rajoute 2 gouttes de l'antiglobuline humaine (AGH) puis on mélange. On laisse la préparation à température ambiante pendant 5min
- 8- Centrifuger à 1500 rpm durant 1 min
- 9- On observe l'apparition ou non d'agglutination
- 10- Si pas d'agglutination observée macroscopiquement, on transfère un petit échantillon sur une lame et on examine microscopiquement à la recherche d'une agglutination.

**N.B :** La présence de rouleaux n'est pas une indication d'incompatibilité.



**Figure 31:** Cross matching en tube utilisant l'AHG

#### 4. Interprétation (52):

- 1- **En absence de réaction d'agglutination** le résultat de l'ECDL est négatif et l'unité de CGR est déclarée compatible avec le sérum ou le plasma du patient.
  - On parle de **compatibilité** entre sang du donneur et receveur lorsqu'on n'a pas d'agglutination ni dans le cross matching majeur ni dans le mineur.
- 2- **En présence de réaction d'agglutination** le résultat de l'ECDL est positif et l'unité de CGR est déclarée incompatible avec le sérum ou le plasma du patient.
  - Un sang où on observe une **incompatibilité** dans le cross matching majeur ne doit jamais être transfusé, car le grand volume du plasma du receveur contenant les anticorps est capable de détruire facilement les GR du donneur.

- Une **incompatibilité** dans un cross matching mineur est moins importante, car le plasma du donneur contenant les anticorps est dilué dans le propre plasma du receveur ce qui rend les anticorps dilués et ineffectives.

## 5. Indications :

- Cette épreuve est recommandée chez les patients polytransfusés ne possédant pas d'anticorps irréguliers anti-érythrocytaires. Elle ne l'est plus chez la femme enceinte.
- Il n'est pratiqué, hors urgence, que chez les malades ayant, ou ayant eu, une recherche d'anticorps irréguliers positive.
- En France, une recherche d'anticorps irréguliers négative est considérée comme suffisante pour transfuser un patient.
- Pas de gain sécuritaire significatif lié à cette analyse lorsque la RAI prétransfusionnelle réalisée dans de bonnes conditions techniques est négative et ce même chez les polytransfusés ou le nouveau-né avec un TDA négatif (53).

## II. Les examens immuno-hématologiques non systématiques : Sur prescription spéciale : Sang phénotypé

### A. Phénotypage élargi à d'autres systèmes (Kell2 ; MNS; DUFFY ; KIDD ; LUTHERAN ; LEWIS) :

#### 1. Définition :

- Cette analyse consiste à rechercher un ou plusieurs antigènes érythrocytaires autres que ceux qui sont définis par le groupage ABO.RH1 et par le phénotypage RH-KEL 1.

➤ **Ag recherchés :**

En général, on se limite aux Ag des systèmes Duffy, Kidd et MNS, mais d'autres Ag peuvent aussi être recherchés (54).

- Rhésus Ag Cw (RH8),
- Kell Ag Cellano (Kell2) (k)
- Duffy Ag Fya (FY1), Fyb (FY2)
- Kidd Ag Jka (JK1), Jkb (JK2)
- MNS Ag M (MNS1), N (MNS2), S (MNS3), s (MNS4)
- Lewis Ag Lea (LE1), Leb (LE2)
- P Ag P1.

| Ancienne nomenclature | Nouvelle nomenclature | Antigènes (ou groupes) usuels  |
|-----------------------|-----------------------|--|
| Kidd                  | JK                    | JK1 (ex Jka)<br>JK2 (ex Jkb)   |
| MNSs                  | MNS                   | MNS1 (ex M)<br>MNS2 (ex N)<br>MNS3 (ex S)<br>MNS4 (ex s)                       |
| Lewis                 | LE                    | LE : 1, -2 (ex Lea+ b-)<br>LE : -1, 2 (ex Lea- b+)<br>LE : -1, -2 (ex Lea- b-) |
| Lutheran              | LU                    | LU : -1, 2 (ex Lua- b+)<br>LU : 1, 2 (ex Lua+ b+)<br>LU : 1, -2 (ex Lua+ b-)   |

**Figure 32 : Nomenclature et antigènes du phénotypage élargi**

❖ Le système Kell :

Le système Kell est un système polymorphe. Depuis sa découverte en 1946 (55) par Coombs et ses collègues Mourant et Race, 24 antigènes associés ont été répertoriés.

Les deux principaux antigènes : K (K1) et k (cellano, K2), ont été identifiés par des allo-anticorps d'origine immunitaire et sont portés par une glycoprotéine membranaire dont l'expression est restreinte à la lignée érythrocytaire.

Le système Kell est le système le plus immunogène après le système Rhésus, les anticorps dirigés contre ses antigènes sont toujours d'origine immune.

L'immunogénicité remarquable de l'antigène K vient après celle de l'antigène RH. Les antigènes K1 et K2 sont développés à la naissance ainsi que les antigènes K3 et K4, quant aux antigènes K6 et K7, ils sont développés dans les globules rouges du cordon.

En 1940, Levine, Baker - Wigod, et Ponder avaient décrit un anticorps immun dans le sérum de madame Cellano dénommé anti-cellano dont l'antigène correspondant est l'antigène k (k2).

❖ **Système FY (56) :**

L'antigène FY1 est l'antigène le plus immunogène. Les immunofœtocompatibilités sont peu fréquentes mais quand elles se produisent, elles peuvent en cas d'immunisation sévère, provoqué la mort in utéro.

## **2. Principe :**

a. **Principe du système Kell (Antigène Kell2) :**

Consiste à rechercher par deux personnes différentes, les Ag k à la surface des hématies par technique d'agglutination directe entre ces antigènes porté sur les hématies à tester et les sérum test spécifiques.

Lorsqu'il est utilisé selon la technique recommandée, le réactif provoque l'agglutination (amas) des hématies portant l'antigène K (cellano). La non-agglutination démontre l'absence de l'antigène K (cellano) (57).

b. Principe du groupage dans les systèmes MNS; DUFFY ; KIDD ; LUTHERAN ; LEWIS :

❖ **La réalisation :**

Pour un système donné la recherche de chaque antigène est basée sur l'utilisation du réactif spécifique et du témoin adéquat.

❖ **La détermination :**

Sa définition est en fonction des conditions techniques :

Si les opérations du phénotypage élargi, incluant les modalités d'enregistrement et de vérification des échantillons et prescriptions, sont strictement réalisés dans des conditions d'automatisation et informatisation, une détermination repose sur une seule réalisation exécutée à l'aide d'un lot de réactif et un technicien.

Dans les autres cas, une réalisation repose sur deux réalisations exécutées par deux techniciens différents. La saisie manuelle des résultats doit aussi passer par une double saisie effectuée par deux personnes différentes.

L'un de ces échantillons doit être négatif et l'autre d'expression «hétérozygote».

❖ **La validation :**

La validation d'un phénotypage élargi est réalisée sur deux prélèvements différents à raison d'une détermination par prélèvement.

3. Mode opératoire et réactifs à utiliser :

a. Pour le système Kell (Antigène Kell2) :

❖ **Réactif :**

Sous forme de sérum-test anti-Kell agglutinant monoclonal

Réactif supplémentaire nécessaire: ID-Diluent 1 : solution de broméline modifiée pour suspensions d'hématies.



**Figure33:** Serum-test anti-k

❖ **Mode opératoire :**

- Technique carte gel :

Préparation de l'échantillon de sang

Préparer une suspension d'hématies à 5% en ID-Diluent 1 comme suit :

Ramener le diluant à température ambiante avant utilisation.

- a. Distribuer 0.5 ml d'ID-Diluent 1 dans un tube propre.
- b. Ajouter 50  $\mu$ l de sang total ou 25  $\mu$ l de culot d'hématies, mélanger doucement.
- c. Incuber 10 minutes à température ambiante (18-25 °C).

La suspension d'hématies est à utiliser dans les 15 minutes qui suivent l'incubation.

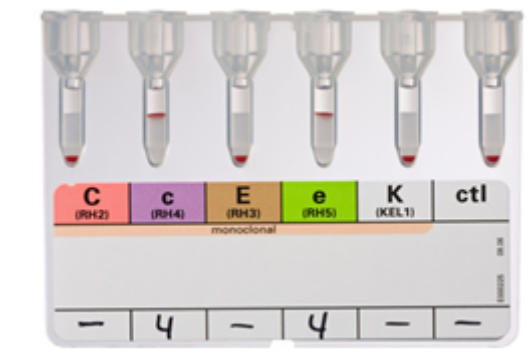
❖ **CONTROLES :**

Des échantillons positifs et négatifs connus devront être inclus en concordance avec les réglementations régissant l'assurance qualité.

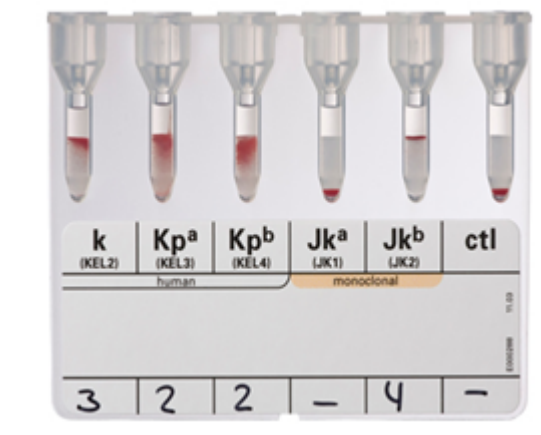
❖ **MÉTHODE (58) :**

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 face interne de la languette d'aluminium.

1. Identifier la carte-ID avec le numéro d'enregistrement unique du patient ou donneur/toutes identifications pertinentes.
2. Décoller la languette d'aluminium des microtubes nécessaires en tenant la carte-ID en position verticale.
3. Distribuer 10  $\mu$ l ou 12,5  $\mu$ l de la suspension d'hématies du patient dans le microtube concerné.
4. Centrifuger la carte-ID 10 minutes dans l'ID-Centrifuge.
5. Lire et noter les réactions.



**Figure34:** Carte gel phénotype RH + Kell 1



**Figure 35:** Recherche des antigènes K2; K3; K4 sur Carte Gel

**b. Pour les systèmes MNS; DUFFY ; KIDD ; LUTHERAN ; LEWIS :**

Le phénotypage élargi est réalisé quasi-exclusivement par la **méthode d'hémagglutination**. La réalisation d'un phénotype élargi consiste à tester les hématies du patient, préalablement mises en suspension appropriée, vis-à-vis du réactif approprié et du réactif témoin.

Mis à part les antigènes les plus souvent étudiés que sont FY1 et 2, JK1 et 2, MNS3 et 4, la méthode de phénotypage est en général **manuelle** (59).

Les **méthodes manuelles** sont classiques. Soit l'anticorps a pu faire objet d'une synthèse monoclonale, de classe IgM et, dans ces conditions, est utilisable en **technique saline** (par exemple, anti-JK1/-JK2), soit on ne dispose que de réactifs polyclonaux marqués CE ou monoclonaux de type IgG (FY1, FY2) qui nécessitent la mise en œuvre d'un **test indirect à L'antiglobuline (TIA)**.

Les réactifs disponibles sur automate sont utilisables, soit en **microplaque (immunoadhérence)**, soit en **support filtration** avec, dans ce cas, soit une distribution du réactif par l'automate, soit un réactif déjà incorporé dans le support réactionnel.

Toutes les hématies-tests sont d'origine humaine, dans une solution tamponnée en suspension à 0.8%.



Figure 36: réactifs anti-FY1 et anti-FY2



Figure 37: réactif anti-JK1



Figure 38 : réactif anti-JK2



Figure 39 : réactif anti-MNS 3



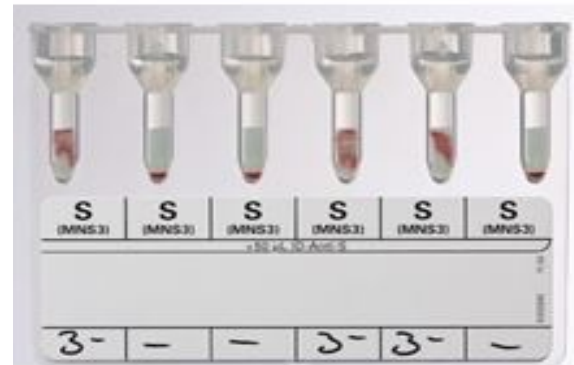
Figure 40 : réactif anti-MNS4



Figure 41 : réactif anti-LE1



Figure 42 : réactif anti-LU1



**Figure 43 :** Carte-Gel pour phénotypage Kidd **Figure 44 :** Carte-Gel pour phénotypage MNS

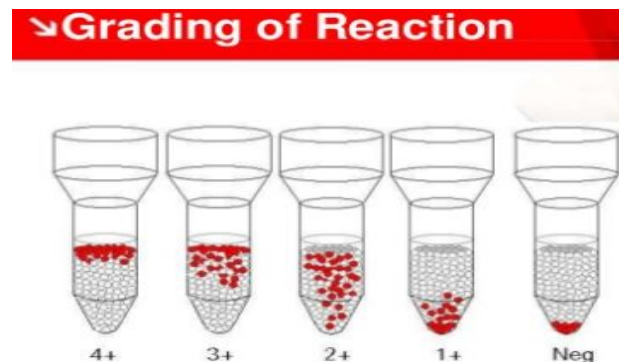


**Figure 45 :** Carte-Gel pour phénotypage Lutheran

#### 4. Interprétation :

- ✓ 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.

- ✓ La présence d'agglutination indique que l'échantillon testé possède l'antigène correspondant.
- ✓ L'absence d'agglutination avec le réactif constitue un résultat négatif et indique que l'échantillon testé est dépourvu de l'antigène correspondant.



**Figure 46** : Gradient de réaction d'agglutination

## 5. Indications :

- Chez tout sujet présentant une allo-immunisation post-transfusionnelle, dans le but de prévenir la production de nouveaux anticorps qui rendraient difficiles la sélection de culots globulaires compatibles lors de transfusions ultérieures,
- chez la femme jeune avec antécédent d'immunisation fœto-maternelle,
- dans les hémopathies chroniques (thalassémie, drépanocytose, anémies réfractaires) ou malignes. Il est important de déterminer le phénotype étendu de ces sujets dès le diagnostic et avant les premières transfusions, car les transfusions répétées ultérieures vont gêner le phénotypage.
- La recherche de l'antigène cellano, elle est réalisée à la demande, chez les patients porteurs d'un anticorps dirigé contre un antigène de groupe sanguin autre que RH1 à 5 et KEL1 ; par exemple chez une femme enceinte avec kell1 négative afin d'éliminer un

risque d'allo-immunisation érythrocytaires anti-Kell qui est une affection rare. Bien que son incidence soit la plus importante après celle de l'anti-D, elle reste sporadique.

## **B. Test direct à l'antiglobuline (TDA) : Test de coombs direct :**

### **1. Définition :**

Le test direct à l'antiglobuline permet la mise en évidence de la sensibilisation *in vivo* des hématies humaines par des anticorps de nature IgG et/ou des fractions de compléments. Ce test doit être réalisé de préférence sur un échantillon anticoagulé.

### **2. Principe :**

- La présence d'Ac irréguliers est recherchée sur des hématies déjà sensibilisées par des Ac présents dans le sérum d'un patient :
  - par agglutination active indirecte (artificielle) utilisant des anti-globulines humaines (AGH) monospécifiques (détectant les IgG et la fraction C3 du complément (60).
    - ✓ *1ère étape* : lavages des hématies sensibilisées en solutions salines (élimination des Ig non spécifiquement fixés à l'Ag érythrocytaire).
    - ✓ *2ème étape* : agglutination des GR sensibilisés par des AGH.

☞ Importance des lavages : la réaction de Coombs n'est spécifique que si les GR sont débarrassés de toutes traces d'Ig non fixées spécifiquement sur l'Ag.

#### À savoir

- Cette technique permet de révéler la présence :

- d'agglutinines irrégulières (AI) d'origine maternelle sur les GR fœtaux (MHNN)
- d'auto-Ac sur les GR d'un patient atteint d'anémie hémolytique auto-immune

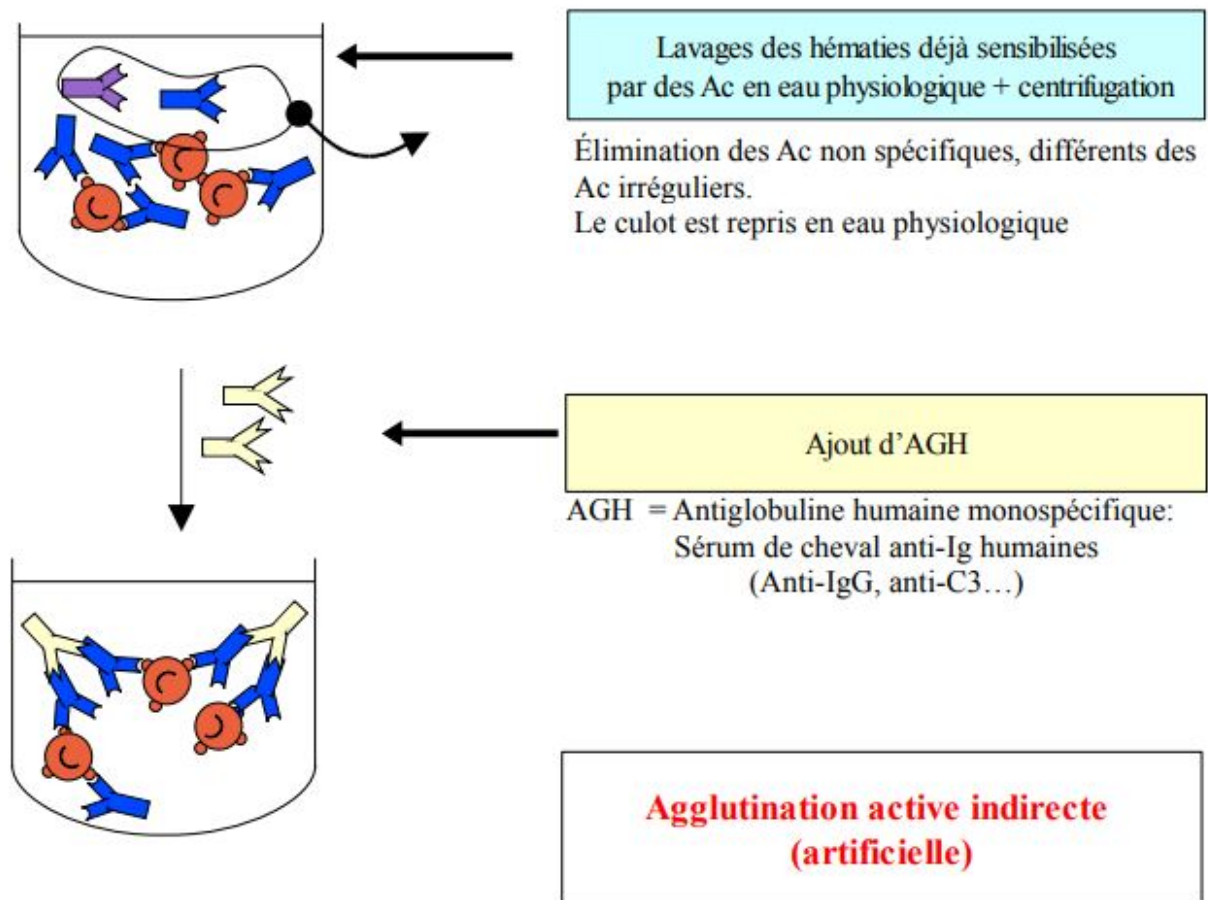


Figure 47 : Schéma immunologique des étapes de déroulement du test direct à l'antiglobuline

(TDA) (61)

### 3. Mode opératoire et réactifs à utiliser :

❖ **Technique :**

- Le sang à examiner peut être:

✓ du sang du cordon ou du nouveau né, recueilli sur anticoagulant, déposé au froid

et porté au laboratoire immédiatement après le prélèvement

✓ du sang d'un patient possédant des allo-Ac (cas d'une transfusion incompatible) ou des auto-Ac (cas d'une maladie auto-immune provoquant une anémie hémolytique=AHA).

- GR du patient sont mis en suspension saline à 50 %.

❖ **Réactifs :**

Sérum anti-globuline humaine (AGH) : sérum polyspécifique ou monospécifique.

Contrôles de qualité :

- CQI (+) : hématies O Rh+ (50 % en eau physiologique)

- CQI (-) : hématies O Rh -

- sérum anti-D salins (ne contenant que des IgG anti-D)



**Figure 48 : Réactif anti-globuline humaine (AGH)**

❖ **Mode opératoire :**

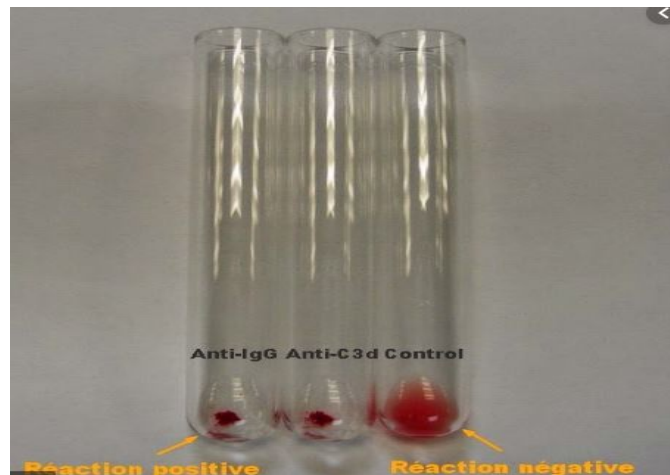
-Les laboratoires d'immuno-hématologie possèdent principalement deux techniques (en technique saline et par filtration) afin de mettre en évidence la sensibilisation des globules rouges par les anticorps.

-Ces deux techniques ont des limites de détection différentes.

➤ **Technique saline : (En tubes)**

- 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.

- Voici l'image que peuvent donner les résultats en tubes :



**Figure 40** : TDA réalisé par une technique saline (en tubes) montrant une réaction positive (agglutination) et une négative. (62)

| Agglutination des GR sensibilisés et lavés par l'AGH   | Technique en tubes (dans 4 nouveaux tubes identifiés) |          |            |          |          |
|--|---|----------|------------|----------|----------|
|  |   | Réaction | T contrôle | CQI (+)  | CQI (-)  |
|  | Suspensions à 5 %                                     | 1 goutte | 1 goutte   | 1 goutte | 1 goutte |
|  | AGH   | 1 goutte | -          | 1 goutte | 1 goutte |
|  | Eau Ψ   | -        | 1 goutte   | -        | -        |
| <i>Agiter pour mélanger<br/>Laisser reposer 5 min sur la paillasse et observer la présence éventuelle d'agglutination.</i> |   |          |            |          |          |

**Figure 49** : Mode opératoire de réalisation de TDA par technique en tubes (63)

➤ **Technique par filtration :**

Cette technique est à l'heure actuelle la plus répandue, autant en technique manuelle, que par les appareils automatisés.

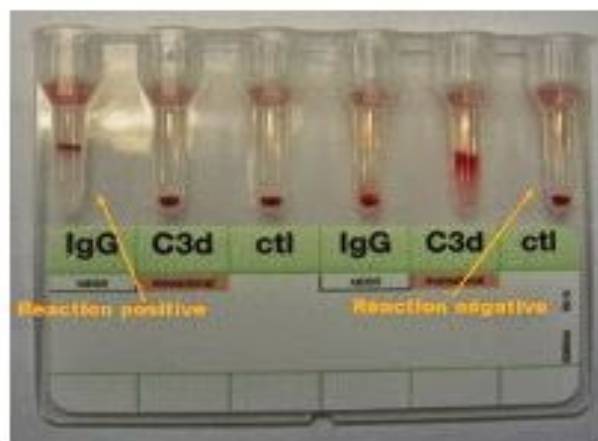
Cette technique nécessite l'utilisation d'une cassette constituée d'une micro-cupule surmontant une colonne de filtration. Cette colonne de filtration contient des micro-billes ou du gel et de l'antiglobuline (soit IgG, soit C3d).

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.

Voici l'image que peuvent donner les résultats en filtration :



**Figure 50 :** TDA réalisé par technique de filtration ayant recours à une carte-gel

➤ **Autres techniques :**

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

| Agglutination des GR sensibilisés et lavés par l'AGH   | Technique en plaque |          |            |          |          |
|--|---------------------|----------|------------|----------|----------|
|  |                     | Réaction | T contrôle | CQI (+)  | CQI (-)  |
|  | Suspensions à 20 %  | 1 goutte | 1 goutte   | 1 goutte | 1 goutte |
|  | AGH                 | 1 goutte | -          | 1 goutte | 1 goutte |
|  | Eau Ψ               | -        | 1 goutte   | -        | -        |
| <i>Mélanger à l'aide d'un agitateur<br/>Laisser reposer 5 min sur la paillasse et observer la présence éventuelle d'agglutination.</i> |                     |          |            |          |          |

**Figure 51:** Mode opératoire de réalisation du TDA par technique en plaque (63)

#### 4. Interprétation :

##### ➤ **Contrôles de qualité internes et témoin :**

– **CQI (+)** : la présence d'une agglutination vérifie :

\* la présence de la présence de GR sensibilisés par des Ac est bien repérée par un agglutinat

\* les différents temps de la réaction (lavage et action de l'AGH) se déroulent parfaitement

\* la bonne qualité de l'AGH.

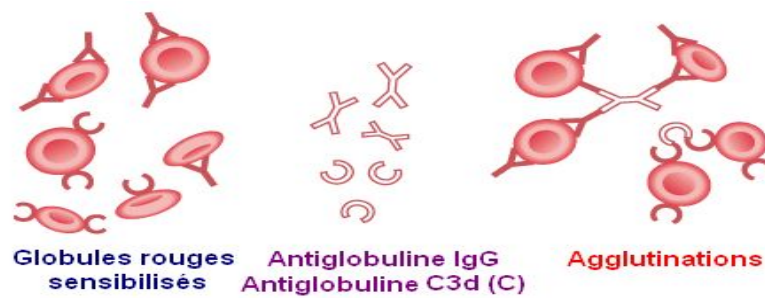
– **CQI (-)** : l'absence d'agglutination vérifie la spécificité de la réaction et élimine les faux positifs dues à l'AGH. Les Ac en absence d'Ag ne conduisent pas à une agglutination.

– Témoin contrôle : l'absence d'agglutination vérifie la spécificité de la réaction. Les GR sensibilisés ne doivent pas agglutiner en absence d'AGH.

##### ➤ **Lecture des réactions :**

Si les témoins sont corrects :

• Une agglutination signifie que les GR sont recouverts par un Ac que le contexte biologique identifiera.



**Figure 52 :** Réaction d'agglutination en présence d'antiglobuline humaine (AGH)

### 5. Indications (64):

- Dans le cadre d'un contexte hémolytique clinique ou biologique pour démontrer l'origine immunologique de cette hémolyse
- Dans le cadre de la mise en évidence d'auto-anticorps lors de la RAI afin de détecter leur capacité à se fixer in vivo
- Dans le cadre de maladie hémolytique du nouveau-né pour démontrer la sensibilisation des hématies du nouveau-né par les allo-anticorps de nature IgG d'origine maternelle
- Dans le cadre d'une réaction transfusionnelle pour démontrer l'origine immuno-hémolytique de l'incident
- Dans le cadre d'une anémie hémolytique auto-immune pour démontrer la sensibilisation des hématies du patient par les auto-anticorps et/ou par du complément
- Dans le cadre d'une anémie hémolytique d'origine médicamenteuse pour démontrer la sensibilisation des hématies par des anticorps reconnaissant certains médicaments
- Dans le cadre d'exploration biologique d'autres maladies auto-immunes.

## C. Test indirect à l'antiglobuline (TIA) : Test de coombs indirect

### 1. Définition :

Le test indirect à l'antiglobuline (en France T.I.A).

Anciennement appelé « réaction de Coombs indirecte », -R.C.I., en Belgique Coombs indirect) qui permet de mettre en évidence un anticorps irrégulier non agglutinant dans un sérum ou un antigène de groupe sanguin sur des érythrocytes.

## 2. Principe :

- ✓ La présence d'Ac irréguliers est recherchée dans le sérum d'un patient :
  - par agglutination active indirecte (artificielle) utilisant des anti-globulines humaines (AGH)
  - à l'aide d'un panel d'hématies phénotypées.
- ✓ Le sérum à l'antiglobuline sert à détecter les globules rouges sensibilisés par un anticorps ou par du complément ou les deux à la fois. Ce test permet donc de mettre en évidence des anticorps fixés in vivo ou in vitro sur les hématies portant l'antigène correspondant, mais incapables d'agglutiner ces hématies en milieu salin.
- ✓ L'antiglobuline humaine favorise la formation de ponts entre les globulines IgG fixées aux globules rouges in vivo ou in vitro, permettant ainsi de visualiser la présence d'anticorps par une réaction d'agglutination (65).
- ✓ Le test indirect est utilisé pour l'épreuve de compatibilité, pour la recherche et l'identification des anticorps, pour la recherche du D faible et pour le phénotypage des hématies.
  - 🚦 *1ère étape* : les GR sont sensibilisés par les AI éventuels présents dans le sérum du patient
  - 🚦 *2ème étape* : lavages → élimination des Ig non spécifiquement fixés à l'Ag érythrocytaire.
  - 🚦 *3ème étape* : agglutination des GR sensibilisés par des AGH.

↳ Importance des lavages: la réaction de Coombs n'est spécifique que si les GR sont débarrassés de toutes traces d'Ig non fixées spécifiquement sur l'Ag.

Remarque (66):

+ Variantes :

-Coombs à basse force ionique (BFI). Augmentation de la fixation des Ac sur les Ag et diminution du temps de sensibilisation.

-Coombs sur hématies trypsinées. Augmentation de l'accessibilité des Ag.

+ Inconvénient :

-Certains Ac irréguliers ne sont pas détectés par cette technique

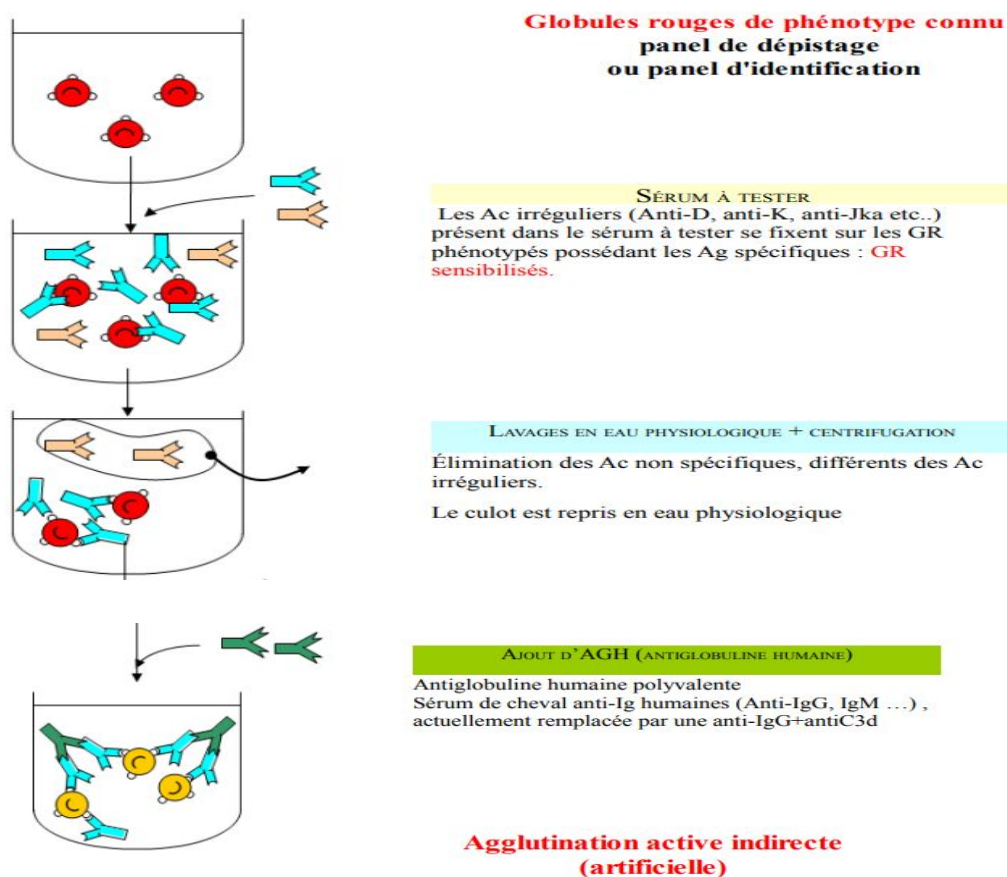


Figure 53 : Schéma immunologique des étapes de déroulement du test indirect à l'antiglobuline (TIA) (67)

### 3. Mode opératoire et réactifs à utiliser :

❖ Réactifs :

#### Hématies phénotypées de groupe O

- **panel de dépistage** : 3 séries d'hématies dont l'éventail des Ag couvre l'ensemble des AI recherchés : *dépistage des AI*.

Ou

- **panel d'identification**: 10 séries d'hématies : *identification des AI* (si le dépistage est +).

#### Sérum anti-globuline humaine (AGH) : anti-IgG + anti-C3d

Contrôle de qualité interne (CQI) :

- CQI + : hématies [O, Rh+] (5 % en tampon à basse force ionique)
- CQI - : hématies [O, Rh -] (5 % en tampon à basse force ionique).

#### Sérum anti-D salin (ne contenant que des IgG anti-D en milieu salin NaCl)

#### Hématies phénotypées

- **panel de dépistage** : 3 séries d'hématies dont l'éventail des Ag couvre l'ensemble des AI recherchés : *dépistage des AI*.

Ou

- **panel d'identification**: 10 séries d'hématies : *identification des AI* (si le dépistage est positif).



**Figure 54** : Sérum anti-globuline humaine (AGH)



**Figure 55** : Sérum anti-D

- ❖ **Mode opératoire :**
- **Technique saline en tube**
- **Technique de filtration sur Carte-Gel**
- **Technique en plaque**

| Dans des tubes à hémolyse,<br>verser : |  | Réactions                    |                               |                              | CQI                |                    |
|--|--|------------------------------|-------------------------------|------------------------------|--------------------|--------------------|
|  |  | GR- liste I                  | GR- liste II                  | GR -liste n .....            | CQI (+)            | CQI (-)            |
| Sensibilisation des GR.                | Sérum à tester   | 50 µL                        | 50 µL                         | 50 µL                        | -                  | -                  |
|  | Sérum anti-D   | -                            | -                             | -                            | 50 µL              | 50 µL              |
|  | GR phénotypés  | 1 goutte<br>de GR du liste I | 1 goutte<br>de GR du liste II | 1 goutte<br>de GR du liste n | -                  | -                  |
|  | GR témoins   |                              |                               |                              | 1 goutte [O, Rh +] | 1 goutte [O, Rh -] |
| <i>Incuber 15 min à 37°C</i>           |  |                              |                               |                              |                    |                    |
| Lavages                                | Eau physiologique  | 4 mL                         | 4 mL                          | 4 mL                         | 4 mL               | 4 mL               |
|  | <i>- Centrifuger 3 min à 800 g (1500 ou 2000 tours/min)<br/>                     - Aspirer le surnageant et retourner le tube sur un papier filtre pour égoutter le culot.<br/>                     - Décoller ensuite le culot en grattant le tube sur le portoir<br/>                     - Refaire ainsi 2 autres lavages dans 4 mL d'eau physiologique</i> |                              |                               |                              |                    |                    |

| Agglutination par l'AGH des GR sensibilisés   | Technique en plaque  |          |          |          |          |          |
|---|--|----------|----------|----------|----------|----------|
|   | Dans les tubes, remettre <u>chaque culot en suspension dans 1 goutte d'eau physiologique</u> , puis dans les alvéoles d'une plaque jetable mélanger: |          |          |          |          |          |
|   | Suspension de GR sensibilisés et lavés   | 1 goutte | 1 goutte | 1 goutte | 1 goutte | 1 goutte |
|   | AGH  | 1 goutte | 1 goutte | 1 goutte | 1 goutte | 1 goutte |
|   | Mélanger et observer la présence éventuelle d'une agglutination  |          |          |          |          |          |
|   | Technique en tubes   |          |          |          |          |          |
| Dans les tubes, remettre <u>chaque culot en suspension dans 0.5 mL d'eau physiologique</u> , puis ajouter:                              |  |          |          |          |          |          |
| AGH   | 1 goutte   | 1 goutte | 1 goutte | 1 goutte | 1 goutte |          |
| Homogénéiser puis centrifuger 1 min à 1500-2000 tours/min<br>Remettre en suspension et observer la présence éventuelle d'agglutination. |  |          |          |          |          |          |

Figure 56: Mode opératoire de réalisation du TIA par technique en tube et en plaque (68)

#### 4. Interprétation :

➤ **Contrôles de qualité interne :**

- **CQI (+)** : la présence d'une agglutination vérifie que :

\* la présence de l'Ag et l'Ac spécifique est bien repérée par un agglutinat

\* les différents temps de la réaction (sensibilisation, lavage et action de l'AGH) se

déroulent parfaitement

\* la bonne qualité de l'AGH.

– **CQI (-)** : l'absence d'agglutination vérifie la spécificité de la réaction et élimine les faux positifs dues à l'AGH. En absence d'Ag, les Ac ne conduisent pas à une agglutination.

➤ **Lecture des réactions :**

– Une agglutination révèle la présence de l'Ac correspondant à l'un des Ag présents sur les hématies testées.

– **Avec le panel de dépistage**, l'absence de toute agglutination signifie l'absence d'AI.

Dans le cas contraire, la présence d'une ou plusieurs agglutinations permet d'affirmer la présence d'AI qu'il faut identifier avec le panel d'hématies d'identification.

En cas de AI présents, la comparaison obtenus avec les hématies de dépistage permet déjà de donner une orientation de diagnostic.

– **La lecture du panel de d'identification** permet d'identifier le ou les AI probable(s) ou *Attention : l'interprétation doit aussi tenir compte du phénotype du patient. (Ex : un sujet D-, C+, c-, E+, e- ne peut pas posséder des anti-C).*

– L'AI identifiée est ensuite titrée. Le sérum est alors conservé par congélation en vue de titrage ultérieurs.

## **5. Indications :**

Le TIA est utile dans :

➤ **Mise en évidence d'antigènes** (69)

– La détermination de certains phénotypes érythrocytaires.

➤ **Mise en évidence d'anticorps** (65)

- La recherche des agglutinines irrégulières (RAI) présentes dans le sérum en plaque, en filtration ou en tube.
- L'épreuve de compatibilité (Cross matching).
- ***Autres applications***
- Depuis ce test s'est généralisé, il permet de mettre en évidence une immunoglobuline humaine dans tout liquide ou fixée spécifiquement sur tout support.

### III. AUTOMATE IH500 :

L'automate IH-500 associe fonctionnalité et design pour répondre aux besoins des laboratoires d'immunohématologie en constante évolution.

Conçu comme un automate compact de paillasse adaptable à n'importe quel environnement de laboratoire, le système IH-500 requiert un encombrement minimal tout en offrant un flux de travail de très haut niveau.



**Figure 57 : Automate IH 500 (70)**

#### A. Les caractéristiques techniques :

✓ Dimensions

|         |        |
|---------|--------|
| Largeur | 115 cm |
| Hauteur | 98 cm  |

|                                    |        |
|------------------------------------|--------|
| Profondeur                         | 85 cm  |
| Poids                              | 213 kg |
| Profondeur minimale d'installation | 60 cm  |
| ✓ <u>Capacité</u>                  |        |
| Échantillons                       | 50     |
| Cartes-ID                          | 170    |
| Flacons de réactifs                | 34     |
| ID-Diluents                        | 4      |

**B. Les fonctions principales :**

- ✓ Walk-away (autonomie complète)
- ✓ Chargement en continu
- ✓ Écran tactile ergonomique
- ✓ Automate compact de paillasse
- ✓ Surveillance active des QC\*
- ✓ Gestion des déchets
- ✓ Accès continu
- ✓ Prise en charge immédiate des urgences (STAT)
- ✓ Stabilité des réactifs embarqués : 7 jours
- ✓ Meuble support (en option)
- ✓ Traitement microtube par microtube
- ✓ Système d'identification intelligent
- ✓ Une seule connexion au SIL par le biais d'IH-Com
- ✓ Conformité CE selon la directive IVD 98/79/CE.



**Figure 58** : Image illustrant le design interne de l'automate IH500



**Figure 59** : Image illustrant le design interne de l'automate IH500

✓ Innovation

- Robot industriel à 6 axes
- Technologie de transport sans maintenance



**Figure 60** : Robot industriel à 6 axes



**Figure 61** : Perçage des racks ID-Diluent

Meilleure traçabilité

- Stockage interne jusqu'à 170 cartes-ID
- Suivi de chaque carte-ID pour plus de flexibilité lors du chargement des cartes-ID
- 100 % de traçabilité



**Figure 62** : Stockage interne des cartes-ID

✓ Chargement en continu

- Chargement en continu des échantillons et des flacons de réactifs
- Zones de chargement et de pipetage indépendantes



**Figure63** : Tiroir pour un chargement flexible

✓ Flexibilité

- Meuble support (en option) avec configuration personnalisable
- Station de chargement multifonctions flexible



**Figure 64** : Plateau pour les flacons de réactifs

✓ Réduction du temps d'intervention

- Processus de travail automatisé
- Système de gestion automatique des déchets



**Figure 65 :** Poubelle interne pour les déchets solides

- ✓ Sécurité & fiabilité
  - Système d'identification intelligent
  - Traitement microtube par microtube réduisant la consommation des cartes-ID
- ✓ Facilité d'utilisation
  - Clavier intégré pour faciliter la saisie des données
  - PC intégré et écran tactile 19



**Figure 66 :** Clavier pour la saisie manuelle des données

- ✓ Disponibilité 24h/24, 7 jours/7
  - Voyant d'état lumineux à 4 couleurs
  - Plus de 200 tests disponibles



**Figure 67** : Voyant d'état lumineux à 4 couleurs

- ✓ Optimisation de la cadence
  - Résultats plus rapides
  - Programmation optimisée des échantillons urgents (STAT)
  - Actualisation des priorités dans l'instrument
  - Gestion flexible des cartes-ID pour une cadence optimisée
  
- ✓ Temps de formation & de maintenance réduit
  - Interface utilisateur Bio-Rad standardisée facile à apprendre
  - Aucune maintenance quotidienne (uniquement hebdomadaire)
  - Gestion du liquide système (2 x 2 l) et des déchets liquides (2 x 2 l) sans interruption
  - Possibilité de connexion directe au drainage de laboratoire en option



**Figure 68** : Zone pour les liquides

- ✓ Walk-away (autonomie complète)
  - Capacité de chargement de 50 échantillons
  - Stockage interne de 34 flacons de réactifs liquides
  - Gestion simultanée de 4 racks ID-Diluent

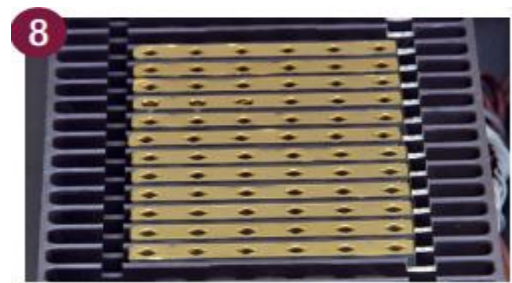


**Figure 69** : Support de transport des cartes-ID

- ✓ Stabilité des réactifs embarqués : 7 jours
  - Zone de stockage à température régulée
  - Technologie de thermostatisation des réactifs



**Figure 70** : Zone de stockage et pipetage des réactifs



**Figure 71** : Incubateur à 37°C

- ✓ Surveillance active des QC
  - Vérification automatique du statut QC des lots de réactifs lors du chargement\*
  - Gestion automatique des QC de l'instrument avant chaque traitement d'échantillon \*

*\*En développement*

### C. Les performances (71) :

| Tests  | Cadence           |
|--|-------------------|
| A, B, AB, D, CDE, ctl  | 60 échantillons/h |
| A, B, AB, D, CDE, ctl + A1, A2, B + C, c, E, e, K, ctl + RAI I, II, III        | 24 échantillons/h |
| A, B, DVI-, ctl/A1, B + RAI I, II, III   | 32 échantillons/h |
| A, B, DVI-, ctl/A1, B  | 48 échantillons/h |
| RAI I, II, III   | 82 échantillons/h |
| RAI I, II, III + Autocontrôle (AC)   | 42 échantillons/h |
| RAI avec hématies poolées  | 96 échantillons/h |
| A, B, DVI-, ctl/A1, B + RAI I, II  | 36 échantillons/h |
| A, B, DVI-, ctl/A1, B + C, c, E, e, K, ctl                                     | 48 échantillons/h |
| A, B, AB, DVI+, DVI-, ctl + A1, A2, B, O + C, c, E, e, K, ctl + RAI I, II, III | 24 échantillons/h |

\* Les performances peuvent varier en fonction des séquences de chargement et des profils d'échantillons demandés.

### D. Les méthodes d'analyses (71) :

- Groupage sanguin ABO/D
- Phénotypage Rh/K
- Recherche d'anticorps anti-érythrocytaires (RAI)
- Test direct à l'antiglobuline (TDA)
- Titrage des anticorps
- Épreuve sérique
- Tests de compatibilité
- Identification d'anticorps
- Phénotypage étendu.

## IV. Les perspectives du futur :

### A. Elution :

#### 1. Définition :

L'éluion est un procédé permettant de mettre en solution (dite éluee) un composé adsorbé à l'aide d'un solvant (ou un chélateur) nommé l'éluant.

Elle est utilisée en immuno-hématologie pour récupérer, dans un éluat, un anticorps fixé spécifiquement sur des hématies.

#### 2. Principe :

L'éluion consiste à décrocher les anticorps fixés sur les globules rouges in vivo même lorsque le test direct à l'antiglobuline (TDA) est négatif et les identifier par la suite (72).

#### **Méthodes :**

- Thermodynamiques (chaleur à 56°C, congélation-décongélation).
- Physico-chimiques (diminution du pH, solvants organiques).

#### Remarque (73):

- L'éluion à l'acide semble être plus efficace que l'éluion à la chaleur ou à la chloroquine pour détacher les immunoglobulines. Par contre, elle détruit les antigènes du système Kell à la surface des hématies.

- L'éluion à la chaleur est légèrement moins efficace pour détacher les immunoglobulines à la surface des hématies. Elle affaiblit plusieurs antigènes érythrocytaires et peut être associée à des hémolyses.

➤ L'éluotion peut être pratiquée directement à partir d'hématies sensibilisées *in vivo*. Dans ces conditions, on parle d'**éluotion directe** qui présente un examen important d'investigation de la positivité d'un test direct à l'antiglobuline (TDA) (74).

➤ L'éluotion peut être pratiquée après une sensibilisation *in vitro*. Dans ces conditions, on parle de **fixation-éluotion** ou d'**adsorption-éluotion** si l'éluat et l'adsorbat sont analysés en parallèle. Cette analyse peut être indiquée dans le cadre de la recherche d'un antigène ou d'un anticorps faible et comme outil d'isolement d'anticorps au sein d'un mélange.

### 3. Mode opératoire :

#### ❖ **Technique :**

- Les échantillons doivent être anticoagulés et utilisés dans un maximum de 3 jours après le prélèvement (75).

#### - **Lavage des hématies :**

Les lavages ont pour objectif d'éliminer les anticorps non spécifiquement fixés à la surface de l'hématie. Ils doivent être réalisés dans un tube propre différent du tube primaire.

En général, 4 à 6 lavages sont réalisés en solution saline et à température ambiante.

#### - **Transfert des hématies lavées dans un autre tube :**

La préparation de l'éluat sera réalisée après transfert dans un tube propre. Le risque est ici lié à la fixation des anticorps à la surface du tube. En effet, si l'éluat est préparé dans le tube primaire ou celui qui a été utilisé pour réaliser les lavages, des anticorps non spécifiquement fixés sur les GR peuvent être présent dans l'éluat.

Afin d'éviter une éluotion des anticorps à partir des parois du tube, il est recommandé de transférer les hématies du tube primaire vers un second tube pour le lavage et vers un troisième tube pour réaliser l'éluat.

**Elution proprement dite :**

-Cette phase consiste à mettre en présence les hématies avec le milieu dans lequel se fait l'élution.

-Lorsque l'élution est réalisée par des procédés thermiques, le milieu de récupération des anticorps utilisé habituellement est une solution saline. Cette mise en contact en suite suivie d'une incubation à + 56°C durant 20 min environ qui détruit les liaisons antigène-anticorps.

-En cas d'élution par l'acide, l'élution est réalisée dans un milieu acide qui rompt la liaison antigène-anticorps. Cette solution est ensuite tamponnée par une solution alcaline qui permet un retour à un PH compris entre 6,8 et 7,2 propice à la formation des complexes antigène-anticorps (76).

-Le volume de l'éluat est en général identique au volume du culot globulaire. Il peut être recommandé parfois, dans certaines conditions, notamment en cas de TDA faiblement positif ou négatif dans un contexte hémolytique de concentrer l'éluat.

**Elution à la chaleur +56°C (77) :**

❖ Nature de l'échantillon :

Un tube de 7 ml de sang prélevé sur EDTA. L'élution est réalisée dès que possible et au plus tard dans les 72 heures suivant le prélèvement.

❖ Matériels :

- ✓ Tube à hémolyse de 5ml
- ✓ Bain-marie à +56°C
- ✓ Centrifugeuse.

❖ Réactifs :

- ✓ Solution saline 0.15M à +4°C (+/- 2°C)
- ✓ Albumine bovine à 6%.

❖ Méthode :

- ✓ Laver 6 fois en solution saline 0.15 M 1 ml de culot d'hématies à +4°C
- ✓ Garder la dernière eau de lavage isovolume
- ✓ Dans un tube, déposer 1 ml de culot d'hématies lavées et 1 ml (0.5 ml si on souhaite concentrer l'anticorps) de solution saline 0.15M ou de solution d'albumine bovine à 6% (si on souhaite congeler l'éluat pour une étude ultérieure)
- ✓ Homogénéiser le mélange et incuber 10min à +56°C en agitant régulièrement le tube pendant la période d'incubation
- ✓ Centrifuger le tube pendant 3min à 900 à 1000g
- ✓ Transférer rapidement le surnageant dans un autre tube qui sera testé immédiatement ou congelé
- ✓ Tester le surnageant selon les méthodes habituelles du laboratoire.

**Elution par l'acide (Digitonine acide) (78) :**

❖ Nature de l'échantillon :

Un tube de 7ml de sang prélevé sur EDTA et traité dans les 72 heures suivant le prélèvement.

❖ Matériels :

- ✓ Tube à hémolyse
- ✓ Centrifugeuse (tubes et supports filtration)
- ✓ Incubateur à +37°C
- ✓ Parafilm
- ✓ Micropipette de précision.

❖ Réactifs :

Technique validée par le kit commercial « DiaCidel, Biorad »

- ✓ Solution de lavage concentrée : solution mère à diluer extemporanément en eau distillée au 1/10 et conserver à +4°C
- ✓ Solution d'éluion de digitonine acide prête à l'emploi conservée à +4°C
- ✓ Solution tampon prête à l'emploi conservée à +4°C
- ✓ Support de microfiltration
  - TIA = polyspécifique ou anti-IgG
  - Neutral pour réaction enzymatique
- ✓ Panels de dépistage et d'identification, voire de référence, en suspension adaptée à la technique
- ✓ Hématies-test A1-A2-B en suspension adaptée à la technique.
  
- ❖ Méthode :
  - 1.Lavage des hématies :
    - ✓ Laver 4 fois à +4°C en solution de lavage 1 ml de CG
    - ✓ Récupérer la dernière eau de lavage (DEL) «isovolume »
  
  - 2.Elution :
    - ✓ Dans le tube, déposer 1ML de culot lavé et 1 ml de solution acide
    - ✓ Renverser lentement le tube à 3 reprises en obturant l'ouverture avec un parafilm
    - ✓ Le centrifuger pendant 1 min à 900g
    - ✓ Récupérer immédiatement le surnageant dans un tube propre
    - ✓ Ajouter goutte à goutte de la solution tampon jusqu'au « virage au bleu »
    - ✓ Centrifuger pendant 1 min à 900g et récupérer le surnageant (éluat).
  
  - 3.Distribution de l'éluat et la DEL sur les supports de filtration :
    - ✓ Identifier les supports

- ✓ Répartir l'éluat et des hématies-test (Dépistage +/- identification ET A1, A2 et B) ;  
Les volumes sont ceux prévus par la notice. Pour le volume de l'éluat, il est celui prévu pour le sérum dans le cadre de la RAI
- ✓ Répartir la DEL dans les mêmes conditions que l'éluat
- ✓ Centrifuger les supports filtration avec une centrifugeuse préprogrammée
- ✓ Lecture

#### **4. Interprétation :**

L'analyse de l'éluat correspond à une RAI.

Dans certains cas, les panels de dépistage et d'identification doivent être complétés par d'autres hématies.

Ainsi, en contexte de réaction transfusionnelle ou à l'occasion d'une greffe ou d'une transplantation ABO incompatible mineure, l'utilisation des Ac A et B permettra le diagnostic d'un accident hémolytique par incompatibilité ABO.

Par ailleurs, la seule agglutination des hématies de l'unité transfusée permettra de suspecter fortement un Ac anti-privé.

En contexte de MHNN, si la RAI est négative, outre l'utilisation des hématies A et B, les hématies du père biologique peuvent s'avérer utiles pour confirmer l'implication d'un Ac dirigé contre un Ag privé transmis par le géniteur.

#### **5. Indications :**

L'éluat direct ne doit être envisagé que si elle est nécessaire au diagnostic.

- ✓ Dans le cadre d'anémies hémolytiques auto-immunes
- ✓ Dans un contexte de réaction transfusionnelle
- ✓ Au cours de la maladie hémolytique du nouveau-né (MHNN)

- ✓ Elle est parfois inutile même si le TDA est positif, notamment chez les patients sans ATCDS transfusionnel récent (3mois) ou sans signe d'hémolyse (79).
- ✓ Elle est parfois utile même si le TDA est négatif, notamment en cas de syndrome hémolytique ou en contexte transfusionnel quand une incompatibilité immunologique est fortement suspectée. Dans ce cas l'élution peut s'avérer positive par ses capacités de concentration d'anticorps.

## **B. Adsorption :**

### **1. Définition :**

L'adsorption est un phénomène chimique de surface, correspondant à une rétention à la surface d'un solide des molécules d'un gaz ou d'une substance en solution ou en suspension.

Un anticorps peut être éliminé d'un sérum ou d'un plasma par adsorption sur des hématies exprimant l'antigène cible. Après que l'anticorps se soit adsorbé sur l'antigène membranaire, le surnageant est décanté par centrifugation. Une recherche des anticorps anti-érythrocytaires (RAI) est ensuite réalisée sur l'adsorbat.

### **2. Principe :**

Les techniques d'adsorption en immunohématologie sont indispensables afin de s'assurer de l'absence d'un alloanticorps cliniquement dangereux dans le sérum ou dans le plasma d'un patient qui contient, par ailleurs, un auto- ou un alloanticorps agglutinant la très grande majorité, voire la totalité, des hématies du panel d'identification.

Le principe de base de la méthode consiste à réaliser l'adsorption sur un culot d'hématies lavées trois fois en solution saline en veillant à ce que la dernière centrifugation permette de bien concentrer les hématies (5mn à 800-1000g) afin de réduire le risque de dilution d'anticorps par chaque cycle d'adsorption (80).

Le surnageant, appelé aussi adsorbat, est décanté après une centrifugation intense dans un nouveau tube correctement identifié.

Plusieurs adsorptions peuvent être nécessaires pour se débarrasser complètement de l'anticorps à adsorber. Dans ce cas, le surnageant est mis successivement en contact avec un nouveau volume du culot d'hématies concerné.

### **3. Mode opératoire et réactifs :**

#### **❖ Techniques d'adsorption :**

- En présence d'un anticorps dans le sérum d'un patient, deux techniques d'adsorption sont possibles : **L'autoadsorption et l'alloadsorption.**
- Théoriquement, **l'autoadsorption** est la technique la plus sécuritaire pour éliminer un Ac, puisqu'elle permet de ne pas adsorber un alloanticorps dirigé contre un Ag de grande fréquence et donc exprimé par l'ensemble ou presque des hématies du panel. Elle est réalisée dans les circonstances suivantes :
  - ✓ En absence de transfusion récente du patient (moins de 3 mois) (81)
  - ✓ Lorsque l'on dispose d'une quantité disponible suffisante d'hématies autologues
  - ✓ Quand les hématies du patient ne sont pas totalement saturées par les Ac que l'on souhaite éliminer (TDA < 3+).
  - ✓ Si ces conditions ne sont pas remplies, l'adsorption doit être réalisée avec des hématies homologues (alloadsorption). Mais cette technique présente le risque :
    - ✓ D'adsorber un alloanticorps dirigé contre un Ag de grande fréquence
    - ✓ D'erreur dans la sélection de l'hématie « adsorbante ».

❖ **Modalités techniques de mise en œuvre :**

Quelle que soit la méthode précise utilisée, plusieurs paramètres majeurs doivent être définis :

- ✓ Le caractère homologue ou autologue de l'hématie adsorbante
- ✓ Son phénotype
- ✓ Son traitement ou non par une enzyme
- ✓ La température d'incubation du mélange sérum à adsorber et hématies.

❖ Choix de la température d'adsorption :

L'adsorption est le plus souvent réalisée à +37°C. Cependant, si l'optimum thermique de l'Ac à adsorber est +4°C, cette adsorption sera réalisée à +4°C, voire même en panachant les températures +4°C puis +37°C.

❖ Choix de l'hématie adsorbante :

• **Hématies natives ou traitées ?**

En général, l'adsorption est réalisée avec des hématies traitées par une enzyme protéolytique ou par le ZZAP, ce qui facilite l'accès aux sites antigéniques et permet, dans les cas d'adsorption par une hématie homologue, de s'affranchir du respect des phénotypes FY et MNS3 et 4 du patient car ces Ag sont détruits par le traitement.

Il suffit alors que le phénotype de l'hématie choisie pour adsorber respecte les phénotypes RH-KEL1 et JK du patient.

Dans le cas d'autoanticorps ou d'alloanticorps dirigés contre un Ag de grande fréquence et non actifs en technique enzymatique, l'adsorption étant réalisée avec des hématies non traitées par les enzymes, celles-ci devront posséder un phénotype respectant les phénotypes RH-KEL1, FY, JK et MNS3 et 4 du patient.

- **Hématies autologues ou homologues ?**

Le choix dépend des paramètres listés dans le tableau ci-dessous :

**Tableau III : Critères de sélection des hématies adsorbantes (82)**

| Hématies autologues  | Hématies homologues   |
|--|---|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• A privilégier si un autoanticorps est suspecté</li> <li>• Impossible dans les cas suivants :                             <ul style="list-style-type: none"> <li>- S'il existe des antécédents de transfusion de CGR &lt; 3 mois</li> <li>- Si la quantité de prélèvement est insuffisante (patient anémié)</li> <li>- Si on veut adsorber un alloanticorps dirigé contre un antigène de grande fréquence ou un anticorps d'un mélange complexe</li> </ul> </li> </ul> | <p>A utiliser dans les cas où l'autoanticorps est impossible</p>  |
| <p>Limite :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Hématie du patient saturée (TDA fortement positif, &gt; ou = 3+</li> </ul>  | <p>Limite :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Risque d'adsorption d'un alloanticorps dirigé contre un Ag de grande fréquence</li> <li>• Risque d'erreur dans la sélection de l'hématie adsorbante</li> </ul> |

A Savoir :

- Toutes les techniques d'adsorption peuvent être réalisées sur plasma ou sérum.
- Lorsque l'on réalise une adsorption sur hématie homologue, l'efficacité de l'adsorption doit être vérifiée avant de lancer l'identification sur adsorbat, en s'assurant que l'épreuve de compatibilité entre l'adsorbat et l'hématie adsorbante est négative. Bien entendu, les exigences de l'identification sur adsorbat sont identiques à celles de l'identification réalisée sur sérum natif.

❖ **Méthodes d'adsorption :**

Il existe de nombreuses variantes dans les techniques d'adsorption en fonction :

- **Du milieu réactionnel utilisé : Basse force ionique (LISS) ou en présence de polyéthylène glycol (PEG) (83-87). L'adjonction de ces 2 milieux provoque une dilution au ½ de l'adsorbat, mais :**

- Augmente la vitesse et le rendement de fixation de l'Ac sur son Ag spécifique
- Permet d'être plus efficace quant au nombre d'adsorptions et leur durée

d'incubation

- **Du traitement ou non des hématies adsorbantes :**

• Lorsque la réaction préférentielle de mise en évidence de l'Ac (auto ou allo) est la technique enzymatique, son adsorption sera plus efficace avec des hématies traitées par la papaïne.

• Le ZZAP (88) est un mélange de papaïne cystéine (1%) et de dithiothréitol (DTT pH 8 à 0.2 ML). Il est utilisé pour dissocier des Ac IgG (auto ou allo) fixés sur des hématies.

➤ Nature d'échantillon :

- 2 ou 3 tubes de 7 ml sur EDTA ou sur tube sec traités dans la semaine suivant le prélèvement.

➤ Matériels :

- Tubes à hémolyse
- Etuve à +37°C
- Incubateur à +37°C
- Centrifugeuses (tubes et supports de filtration)
- Micropipette.

➤ Réactifs :

• Pour une **alloadsorption** : hématies adsorbantes sélectionnées : prêtes à l'emploi ou préparées extemporanément

- Pour une **autoadsorption** : hématies du patient traitées extemporanément
- Support de microfiltration

• Panels de dépistage et d'identification, voire de référence : suspension adaptée à la technique de RAI

- Solution saline 0.15 M
- Solution basse force ionique(LISS) adéquate (validée par la technique considérée)
- Papaïne
- DTT pH 8 à 0.2 M.

➤ Les étapes de réalisation (89) :

a) Préparation des hématies du patient pour une autoadsorption :

- Laver 3 fois en solution saline 0.15 M à 37°C 2 ml de culot globulaire :

➤ *En cas de traitement enzymatique :*

- Incuber séparément les GR et la papaïne 15 min à 37°C (5 volumes de GR et 1 volume de papaïne)

- Mettre en contact les GR et la papaïne dans un tube (5 volume/1 volume)

- Incuber le mélange 10 min à +37°C

- Laver 3 fois en solution saline 0.15M.

➤ *En cas de traitement par le ZZAP :*

- ZZAP = 5 ml de DTT 0.2M décongelé extemporanément + 1 ml de la papaïne + 4ML

de tampon

- Mélanger 1 volume GR + 2 volumes de solution ZZAP
- Incuber 30 min à 37°C en mélangeant occasionnellement
- Laver 3 fois en solution saline 0.15M.
- Réaliser la dernière centrifugation pendant 10 min à 2000g avec une décantation maximale du surnageant à la micropipette
- Déposer ce volume de culot lavé dans un tube en verre.

b) Préparation des hématies pour une alloadsorption :

- Sélectionner la ou les hématie(s)
- Laver 3 fois en solution saline à +37°C 3 ml de CG (volume à adapter en fonction du nombre d'adsorptions)
- En cas de traitement enzymatique, voir ci-dessus
- Réaliser la dernière centrifugation pendant 10 min à 2000g avec une décantation maximale du surnageant à la micropipette
- Déposer ce volume de culot lavé dans un tube en verre.

c) Adsorption :

- Dans un tube, à 1 volume de CG d'hématies adsorbantes, ajouter 1 volume de sérum à adsorber. Ajouter éventuellement 1 volume de solution Liss si l'AC à adsorber a une intensité > 1+
- Incuber le tube bouché et couché 20 min à 37°C ou +4°C (suivant les circonstances)
- Centrifuger 10 min à 2000g
- Décanter le surnageant (adsorbat) et le transférer dans le tube suivant puis recommencer comme ci-dessus sans Liss
- Répéter l'opération (si besoin) une 3<sup>ème</sup> fois.

4. Interprétation :

Le sérum adsorbé est utilisé pour mettre en évidence la présence éventuelle d'alloanticorps masqués par les autoanticorps. Les techniques utilisées sont celles de la RAI.

L'interprétation de la RAI réalisée avec adsorbat devra tenir compte du contexte pour lequel l'adsorption a été réalisée (donc du résultat de l'identification de la RAI réalisée avec le sérum natif, témoin autologue et du résultat du TAD) et du phénotype de l'hématie adsorbante. L'adsorption est particulièrement intéressante dans l'analyse d'une pan-agglutination (90).

De manière générale, 3 types de résultats peuvent être obtenus :

➤ Recherche négative d'anticorps antiérythrocytaires (RAE OU RAI) sur adsorbat :

La RAI sur adsorbat est négative : l'Ac concerné par l'adsorption a donc été épuré :

**Dans le cadre d'autoadsorption :** il s'agit d'Ac dirigé contre un des Ag du panel.

**Dans le cadre d'alloadsorption :** soit le contexte a fait évoquer un autoanticorps qui ne masque pas d'Ac dirigé contre un des Ag du panel. Mais il persistera toujours le risque d'avoir adsorbé un alloanticorps dirigé contre un Ag grande fréquence en parallèle de l'adsorption de l'autoanticorps. Soit le phénotypage a mis en évidence l'absence d'un Ag de grande fréquence

et/ou le contexte permet suspecter un Ac dirigé contre un Ag de grande fréquence (pan-agglutination sur sérum natif avec témoin autologue négatif ou plus faible). La spécificité de l'alloanticorps dirigé contre un Ag de grande fréquence devre être recherchée mais l'alloadsorption montre que celui-ci ne masque pas un autre Ac dirigé contre les systèmes RH, Kel, FY, JK, MNS3 et 4 que le patient aurait pu synthétiser.

➤ La recherche d'anticorps antiérythrocytaires sur adsorbat met en évidence une spécificité :

L'anticorps adsorbé, que ce soit un autoanticorps ou un alloanticorps, masque un Ac dont la spécificité doit être analysée.

**Dans le cadre d'une autoadsorption**, cet Ac identifié est un alloanticorps ce qui sera confirmé en déterminant le phénotype du patient pour l'Ag considéré.

**Dans le cadre d'une alloadsorption**, la nature autologue ou allo-immune de l'Ac sera interprétée en fonction des résultats du phénotype du sujet.

➤ La RAI sur adsorbat reste positive sans permettre la mise en évidence d'un Ac spécifique :

Il s'agit d'un échec de l'adsorption.

**Dans le cadre d'une autoadsorption**, cet échec peut être dû à une saturation de l'hématie du patient et/ou un nombre suffisant d'adsorptions, à une faible affinité de l'Ac ou à un alloanticorps dirigé contre un Ag de grande fréquence.

**Dans le cadre d'une alloadsorption**, il s'agit, soit d'un Ac dirigé contre un Ag de grande fréquence présentant un haut titre, soit d'un Ac présentant une faible affinité.

## 5. Indications :

➤ L'adsorption est utilisée pour éliminer un Ac anti-érythrocytaire rendant une identification difficile. L'une des situations les plus courantes correspond à la nécessité d'éliminer un Ac (allo ou auto) responsable de l'agglutination de l'ensemble des hématies du panel d'identification de la RAI (pan-agglutination) en vue de rechercher dans l'adsorbat l'éventuelle présence d'un alloanticorps masqué ayant une incidence transfusionnelle.

L'adsorption ainsi mise en œuvre permet en outre d'assurer la compatibilité transfusionnelle des concentrés de GR vis-à-vis des éventuels alloanticorps masqués.

❖ **Une autoadsorption** est réalisée pour :

✓ Confirmer le caractère « auto » de réactions spécifiques ou non spécifiques avec témoin autologue positif ou non lors de la recherche d'anticorps irréguliers (RAI)

✓ Pouvoir détecter des alloanticorps après adsorption d'autoanticorps.

❖ **Une alloadsorption** est réalisée pour permettre la détection d'alloanticorps après adsorption :

✓ D'autoanticorps

✓ D'alloanticorps agglutinant la majorité ou la totalité des hématies : mélange ou Ac reconnaissant un Ag de grande fréquence.

➤ L'adsorption peut être également utilisée pour :

✓ Séparer les Ac d'un mélange complexe d'Ac. Dans ce cas, il s'agit d'adsorber un Ac préalablement identifié ou suspecté afin de mettre en évidence les autres anticorps.

✓ Confirmer la présence d'un Ag spécifique sur des hématies par leur capacité à adsorber un Ac présentant la spécificité correspondante et *vice-versa*.

Cette approche permet, de plus, de définir, en cas de doute, le caractère « auto » ou « allo » d'un Ac par la disparition ou non de la spécificité à la suite d'une autoadsorption (91).

## C. Typage des antigènes d'histocompatibilité : HLA

### 1. Définition :

En biologie, les **antigènes des leucocytes humains** (en abrégé, **HLA**, de l'anglais *human leukocyte antigen*) sont le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) chez l'humain. Les antigènes des leucocytes humains sont des molécules à la surface des cellules qui permettent l'identification par le système immunitaire. Ces protéines sont nommées « molécules du CMH ».

Les cellules d'un organisme portent un marqueur à leur surface qui leur permet d'être reconnues comme appartenant à ce même organisme, c'est le CMH de classe I. Parmi toutes les cellules de l'organisme, seul le globule rouge ne possède pas CMH de classe I, mais des marqueurs mineurs, les agglutinogènes.

Certains leucocytes (globules blancs) comme les monocytes dans le sang ou les macrophages dans les tissus, possèdent en plus une molécule de présentation d'éléments extérieurs au corps ou antigènes, c'est le CMH de classe II.

En génétique, HLA désigne plutôt le groupe de gènes correspondant, on parle du *système HLA* (situé sur le bras court du chromosome 6). Les gènes HLA de classe I se composent de huit parties codantes (exons) séparées par des parties non codantes (introns). Les gènes de classe II contiennent également cinq ou six exons séparés par des régions introniques.

Il s'agit d'un système caractérisé par son polygénisme et son polymorphisme, qui sont à l'origine de nombreuses études réalisées dans le cadre des transplantations ou de l'autoimmunité (92).

## **2. Principe :**

-Le typage des antigènes d'histocompatibilité (HLA) est aussi appelé typage tissulaire. Le typage HLA est une analyse sanguine qui permet d'identifier des antigènes présents à la surface de cellules et de tissus. On y a recours pour s'assurer de la compatibilité entre le receveur de la greffe (personne qui reçoit la greffe) et le donneur (personne qui donne ses cellules pour la greffe).

-On fait un typage HLA afin d'établir votre motif antigénique et de trouver les anticorps aux antigènes HLA. Plus on trouve d'anticorps, plus la probabilité que la greffe soit un échec est élevée (93).

-Nos parents nous transmettent un motif antigénique (antigènes) appelé groupe tissulaire. La moitié des antigènes provient de notre mère et l'autre moitié de notre père. Chaque personne a son propre motif antigénique sauf les jumeaux identiques, qui ont le même motif et dont les tissus et les cellules sanguines sont parfaitement compatibles. Les frères et les sœurs issus des mêmes parents ont 1 chance sur 4 d'être parfaitement compatibles.

Les cellules souches greffées doivent être les plus compatibles possibles avec celles du receveur. Plus le nombre d'antigènes compatibles est élevé, plus la greffe est susceptible d'être une réussite. La plupart des donneurs compatibles sont de proches membres de la famille (donneur apparenté), de sorte que la recherche d'un donneur commence avec les frères et les sœurs du receveur.

-Les antigènes HLA sont codés par les gènes d'une région appelée, chez l'Homme, le Complexe Majeur d'Histocompatibilité et il a été trouvé une relation plus ou moins étroite entre les antigènes HLA et des maladies auto-immunes. Car le premier rôle des molécules HLA est de présenter des peptides dérivés de pathogènes à des cellules T permettant ainsi une réponse cellulaire immunitaire adaptative. Cependant dans des pathologies auto-immunes, des cellules T auto-réactives peuvent être activées (94).

-On réalise généralement un typage HLA :

➤ **Classe I – Génotypage HLA-A et HLA-B et HLA-C – sang total :**

- Dans le cadre de greffe de MO ou autres organes que la MO
- Dans le cadre de recherche d'une maladie autoimmune, à titre d'exemple :
  - HLA A\*29 : Cet HLA est associé à la chorioretinite birdshot (95)
  - HLA B\*27 : Cet HLA est associé à des spondylarthropathies et à des uvéites (96).
  - HLA B\*51 : Cet HLA a été trouvé associé à la maladie de Behçet (97).

➤ **Classe II – génotypage HLA-DQ et HLA-DR et HLA-DP – sang total :**

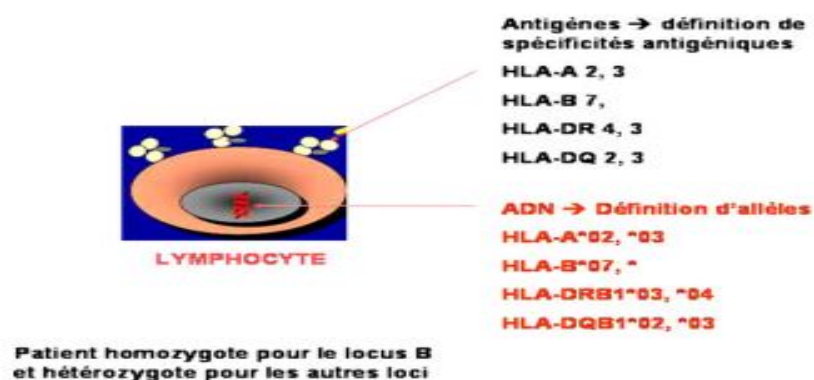
- Dans le cadre de greffe de MO ou autres organes que la MO
- Dans le cadre de recherche d'une maladie autoimmune.

### **3. Mode opératoire et interprétation :**

- ❖ Initialement, la diversité antigénique du HLA a été analysée en utilisant la **technique de sérologie** (étude des antigènes à la surface des cellules).
- ❖ Depuis l'avènement de la technique de **PCR** au milieu des années 1980 (92), la diversité génétique a pu être étudiée au niveau de l'ADN génomique par des **techniques de biologie moléculaire** (définition des allèles au niveau de l'ADN par l'étude en général des exons deux et trois pour la classe I et de l'exon deux pour la classe II).
- ❖ Les nomenclatures de sérologie et de biologie moléculaire sont différentes :
  - **La nomenclature sérologique** identifie le locus suivi d'un numéro identifiant l'antigène (exemples : HLA-A2, HLA-B27, HLA-DR4).
  - **La nomenclature génomique** identifie le gène, suivi d'un astérisque et d'un numéro à deux chiffres (définit la spécificité de l'allèle) ou quatre à huit chiffres (précise le variant allélique d'un allèle donné).

- Un typage HLA avec deux chiffres correspond à une résolution générique (par exemple, HLA-A\*02, HLA-B\*27, HLA-DRB1\*04) et peut être utilisé dans le cadre de l'urgence pour la greffe d'organes pour typer un donneur en état de mort encéphalique ou un receveur d'organes. Le typage générique suffit également dans le cadre d'une étude HLA maladie.

- Un typage HLA avec quatre chiffres correspond à une résolution allélique ou spécifique (par exemple, HLA-A\*0201, HLA-B\*2705, HLA-DRB1\*0401), sa principale indication est la recherche d'une compatibilité tissulaire entre un donneur et son receveur dans le cadre d'une allogreffe de moelle osseuse (98). Plus rarement, il est conseillé pour la détermination de certains allèles associés aux maladies (par exemple, narcolepsie et DRB1\*1501, DQB1\*0602) (98).



**Figure 72 : Comparaison des nomenclatures de sérologie et de biologie moléculaire (92)**

❖ Comment faire ?

- Typage HLA par méthode sérologique (HLA-AB et HLA-B27) **2 tubes ACD de 6 ml**
- Typage HLA par méthode de biologie moléculaire générique ou allélique (HLA-A, B, C, DR, DQ, DP, B\*5701) **1 tube ACD de 6 ml.**

On fait un prélèvement de sang par une aiguille insérée dans une veine de votre bras. Il arrive qu'on fasse ce prélèvement en passant un genre de coton-tige à l'intérieur de la joue (frottis buccal). Aucune préparation particulière n'est nécessaire quelle que soit la méthode employée.

❖ Modalités techniques :

- Le typage HLA peut être réalisé par **une technique sérologique de microlymphocytotoxicité**, communément appelée **LCT** (99). Il est alors réalisable sur cellules du sang périphérique (prélèvement d'un tube hépariné ou d'un tube ACD).

- Les quatre composants de la **LCT** sont les suivants :

- les lymphocytes du sujet à typer, qui portent les antigènes HLA à leur surface.

Pour les groupages HLA de classe I (loci HLA-A et HLA-B), les cellules utilisées sont, soit les lymphocytes totaux, soit les lymphocytes T. Pour les groupages HLA de classe II (loci HLA-DR et HLA-DQ), les cellules utilisées sont les lymphocytes B.

La séparation des cellules mononucléées du sang périphérique est réalisée en utilisant un gradient de densité Ficoll-Isopaque, car chaque population cellulaire du sang périphérique a une densité différente. Une centrifugation permet de recueillir une couche de cellules mononucléées à l'interface plasma Ficoll.

Cette couche contient environ 80 % de lymphocytes T, 10 % de lymphocytes B et 10 % de monocytes. La séparation des différentes cellules mononucléées fait ensuite appel à des billes immunomagnétiques, qui retiennent les cellules d'intérêt par couplage à un anticorps monoclonal (anti-CD2 pour les lymphocytes T et anti-CD19 pour les lymphocytes B) (100).

- une batterie d'anticorps de spécificité anti-HLA connue (anticorps monoclonaux ou alloanticorps humains), qui sont disposés dans les puits d'une plaque de typage ;

- le complément de lapin ;
- le colorant dénommé fluoroquencher rajouté en fin de réaction. (Il s'agit d'un mélange d'acridine orange et de bromure d'éthidium).

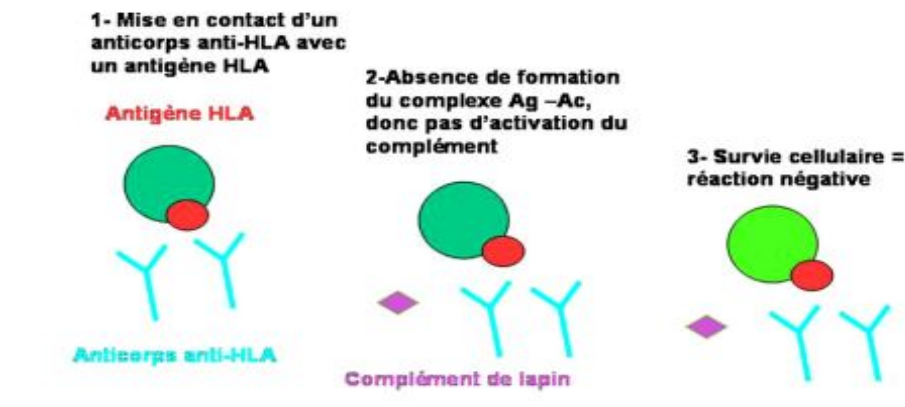
La lecture des puits de la plaque a lieu au microscope inversé :

➤ S'il y a eu reconnaissance dans un puits de la plaque, entre l'anticorps fixé au fond du puits et l'antigène HLA situé à la surface des lymphocytes du patient, le complexe antigène—anticorps formé active le complément de lapin, qui lyse ainsi les cellules. Les cellules mortes sont marquées d'une fluorescence rouge par le bromure d'éthidium (Fig. 73).



**Figure 73** : Principe d'une réaction positive en microlymphocytotoxicité (92)

➤ S'il n'existe pas de reconnaissance entre l'antigène de la cellule du patient et l'anticorps fixé au fond de la plaque, le complément n'est pas activé, les lymphocytes ne sont pas lysés. Les cellules vivantes sont marquées d'une fluorescence verte par l'acridine orange (Fig. 74).



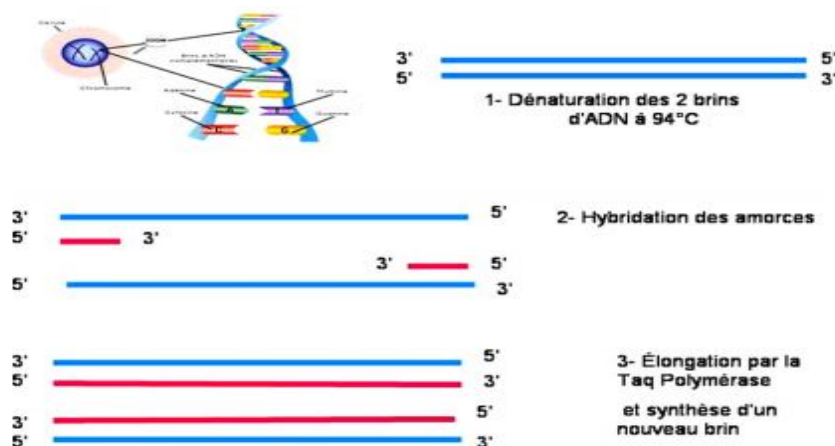
**Figure 74** : Principe d'une réaction négative en microlymphocytotoxicité (92)

Cette technique est la technique de typage historique, rapide et la moins coûteuse. En revanche, la LCT nécessite au départ une bonne viabilité cellulaire. De plus, l'interprétation est parfois difficile, car il existe de nombreuses réactions croisées et les plaques de typage ne montrent pas toujours une bonne discrimination pour la détection des antigènes de classe II.

➤ Un typage HLA peut également être réalisé en faisant appel aux différentes **techniques de biologie moléculaire, basées sur la réaction de polymérisation en chaîne (PCR)**, qui permet la synthèse d'un brin d'ADN complémentaire à partir d'un brin unique qui sert de matrice.

Chaque réaction met en œuvre deux amorces oligonucléotidiques, dont les extrémités 3-prime pointent l'une vers l'autre. Les amorces ou primers en anglais définissent alors, en la bornant, la séquence à amplifier.

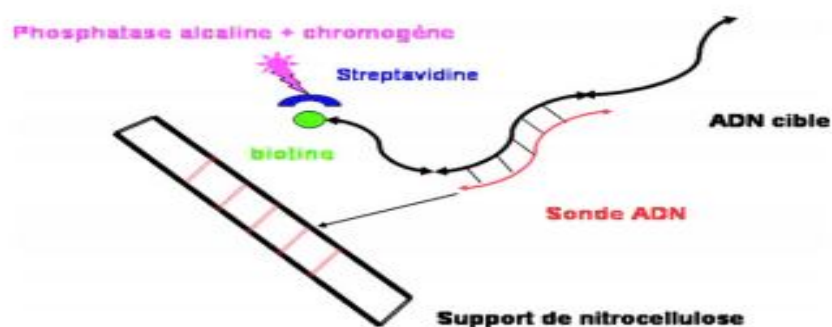
La polymérisation se fait de l'extrémité 5-prime vers l'extrémité 3-prime par une ADN polymérase qui ajoute successivement des désoxyribonucléotides présents dans le mélange en large excès. Chaque base ajoutée est complémentaire de la base correspondante du brin matrice (Fig. 75) (101).



**Figure 75 : Les principales étapes de la réaction de PCR (92)**

- Des applications ont été développées permettant la réalisation des typages HLA :
  - **La technique de PCR—Sequence Specific Primers (SSP)** a été développée en 1992 et utilise une ou deux amorces judicieusement choisies pour n'être capables de s'hybrider qu'avec une séquence déterminée spécifique d'un allèle ou d'un groupe d'allèle (102). L'amplification ne sera vraiment effective que si la séquence de l'amorce est complémentaire de la séquence présente dans l'ADN génomique. Un gel d'électrophorèse en agarose à 2 % après coloration de l'ADN au bromure d'éthidium (agent s'intercalant dans l'ADN), visualisé sous UV permet de voir les fragments amplifiés. Il s'agit d'une technique rapide, plutôt réservée aux typages ponctuels comme la demande de typage HLA pour les dons d'organes. Elle génère très peu d'ambiguïtés de typages (c'est-à-dire que plusieurs possibilités de typage existent pour le même individu), mais elle ne détecte pas les nouveaux allèles.
  - **La technique de PCR—Sequence Specific Oligonucleotides (SSO)** consiste en l'utilisation d'amorces localisées dans des séquences conservées, encadrant les régions polymorphes. Les produits de PCR sont ensuite déposés sur une membrane avant d'être hybridés avec des sondes oligonucléotidiques marquées par un marqueur radioactif ou une enzyme (103).

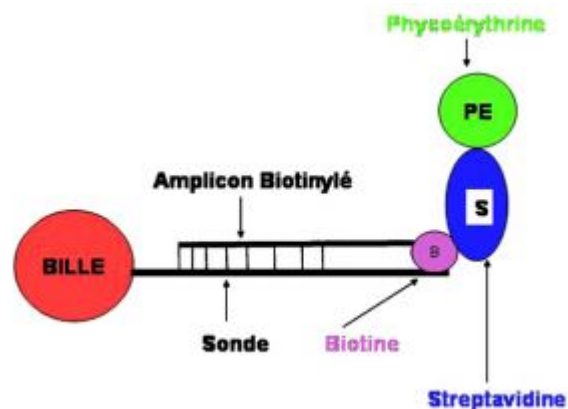
▪ La technique de « reverse dot blot » est une variante de la technique de PCR—SSO. Ce sont les sondes que l'on veut hybrider qui sont fixées sur un support (membrane ou plaque). L'ADN génomique amplifié est marqué au cours de la réaction de PCR, en utilisant des amorces biotinylées et les produits de PCR seront hybridés avec un panel de sondes fixées sur un support solide. La présence de l'hybride est révélée par addition de streptavidine couplée à la phosphatase alcaline et à son substrat, développant ainsi une réaction colorée (Fig. 76). Cette technique est automatisée, elle permet des typages ponctuels ou en série.



**Figure 76 :** Principe de la technique reverse de blot (92)

L'inconvénient de ces deux techniques est la génération de résultats ambigus, obligeant à lever l'ambiguïté par une technique complémentaire. En revanche, il y a possibilité de détecter un nouvel allèle si l'hybridation à la sonde ne se fait pas correctement ou se réalise de façon inattendue.

▪ Une variante de la PCR—SSO est utilisée dans la technique Luminex™ (Luminex Corp.). Les sondes oligonucléotidiques spécifiques du système HLA sont fixées sur des billes de polystyrène possédant chacune des caractéristiques de fluorescence. Le produit de PCR amplifié est marqué à la biotine au cours de la réaction d'amplification. L'hybridation du produit de PCR sur une bille portant la sonde complémentaire est révélée par un conjugué couplant streptavidine et phycoerythrine. Cette technologie novatrice est bien utilisée pour les typages en série (Fig. 77).



**Figure 77** : Détection d'allèles HLA par technologie LUMINEX (92)

▪ La dernière technique est celle de **séquençage d'un fragment d'ADN amplifié par PCR**. Elle nécessite l'utilisation d'un logiciel permettant de comparer la séquence d'ADN du patient aux séquences HLA consensus des banques de données (104).

Pour cela, on marque les fragments d'ADN obtenus par PCR grâce à des marqueurs fluorescents.

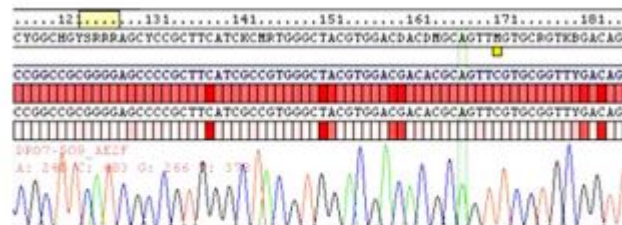
Une fois la réaction de séquence terminée, la taille des fragments obtenus est déterminée par une chromatographie. Le séquenceur détecte la fluorescence sortant des colonnes de chromatographie, repérant ainsi les fragments d'ADN et leur taille précise.

Le résultat est présenté par la machine sous forme de courbes, présentant la fluorescence détectée et l'interprétation qui en est faite en terme de nucléotides (Fig. 67).

Le séquençage est réalisé pour l'analyse des gènes HLA de classe I et II, il peut porter sur un allèle ou deux allèles pour un même locus.

Il s'agit d'une technique semi-automatisée, qui permet un grand débit de typage et une très bonne résolution, mais qui demeure assez coûteuse.

Elle n'est pratiquement utilisée en routine que pour apparier donneur et receveur de cellules souches hématopoïétiques. Elle permet aussi de détecter de nouveaux allèles grâce à la lecture complète de la séquence.



**Chaque pic correspond à un nucléotide avec une couleur par base**

**C: bleu**

**A: vert**

**G: noir**

**T: rouge**

**Figure 78** : Exemple du résultat de la séquence obtenu sur automate (92).

| LIBELLÉ ANALYSE   |
|---|
| <b>Typages HLA</b>  |
| <sup>1</sup> Réalisation par technique de lymphocytotoxicité basée sur une réaction antigène/anticorps en présence de complément  |
| <sup>2</sup> Réalisation par technique de PCR-SSP, PCR réalisée au moyen d'amorces spécifiques d'allèles  |
| <sup>3</sup> Réalisation par technique de Luminex SSO, PCR réalisée au moyen d'amorces spécifiques de locus suivies d'une hybridation sur des sondes spécifiques d'allèles fixées sur des microbilles |
| <sup>4</sup> Réalisation par technique de PCR-SBT mono-allélique, PCR réalisée au moyen d'amorces spécifiques d'allèles, suivie d'un séquençage   |
| <sup>5</sup> Réalisation par technique de PCR-SBT bi-allélique, PCR réalisée au moyen d'amorces spécifiques de locus suivie d'un séquençage   |
| Typage HLA classe I (dans le cadre des maladies auto-immunes) <sup>3</sup>  |
| Typage HLA classe I (dans le cadre des greffes) <sup>1</sup> ou <sup>3</sup>  |
| Recherche de l'allèle HLA-B*5701 <sup>3</sup> et <sup>4</sup>   |
| Recherche de l'allèle HLA-B*27 (BM) <sup>3</sup>  |
| Typage HLA classe I (A, B, C) générique (BM) (par locus) <sup>3</sup>   |
| Typage HLA classe I (résolution intermédiaire ou haute) (A, B, C) (quelle que soit la technique) (par locus) <sup>5</sup>   |
| Typage HLA classe II (dans le cadre des maladies auto-immunes) <sup>3</sup>   |
| Typage HLA classe II (DR,DQ) générique (BM) (par locus) <sup>3</sup>  |
| Typage HLA classe II (résolution intermédiaire ou haute) (DRB1, DQB1, DPB1) (quelle que soit la technique) (par locus) <sup>5</sup> et <sup>2</sup>   |
| Typage HLA DRB3, DRB4, DRB5, DQA1 <sup>3</sup>  |
| Typage HLA allélique par séquençage (par allèle -A,B,C,DRB1) <sup>4</sup>   |
| Typage HLA classe I et II pour don d'organes (LCT/BM) (jour) <sup>1</sup> et <sup>2</sup> ou <sup>3</sup>   |
| Typage HLA classe I et II pour don d'organes (LCT/BM) (garde) <sup>1</sup> et <sup>2</sup>  |
| Typage HLA classe I et II pour don d'organes (contrôle) <sup>1</sup> et <sup>3</sup>  |
| Typage HLA classe I et II pour receveur d'organes (par détermination) <sup>1</sup> et <sup>2</sup> et <sup>3</sup> et <sup>5</sup>  |

**Figure 79** : Différentes techniques possibles pour réalisation d'un typage d'antigènes HLA (105)

#### 4. Indications (106):

##### Typages HLA de classe I (A, B, C) :

-Certains antigènes HLA de classe I sont associés à des maladies. L'antigène HLA-B27 est associé à la spondylarthrite ankylosante, au syndrome de Reiter et à l'uvéite antérieure aiguë. L'antigène HLA-B51 est associé à la maladie de Behcet, l'antigène HLA-Cw6 au psoriasis. Si un grand nombre de patients atteints de ces pathologies sont porteurs de l'antigène, seul un faible nombre d'individus porteurs de l'antigène, développeront la pathologie. L'hypersensibilité à l'Abacavir est fortement associée à la présence de l'allèle HLA-B\*5701.

-Le typage HLA de classe 1 est systématiquement réalisé chez les patients candidats à une greffe d'organe ou de moelle. Si une greffe à donneur vivant est envisagée, le typage sera réalisé chez le(s) donneur(s) potentiel(s) et d'autres membres de la famille selon des protocoles pré-établis. Les protocoles définissent le choix de la technique et le niveau de résolution du typage.

**Typages HLA de classe 2 (DR, DQ, DP) :**

-Certains antigènes HLA de classe 2 sont associés à des maladies. Les antigènes HLA-DR15 - DQ6 sont associés à la narcolepsie, les allèles DRB1\*0401, 0404, 0405, sont associés à la polyarthrite rhumatoïde. Les antigènes HLA-DQ2 et DQ8 sont associés à la maladie cœliaque.

- Le typage HLA de classe 2 est systématiquement réalisé chez les patients candidats à une greffe d'organe ou de moelle. En cas de greffe à donneur vivant, le typage sera réalisé chez le(s) donneur(s) potentiel(s) et d'autres membres de la famille selon des protocoles pré-établis. Les protocoles définissent le choix de la technique et le niveau de résolution du typage.

**D. Recherche des anticorps anti-plaquettes : HPA**

**1. Définition :**

Les anticorps anti-plaquettaires sont des allo-anticorps se développant après transfusion ou au décours d'une grossesse. Ils peuvent être auto-immuns. Ils sont associés à des thrombopénies (allo-immunes ou auto-immunes) de l'adulte. Ils peuvent être à l'origine d'une thrombopénie fœtale et néonatale en cas d'incompatibilité fœto-maternelle. Le choix de la technique sera adapté au contexte de la recherche.

## **2. Principe :**

Les anticorps anti-plaquettes fixés sont recherchés lors de l'exploration d'une thrombopénie, pour confirmer une origine auto-immune. Les anticorps anti-plaquettes libres sont plus spécifiquement recherchés lors de l'exploration d'une thrombopénie allo-immune : thrombopénie foetale ou néonatale par allo-immunisation foeto-maternelle, thrombopénie post-transfusionnelle ou état réfractaire aux transfusions plaquettaires.

Dans un contexte de thrombopénie néonatale ou de mort fœtale in utero, il est important de rechercher les allo-anticorps anti-plaquettaires chez la mère et de réaliser un génotypage plaquettaire (mère et enfant si possible) (107). L'objectif est d'établir le diagnostic d'incompatibilité plaquettaire fœto-maternelle avec la présence d'une allo-immunisation maternelle anti-HPA dirigée contre les plaquettes fœtales. Une prise en charge transfusionnelle adaptée peut être proposée, ainsi qu'un suivi spécialisé des grossesses ultérieures.

La présence d'allo-anticorps anti-HPA peut être également responsable d'une inefficacité transfusionnelle plaquettaire chez le sujet immunisé, ou d'un purpura post-transfusionnel, accident rare mais grave.

En cas de suspicion de purpura thrombopénique auto-immun, le bilan d'auto-immunité consiste à rechercher les auto-anticorps antiplaquettaires fixés et circulants.

## **3. Mode opératoire :**

### **❖ Prélèvement (T° Ambiante / sang sur tube sec) :**

#### **➤ Anticorps antiplaquettes liés aux plaquettes :**

|                                |                    |
|--------------------------------|--------------------|
| Plaquettes $\geq 150$ G/l      | 18 ml de sang EDTA |
| Plaquettes entre 100 – 149 G/l | 24 ml de sang EDTA |
| Plaquettes entre 50 – 99 G/l   | 30 ml de sang EDTA |
| Plaquettes entre 20 – 50 G/l   | 36 ml de sang EDTA |

ATTENTION : si plaquettes inf. à 20 giga/L, prélever 40 mL de sang total EDTA, mais le test est de réalisation difficile voir impossible (108).

- **Anticorps antiplaquettes circulants :** 6 ml sang natif (sérum)
- **Sang du père pour le cross-match :** 12 ml sang EDTA
- **Génotypage plaquettaire LAGH :** 6 ml de sang EDTA

(Pas nécessaire de rajouter un tube supplémentaire si les anticorps antiplaquettes liés aux plaquettes ont été demandés)

**Remarques concernant les prélèvements à effectuer (109) :**

**A) En cas de suspicion de thrombopénie auto-immune, demander :**

- Anticorps antiplaquettes liés et circulants aux plaquettes (si plaquettes 20 G/l)

**B) En cas suspicion de thrombopénie allo-immune (par ex. en cas de non-recirculation des plaquettes transfusées), demander :**

- Anticorps antiplaquettes liés et circulants aux plaquettes
- Génotypage plaquettaire (cette analyse n'est pas obligatoire mais souhaitable car elle facilite la recherche d'éventuels allo-anticorps)

**C) En cas de suspicion de thrombopénie néonatale sur allo-immunisation fœto-maternelle,**

**Effectuez un prélèvement chez :**

➤ **La mère :**

- Anticorps antiplaquettes liés et circulants aux plaquettes (quantité de sang en fonction du compte plaquettaire)
- Génotypage plaquettaire (cocher la case mais ne pas envoyer de sang supplémentaire si vous avez déjà demandé les anticorps antiplaquettes liés aux plaquettes).

➤ **Le père :**

- Sang du père pour cross-match
- Génotypage plaquettaire (cocher la case mais ne pas envoyer de sang supplémentaire si vous avez déjà demandé le cross-match).

➤ **Le nouveau-né :**

- Génotypage plaquettaire : si possible, nous envoyer 1 ml de sang EDTA (par ex. le fond du tube prélevé pour le compte plaquettaire ; si une prise de sang ne peut pas être effectuée chez l'enfant, nous envoyer seulement du sang du père et de la mère).

❖ Techniques :

- Les anticorps associés aux plaquettes (immunoglobuline plaquettaires totales, immunoglobulines **liées** à la surface des plaquettes) sont révélés par **techniques directes**.
- Les anticorps anti-plaquettaires **sériques** sont révélés par **techniques indirectes**.
- De nombreuses techniques sont disponibles pour le dépistage et l'identification des anticorps (Acs) anti-plaquettes (PLT) spécifiques, mais l'efficacité de certaines demeure controversée.

- Les anticorps anti-plaquettes sont dépistés à l'aide d'un test d'immunocapture et identifiés par le test « monoclonal antibody-specific immobilization of platelet antigens » (MAIPA) (110).

En matière de dépistage deux méthodes seront possibles, l'immunocapture (IC) et le « monoclonal antibody-specific immobilization of platelet antigen » (MAIPA). Mais la détection des allo-Acs anti-PLT spécifiques, particulièrement la spécificité anti-HPA-5b, ne semble pas performante en IC et l'introduction de deux tests de dépistage devrait être préconisée (111).

❖ Analyses réalisées et méthodes (112):

- **Détection des IgG fixées à la surface des plaquettes** (analyse par cytométrie en flux)

*Réalisée sur un prélèvement frais < J+3.*

*Si la recherche est positive, l'identification des auto-anticorps peut être réalisée à l'initiative du biologiste médical.*

- **Identification des auto-anticorps fixés sur les plaquettes et dirigés contre les GP IIb/IIIa, GP Ib/IX et GP Ialla** (analyse immuno-enzymatique MAIPA Direct).

- **Recherche des anticorps anti-plaquettaires circulants** (analyse immuno-enzymatique MAIPA Indirect).

*Si la recherche est positive, l'identification des anticorps sériques peut être réalisée à l'initiative du biologiste médical.*

- **Identification des anticorps sériques.**
- **Exploration de thrombopénie néonatale.**

*Contexte : nouveau-né thrombopénique, anomalie échographique foetale, mort foetale in utéro et ... Comprend :*

- *détermination des géotypages plaquettaires des parents et de l'enfant*
- *recherche d'anticorps circulants vis-à-vis des plaquettes paternelles*
- *recherche d'anticorps fixés sur les plaquettes maternelles.*

- **Quantification des allo-anticorps anti HPA-1a.**

La détection des allo-anticorps anti-HPA-1a est essentielle dans la prise en charge des thrombopénies néo-natales ou fœtales par incompatibilité fœto-maternelle (IFM).

Actuellement, la méthode de référence est le MAIPA manuel (*monoclonal antibodies immobilized platelet antigens*).

La méthode Capture P Ready Screen (C-PRS) permet l'identification directe des allo-anticorps anti-HPA-1a en 30 minutes sur le Galileo Echo ainsi le test C-PRS est applicable pour le diagnostic en urgence des IFM par anti-HPA-1a particulièrement avec le réactif HLA assassin.

❖ Délai de réponse : 15 à 20 jours

#### **4. Interprétation :**

Si le dépistage est positif une identification par MAIPA sera nécessaire.

Un génotypage plaquettaire des parents et de l'enfant s'avère nécessaire en cas de suspicion de thrombopénie néonatale par IFM.

#### **5. Indications (113):**

**Thrombopénies périnatales par allo-immunisation foeto-maternelle anti-plaquettaires:**  
2,5% des femmes (en France) ne possèdent pas l'antigène plaquettaire PIA1 contre lequel elles peuvent s'immuniser à l'occasion d'une grossesse si l'enfant est PIA1+. Habituellement, les purpuras thrombopéniques qui peuvent en résulter surviennent sur un terrain immunogénétique particulier, caractérisé par la présence de l'antigène HLA-DR3.

#### **Thrombopénies par allo-immunisation transfusionnelle:**

La capacité d'immunisation est plus importante chez la femme, elle varie également avec la maladie du sujet transfusé (apparition fréquente chez le cirrhotique).

**Auto-anticorps anti-plaquettaires:**

Ils sont détectés dans le purpura thrombopénique auto-immun. Ils peuvent être associés à d'autres pathologies tels que: LED, Syndrome lympho-prolifératif, infection par HIV, ...

**E. Biologie moléculaire : Détermination du génotype fœtal RHD (RH1) dans le plasma maternel**

-L'hémagglutination est la technique historique pour mettre en évidence les antigènes érythrocytaires et les Ac plasmatiques des patients.

Bien qu'elle soit facile de réalisation, de faible coût et, lorsqu'elle est réalisée correctement, spécifique et sensible pour la prise en charge des patients et des donneurs, elle présente un certain nombre de limites (114).

-Cette technique ne permet pas la détermination :

- Du phénotype d'un fœtus à risque pour la MHNN
- Du phénotype des patients qui ont récemment reçu une transfusion ou dont les GR sont recouverts d'immunoglobulines circulantes
- De la zygote RHD des personnes RH1 positif
- Du phénotype étendu d'un grand nombre de donneurs pour l'identification de phénotypes négatifs ou de donneurs de références pour les panels d'identification d'Ac antiérythrocytaires
- Des Ag faiblement exprimés
- Du type d'immunisation (allo ou auto).

-Aujourd'hui, la connaissance des gènes des groupes sanguins et des polymorphismes associés à la plupart des Ag érythrocytaires et phénotypes (115-117) nous permet d'envisager leur identification par amplification génique (PCR) à partir d'ADN génomique, en particulier

lorsque l'hémagglutination montre ses limites dans le cadre de la médecine transfusionnelle (118,119).

Les principales applications de la biologie moléculaire en immunohématologie sont résumés dans le tableau ci-dessous :

**Tableau IV : Applications des analyses moléculaires dans le cadre de la médecine transfusionnelle (114)**

|                         |  |
|-------------------------|--|
| <b>Contexte patient</b> | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Transfusion récente</li> <li>- Hématies recouvertes d'immunoglobuline (TDA positif, impossibilité de désorber les IgG, absence d'Ac pour une agglutination directe)</li> <li>- Identifier un fœtus à risque pour MHNN</li> <li>- Réactifs immunologiques rares, faibles ou non disponibles (anti-DO1, -DO2, -KEL6, -RH10/20)</li> <li>- Déterminer la zygotie, en particulier pour le gène RHD</li> <li>- Distinguer un alloanticorps d'un autoanticorps</li> <li>- Détecter des Ag faiblement exprimés (FYX, RH1 faible, RH1 el)</li> <li>- Aide dans la résolution d'enquêtes sérologiques complexes</li> <li>- Identifier les bases moléculaires de résultats sérologiques inhabituels (variants RH1)</li> <li>- Patients ayant reçu une greffe hématopoïtique/chimérisme naturel</li> </ul> |
| <b>Contexte donneur</b> | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Identifier des donneurs négatifs pour des Ag publics, voire privés</li> <li>- Réactifs immunologiques rares, faibles ou non disponibles (anti-DO1, -DO2, -KEL6, -RH10/20)</li> <li>- Identifier des donneurs pour les panels d'identification des Ac</li> <li>- Résoudre des divergences (A, B, RH1, RH4, et RH5)</li> <li>- Détecter les gènes à la base d'expressions antigéniques faibles</li> </ul>   |

❖ **Détermination du génotype foetal RHD (RH1) :**

-Dans le cadre de prévention efficace contre la MHNN une injection d'immunoglobuline anti-RH1 est effectuée (120). Cette prophylaxie anténatale ciblée à pour effet d'éliminer les hématies fœtales RH : 1 présentes dans le sang d'une mère RH : -1 et, ainsi, d'éviter la mise en place d'une allo-immunisation anti-RH1 à risque pour le fœtus lors d'une seconde grossesse.

-Malgré ces progrès, l'incompatibilité foetomaternelle due à l'Ag RHD (RH1) reste la principale cause d'anémie hémolytique avec ictère néonatal grave, bien que d'autres Ag érythrocytaires puissent en être la cible, en particulier RH2(C), RH3(E), RH4(c) et KEL1(K) (121,122). Les tests immunohématologiques, incluent la détermination du titre de l'Ac anti-RH1 dans la circulation maternelle, ne donnent qu'une indication indirecte du risque et de la gravité de l'anémie hémolytique fœtale.

-Suite à la caractérisation moléculaire de l'haplotype RHDCE chez un sujet RH : 1 qui comporte 2 gènes RHD et RHCE un premier test de génotypage fœtal a été développé par Bennet et al. (123,124).

Ce test détermine la présence ou l'absence du gène RHD via l'amplification par PCR postive ou négative de l'exon 10. Elle est réalisée sur de l'ADN fœtal isolé à partir de prélèvements invasifs d'amniocytes ou de villosités choriales, ce qui n'est pas dénué de risque pour le fœtus et peut provoquer l'aggravation de l'allo-immunisation préexistante (125,126).

-L'avènement récent de la possibilité d'extraire de l'ADN fœtal à partir du plasma de la mère (127-129) permet de rechercher la présence de gène RHD fœtal chez les mères RH :-1 sans nécessiter de prélèvement invasif à risque et d'économiser une prophylaxie anténatale par injection d'immunoglobuline anti-RH1 (130-136). Parallèlement, cette approche surmonte la problématique de la persistance de lymphocytes de fœtus antérieure chez la mère (137,138).

-La détermination du génotype RHD fœtal se fonde sur 3 éléments :

- Premièrement, sur la présence d'ADN fœtal libre dans le plasma maternel provenant des cellules du cyto- et syncytiotrophoblaste (*licence ISIS Innovation Ltd, Oxford University*). Cet ADN fœtal est constitué de petit fragments d'ADN instable dont la quantité augmente en cours de grossesse. Cette quantité estimée à 25 équivalents génome fœtal par millilitre de plasma maternel au premier trimestre de grossesse pour atteindre une certaine d'équivalents génome fœtal au 3<sup>ème</sup> trimestre. 3 jours après la délivrance, l'ADN fœtal disparu de la circulation maternelle ;
- Ensuite, sur le développement des techniques de PCR en temps réel qui permettent d'atteindre des niveaux de sensibilité élevés pour la détection de très faibles quantités d'ADN cible ;
- Enfin, sur la recherche d'un gène RHD actif dans le génome fœtal mais absent du génome maternel.

-Aujourd'hui, la recherche d'un gène RHD pour la prédiction du phénotype RH : 1 du fœtus nécessite de tester plusieurs régions du gène RHD (139).

Pour l'origine maternelle du gène RHD, elle doit alors être confirmée sur la couche leucoplaquettaire maternelle et par serologie.

**A savoir :**

Pour les personnes originaire de l'Afrique, le phénotype RH :-1 maternel (3 à 5% de la population) peut résulter de la délétion mais également d'un pseudo-gène inactif (RHD  $\Psi$ ) ou d'un gène hybride RHD-CE-D<sup>s</sup>. Cette complexité nécessite d'être informé de l'origine ethnique des patientes RH :-1 et de tester par PCR en temps réel plusieurs régions du gène RHD actif.

-Après une période de mise à point, de validation et d'évaluation, la corrélation entre génotype RHD fœtal prédit et le phénotype RH1 observé à la naissance est excellente via de nombreuses études dans les pays occidentaux (131,140,141).

-Ces résultats ont ainsi favorisé le développement d'autres tests pour cibler les Ag RH2(C), RH3(E), RH4(c) et KEL1 (K) également impliqués dans l'incompatibilité foetomaternelle sanguine (142).

-Aujourd'hui, des trousse commerciales marquées CE sont disponibles (Free DNA fetal kit RHD, Institut de biotechnologie J.BoyReims, France) pour réaliser le test sur des échantillons de sang prélevés sur EDTA ou ACD à partir de la 12<sup>ème</sup> semaine d'aménorrhée.

## **V. Recommandations :**

### **A. Dans le cadre du don de sang (qualification immunohématologique) :**

| <b>Bilans immunohématologiques systématiques</b>   | <b>Bilans immunohématologiques non systématiques</b>   |
|--|--|
| <ul style="list-style-type: none"><li>- Groupage ABO-RH1</li><li>- Phénotypage étendu RH2, 3, 4,5 et Kel1</li><li>- RAI (<i>Dépistage</i>)</li></ul> | <ul style="list-style-type: none"><li>- Phénotypage élargi (Kel2 ; FY ; JK ; MNS)</li><li>- RAI (<i>Identification et titrage</i>)</li></ul> |

**B. Dans le cadre de demande de sang (Bilan prétransfusionnel) :**

| Bilans immunohématologiques systématiques   | Bilans immunohématologiques non systématiques   |
|---|---|
| <ul style="list-style-type: none"><li>- Groupage ABO–RH1</li><li>- Phénotypage étendu RH : 2, 3, 4,5 et Kel1</li><li>- RAI (<i>Dépistage</i>) : avant et après transfusion</li><li>- Epreuve de compatibilité directe au laboratoire (ECDL)</li></ul> | <ul style="list-style-type: none"><li>- Phénotypage élargi (Kel2 ; FY ; JK ; MNS)</li><li>- TDA</li><li>- RAI (<i>Identification et titrage</i>) : réalisé par TIA</li><li>- Elution* : même avec un TDA positif</li><li>- Adsorption* : Pour rechercher des Ac potentiellement masqués</li><li>- Recherche des Ac antiplaquette* (HPA) : En cas d'inefficacité transfusionnelle plaquettaire</li></ul> |

*\*Technique non encore disponible au CTS de l'hôpital militaire de Marrakech*

C. Dans le cadre d'une anémie hémolytique auto-immune :

**Bilans immunohématologiques à réaliser**

- Groupage ABO-RH1
- Phénotypage étendu (RH : 2, 3, 4,5 et Kel1)
- Phénotypage élargi (Kel2 ; FY ; JK ; MNS) : réalisé par technique saline ou le plus souvent par le biais d'un TIA utilisant des réactifs monoclonaux IgM.  
Si un patient est transfusé récemment « 4mois » le phénotypage est irréalisable et puisqu'il est indispensable, la technique de choix reste un génotypage\* dans le cadre de biologie moléculaire.
- TDA : Actuellement réalisé le plus souvent en technique de microfiltration à l'aide d'antiglobuline monospécifique anti-IgG ou anti-C3d.
- RAI (*dépistage*) : si positif on réalise par la suite une identification puis titrage
- Elution\*
- Adsorption\* sur hématies autologues ou homologues traitées ou non : Pour recherche d'alloAc potentiellement masqués.
- Test de Donath-Landsteiner\* : si hémoglobinurie paroxystique *a frigore* chez toute personne ayant un Sd hémolytique et TDA type complément

*\*Technique non encore disponible au CTS de l'hôpital militaire de Marrakech*

**D. Dans le cadre de greffe de cellules souches hématopoétiques (Moelle osseuse) et greffe d'autres organes que la MO :**

**1. Greffe de CSH (anciennement appelée greffe de MO) :**

➤ **Allogreffe de CS :**

**Examens immunohématologiques à réaliser dans le cas d'une allogreffe de cellules souches**

- Compatibilité ABO–RH : n'est pas nécessaire entre donneur et receveur ; un groupage ABO–RH n'est demandé que lors d'un recours à une transfusion sanguine du greffé.
- Typage HLA\* (*Luminex en cours d'acquisition*):
  - Classe I (A, B et C)
  - Classe II (DRB1 et DQB1)

*\*Technique non encore disponible au CTS de l'hôpital militaire de Marrakech*

Actuellement les typages HLA sont faits au niveau allélique dit à « 4 digits » grâce à l'apport de biologie moléculaire. Ainsi, par exemple, l'Ag A1 peut se définir : A0101 ou A0102.

➤ **Autogreffe de CS :**

Le donneur et receveur étant la même personne, il n'existe pas de conflit immunitaire donc de problème de compatibilité, de réaction du greffon contre l'hôte, de rejet.

## 2. Greffe d'autres organes que la MO (Projet en cours) :

| Examens immunohématologiques à réaliser |   |
|---|---|
| Pour donneur et receveur                | <ul style="list-style-type: none"><li>- Groupage ABO–RH1</li><li>- Phénotypage étendu RH : 2, 3, 4,5 et Kel1</li><li>- Cross matching lymphocytaire : positif signifie une contreindication formelle à la transplantation</li><li>- Typage HLA : Classe I (A et B)<br/>Classe II (DR et DQ)</li></ul> |
| Pour receveur                           | <ul style="list-style-type: none"><li>- Recherche et identification d'Ac anti–HLA en classe I et II par technique sensible (Elisa, Luminex) et une fois en lymphocytotoxicité</li></ul>   |
| Pour suivi post greffe                  | <ul style="list-style-type: none"><li>- Recherche des Ac anti–HLA Classe I et II</li><li>- Cross matching lymphocytaire</li></ul>   |

**E. Dans le cadre de surveillance immunohématologique de la femme enceinte :**

**Examens immunohématologiques à réaliser**

- Groupage ABO-RH1
- Phénotypage étendu RH : 2, 3, 4,5 et Kel1
- TDA
- RAI (*Dépistage*): dans le but de dépistage d'un risque d'incompatibilité foetomaternelle chez femme RH :-1
- Si RAI *positive* : Identification (*panels 10 hématies*)  
Titration (*en TIA*) et dosage pondéral
- Adsorption\* dont le but de recherche d'AutoAc potentiellement masqué
- Recherche d'allo-anticorps anti HPA-1a \* : dans le but de dépistage d'allo-immunisation foeto-maternelle plaquettaire
- Si recherche des Ac anti-plaquettaire\* *positive* : identification et suivi de concentration\*
- Biologie moléculaire\* :
  - *Détermination du génotype fœtal RHD à partir du plasma maternel\** par biais d'amplification génique par PCR en temps réel.
  - *Détermination du génotypage fœtal plaquettaire\** dans le cas de risque d'allo-immunisation plaquettaire foeto-maternelle

*\*Technique non encore disponible au CTS de l'hôpital militaire de Marrakech*

**F. Dans le cadre d'immunologie plaquettaire : Guide de prélèvement pour les échantillons biologiques :**

**1. Dans le cadre d'exploration d'une thrombopénie auto-immune (143) :**

| Analyses à réaliser  | Délai | Prélèvement   |
|--|-------|---|
| Détection des immunoglobulines G associées aux plaquettes ( <i>analyse par cytométrie en flux</i> ) uniquement sur un prélèvement inférieur à 72 h | 3     | 15 mL de sang sur EDTA (enfant : entre 1 et 5 mL sur tube EDTA suivant l'âge) |
| Identification d'auto-anticorps fixés sur les plaquettes ( <i>analyse immunoenzymatique MAIPA direct</i> )   | 5     |   |
| Dépistage d'anticorps sériques antiplaquettaires ( <i>analyse immunoenzymatique MAIPA indirect</i> )   | 5     | 10 mL sur tube sec  |
| Identification d'anticorps sériques antiplaquettaires ( <i>analyse immunoenzymatique MAIPA indirect</i> ) si dépistage positif.                    | 5     |   |

## 2. Dans le cadre d'exploration d'une inefficacité transfusionnelle plaquettaire (143):

| Analyses à réaliser   | Délai | Prélèvement                 |
|---|-------|-----------------------------|
| Dépistage d'anticorps sériques antiplaquettaires<br><i>(analyse immunoenzymatique MAIPA indirect)</i>                           | 5     | 10 mL sur tube sec          |
| Identification d'anticorps sériques antiplaquettaires<br><i>(analyse immunoenzymatique MAIPA indirect)</i> si dépistage positif | 5     |                             |
| Phénotypage plaquettaire dans les systèmes HPA-1, 3 & 5<br><i>(analyse immunoenzymatique MAIPA indirect)</i>                    | 5     | 15 mL de sang sur tube EDTA |
| Génotypage plaquettaire HPA-1 ou HPA-3 ou HPA-5<br><i>(technique PCR multiplexe)</i>  | 4     |                             |
| Génotypage plaquettaire étendu dans les systèmes HPA-1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9,11 & 15<br><i>(technique PCR multiplexe)</i>     | 4     |                             |

### 3. Dans le cadre d'exploration d'une thrombopénie néonatale (143):

| Analyses à réaliser   | Délai | Prélèvement  |
|---|-------|--|
| Phénotypage plaquettaire maternel dans les systèmes HPA-1, 3 & 5 ( <i>analyse immunoenzymatique MAIPA indirect</i> )                | 5     | 15 mL de sang sur un tube EDTA   |
| Génotypage plaquettaire maternel HPA-1, 3 & 5 ( <i>technique PCR multiplexe</i> )   | 4     |  |
| Génotypage plaquettaire étendu maternel dans les systèmes HPA-1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9,11 & 15 ( <i>technique PCR multiplexe</i> ) | 4     |  |
| Phénotypage plaquettaire paternel dans les systèmes HPA-1, 3 & 5 ( <i>analyse immunoenzymatique MAIPA indirect</i> )                | 5     | 15 mL de sang sur tube EDTA  |
| Génotypage plaquettaire paternel HPA-1, 3 & 5 ( <i>technique PCR multiplexe</i> )   | 4     |  |
| Génotypage plaquettaire étendu paternel dans les systèmes HPA-1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9,11 & 15 ( <i>technique PCR multiplexe</i> ) | 4     |  |
| Génotypage plaquettaire HPA-1, 3 & 5 de l'enfant ( <i>technique PCR multiplexe</i> )  | 4     | 1 mL de sang sur EDTA et prélèvement de cellules buccales par écouvillon |

Les Examens immunohématologiques au centre de transfusion sanguine: Expérience de l'Hôpital Militaire Avicenne de Marrakech

|   |   |  |
|---|---|--|
| Génotypage plaquettaire étendu de l'enfant dans les systèmes HPA1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9,11 & 15 ( <i>technique PCR multiplexe</i> ) | 4 | 1 mL de sang sur EDTA et prélèvement de cellules buccales par écouvillon |
| Dépistage d'anticorps sériques maternels sur plaquettes du panel ( <i>analyse immunoenzymatique MAIPA indirect</i> )                  | 5 | 10 mL sur tube sec   |
| Epreuve de compatibilité plaquettaire (Cross-match sur plaquettes paternelles) ( <i>analyse immunoenzymatique MAIPA indirect</i> )    | 5 |  |
| Identification d'anticorps sériques maternels ( <i>analyse immunoenzymatique MAIPA indirect</i> ) si dépistage positif                | 5 |  |
| Identification d'anticorps fixés sur plaquettes maternelles ( <i>analyse immunoenzymatique MAIPA direct</i> ) (3 molécules)           | 5 | 15 mL de sang sur tube EDTA  |



## **Conclusion**

La sécurité transfusionnelle repose en grande partie sur la détection et l'identification des anticorps antiérythrocytaires.

A ce jour, les techniques de détection des anticorps ont peu évolué. Des améliorations cependant non négligeables ont été introduites dans les années 1990 et, en particulier, de nouveaux supports pour mettre en évidence la réaction d'agglutination (valables d'ailleurs aussi pour le phénotypage), tels que la technique de microfiltration (gel ou billes...), la technique en microplaque ou la technique d'immunoadhérence.

Ces différents supports ont permis d'apporter une facilité de lecture, une meilleure sensibilité et une possibilité d'automatisation. Le revers de la sensibilité est cependant, dans certains cas, la présence de réactivités non spécifiques et sans intérêt transfusionnel qui peut retarder le rendu du résultat et donc la décision transfusionnelle.

Malgré ces améliorations techniques, il n'en demeure pas moins que le principe de base repose toujours sur la nécessité de tester les sérums des patients avec des hématies-test d'origine humaine. La constitution des panels d'hématies-test reste totalement dépendante des donneurs de sang et nécessite une organisation très complexe pour permettre de répondre à la réglementation en vigueur en termes de phénotypes des GR constituant ces panels.

Les développements dans ce domaine vont donc dans le sens d'une simplification de cette recherche, avec des techniques « donneurs » indépendants et des supports d'Ag standardisés, de durée de vie longue en cas de cellules, et de production aisée.

Aujourd'hui, la connaissance des gènes des groupes sanguins et des polymorphismes associés à la plupart des Ag érythrocytaires et phénotypes nous permet d'envisager leur identification par amplification génique (PCR pour *polymerase chain reaction*) à partir d'ADN génomique, en particulier lorsque l'hémagglutination montre ses limites dans le cadre de la médecine transfusionnelle.

Les nouvelles technologies ont surtout concerné le phénotypage et génotypage. Pour ce qui est du génotypage, la réduction de son coût, sa standardisation, sa simplification et d'amélioration de sa cadence sont les derniers obstacles à lever pour permettre son implantation plus large dans les laboratoires d'immunohématologie.

Il est donc probable que ces techniques supplanteront les techniques existantes à un horizon de 5 à 10 ans. Le champ des développements reste en revanche ouvert vis-à-vis des techniques de détection des Ac.



## **Annexe 1 : Aspects législatifs organisant la réalisation des Ex. IH dans le cadre de transfusion sanguine au Maroc (Textes de loi) (144)**

M.S - Direction de la réglementation et du contentieux - BASE DE DONNEES

**REFERENCE: B.O N° 4336 - 13 rejeb 1416 (6-12-95).**

**Decret n° 2-94-20 (22 jourmada II 1416) 16 Novembre 1995 pris pour l'application de la loi n° 03-94 relative au don, au prélèvement et à l'utilisation du sang humain**

**Le Premier Ministre,**

**Vu la loi n° 03-94 relative au don, au prélèvement et à l'utilisation du sang humain, promulguée par le dahir n°1-95-133 du 19 safar 1416 (18 juin 1995);**

**Sur proposition du ministre de la santé publique;**

**Après examen par le conseil des ministres réunis le 29 kaada 1414 (11 mai 1994),**

**Décète:**

### **Chapitre Premier: Du Prélèvement du Sang**

**Article Premier :** (modifié par décret n° 2-01-2023 du 4 septembre 2002, art 1er) En application des dispositions du 1<sup>er</sup> alinéa de l'article 4 de la loi n° 03-94 susvisée, le sang objet du don doit faire l'objet des analyses biologiques suivantes ;

- ✓ la détermination du groupe sanguin ABO et Rhésus. La détermination du groupe Rhésus doit rechercher les antigènes D-C-E. Ne peut être considéré comme Rhésus négatif que le sang dépourvu de ces trois antigènes ;

- ✓ La détermination de tout groupe sanguin doit être faite dans les conditions ci-après
- ✓ sur deux prélèvements faits à 24 heures d'intervalle ; avec deux lots de réactifs ; par deux techniciens différents ; selon deux techniques différentes.
- ✓ la mesure du taux de l'hémoglobine ou de l'hématocrite ;
- ✓ le dépistage sérologique de la syphilis ; la détection de l'antigène HBs (marqueur de l'hépatite B) ; la détection des anticorps dirigés contre le virus responsable du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA) ; le dépistage de l'Hépatite C et le dosage des ALAT ;
- ✓ la recherche d'hémolysines Anti A et Anti B dans le sang du groupe O. En cas de positivité une étiquette portant la mention " A ne transfuser qu'à des sujets de groupe O " doit être collée sur la poche ;
- ✓ le dépistage systématique des agglutinines irrégulières.

Cette liste peut être complétée ou modifiée par arrêté du ministre de la santé publique en fonction de l'évolution des connaissances médicales.

**Article 2 :** Conformément aux dispositions du 2e alinéa de l'article 6 de la loi susvisée n° 03-94, chaque prélèvement du sang est précédé d'un examen médical du donneur.

**Article 3 :** La fréquence des prélèvements de sang ne doit pas être supérieure à cinq fois par an pour les hommes et trois fois par an pour les femmes.

L'intervalle entre deux prélèvements doit être égal à deux mois au moins pour les hommes et trois mois au moins pour les femmes.

Toutefois, la fréquence des prélèvements spécifiques de plaquettes, de globules blancs, de globules rouges ou de plasma ne peut être supérieure à une fois tous les trois mois lorsqu'ils sont effectués à l'aide d'appareils à cytophérèse et à une fois tous les 15 jours lorsqu'il s'agit d'appareils à plasmaphérèse.

**Article 4 :** La quantité du sang recueilli lors de chaque prélèvement ne doit pas être supérieure à 400 ml non compris les échantillons nécessaires aux analyses.

Cette quantité ne peut être supérieure à 600 ml lorsqu'il s'agit de prélèvements spécifiques.

**Article 5 :** Ne peuvent faire don de leur sang :

**1) Les sujets présentant une des pathologies suivantes :**

- ✓ Néphropathies chroniques ;
- ✓ Endocrinopathies chroniques ;
- ✓ Diabète ;
- ✓ Cirrhose ;
- ✓ Hépatite aiguë ou chronique ;
- ✓ Syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA) ;
- ✓ Ulcère ;
- ✓ Asthme ;
- ✓ Hémopathies chroniques ;
- ✓ Cancer ;
- ✓ Angor; Infarctus.

**2) Les sujets ayant séjourné en zone impaludée.**

**3) Les toxicomanes (par voie intraveineuse).**

Cette liste peut être complétée par arrêté du ministre de la santé publique.

**Article 6 :** Les contre-indications temporaires au don du sang sont :

- ✓ la tension artérielle MINIMA supérieure à 10 cm Hg ;
- ✓ la tension artérielle MAXIMA supérieure à 16 cm Hg ;
- ✓ l'état d'ébriété ;
- ✓ la vaccination datant de moins de 21 jours ;
- ✓ la sérothérapie datant de moins de 15 jours ;
- ✓ un traitement en cours ;

- ✓ la pneumopathie aiguë ;
- ✓ les hémopathies aiguës ;
- ✓ la grossesse ;
- ✓ l'accouchement datant de moins de 6 mois ;
- ✓ l'interruption de grossesse datant de moins de 3 mois ;
- ✓ l'allaitement en cours ;
- ✓ un traitement psychiatrique ;
- ✓ l'intervention chirurgicale datant de moins de 3 mois ;
- ✓ L'âge inférieur à 18 ans.

Cette liste peut être complétée par arrêté du ministre de la santé publique.

**Article 7 :** Lors de l'examen médical prévu à l'article 2 du présent décret, le médecin peut refuser le prélèvement pour des affections autres que celles définies dans les articles 4 et 5 ci-dessus, lorsque celui-ci présente un danger pour la santé du donneur ou celle du receveur.

### **Chapitre II : De la Transfusion du Sang**

**Article 8 :** Avant toute transfusion de sang ou de ses dérivés, une prescription écrite, signée par un médecin, doit spécifier l'identité du receveur et son groupe sanguin ainsi que la nature et la quantité du produit à administrer.

**Article 9 :** ( modifié par Décret n° 2-99-1010 du 3 décembre 1999) A l'exception de l'utilisation d'urgence du sang ou des globules rouges du groupe O Rhésus négatif et du cas d'une transfusion autologue, toute transfusion de globules rouges nécessite deux groupages sanguins du receveur à vingt-quatre heures (24 h) d'intervalle, et la recherche d'une compatibilité entre les sang du donneur et du receveur.

**Article 10 :** Le prélèvement du sang en vue d'une transfusion autologue prévue à l'article 9 de la loi n° 03-94 susvisée, ne peut être effectué que par un docteur en médecine et sur indication médicale de celui-ci.

**Article 11 :** Le patient, proposé à une transfusion autologue, doit être informé des risques, avantages, contraintes et modalités de cette technique. Le prélèvement en vue d'une transfusion autologue ne peut se faire qu'après consentement écrit de l'intéressé ou celui de son représentant légal et si les examens préliminaires ci-après sont normaux :

- ✓ Examen clinique complet :
- ✓ capital veineux ;
- ✓ État cutané.
- ✓ Examens complémentaires :
- ✓ électrocardiogramme ;
- ✓ radiographie pulmonaire ;
- ✓ ionogramme sanguin et urinaire ;
- ✓ Hémogramme; bilan d'hémostase.

Le sang prélevé en vue d'une transfusion autologue est soumis aux mêmes analyses biologiques visées à l'article premier du présent décret.

**Article 12 :** La poche de sang prélevé en vue de la transfusion autologue est réservée à son donneur. Cette poche doit indiquer le nom, prénom, date de naissance, sexe, le numéro de dossier du patient ainsi que la date de péremption de la poche.

**Article 13 :** Avant toute transfusion autologue, il est procédé à un contrôle du groupe ABO au lit du malade à l'aide d'une carte de contrôle prétransfusionnel.

**Article 14 :** Le prélèvement, la préparation, la conservation et la distribution des dérivés sanguins, destinés à une transfusion autologue, sont de la compétence des centres de transfusion sanguine relevant du ministère de la santé publique.

**Article 15 :** On entend par " milieu de soins ", visé à l'article 10 de la loi n° 03-94 précitée, les centres hospitaliers, les hôpitaux, les maisons d'accouchement médicalisées et les cliniques.

**Article 16 :** Toute poche de sang total ou culot globulaire est accompagnée d'une carte de contrôle prétransfusionnel pour exécuter les épreuves de compatibilité dans le système ABO au lit du malade.

L'épreuve de compatibilité est obligatoirement effectuée avant la transfusion de chaque poche de sang.

La carte susvisée doit être conservée dans le dossier du malade.

**Chapitre III Réintitulé par Décret n° 2-06-303 du 14/11/2006 B.O N° 5488 DU 4/1/2007**

**Chapitre III : De la préparation, de la conservation, de l'étiquetage, du dépôt des produits sanguins et des règles d'hémovigilance.**

**Article 17 :** Sous réserve des dispositions prévues à l'article 8 de la loi précitée n° 03-94, les produits sanguins d'origine humaine à usage thérapeutique sont préparés à partir de sang prélevé sur des sujets sains dont l'aptitude à subir un prélèvement a été reconnue par un acte médical, conformément à l'article 2 ci-dessus.

**Article 18 :** (modifié, Décret n° 2-96-421 du 20 novembre 1996) La préparation du sang humain et des dérivés du sang labiles tels que les culots globulaires, le plasma et les culots plaquettaires ne peut être effectuée que par un docteur en médecine ou un pharmacien ou sous leur direction et uniquement dans les services de transfusion du ministère de la santé publique et les services de transfusion relevant de l'inspection de santé militaire.

**Article 19 :** Le sang humain et les dérivés du sang labiles sont déposés dans les formations sanitaires désignées par le ministre de la santé publique et le cas échéant, dans les services organisés à cet effet, relevant des formations hospitalières de l'administration de la défense nationale ou des cliniques privées.

**Article 20 :** Aux fins d'identification, une étiquette est collée sur chaque poche de sang ou flacon contenant ses dérivés. Cette étiquette mentionne le numéro de série et la date de péremption du produit.

**Article 21 :** Le sang total et les culots globulaires sont conservés à la température de 4 à 6°C dans une chambre froide ou un réfrigérateur.

Le délai de conservation varie selon le type d'anticoagulant utilisé.

**Article 22 :** Le plasma congelé peut être conservé durant 12 mois à moins 30 centigrades.

**Article 23 :** Les culots plaquettaires sont conservés, durant 5 jours, à 18°C sous agitation continue.

**Article 24 :** Les produits sanguins périmés, contaminés ou ne répondant pas aux normes de qualité définies par les dispositions de la loi précitée n° 03-94 et du présent décret, sont détruits par incinération sous la responsabilité d'un médecin.

**Article 25 :** Conformément aux dispositions de l'article 12 de la loi n° 03-94 susvisée, le Centre national de transfusion sanguine et d'hématologie relevant du ministère de la santé publique effectue le contrôle préalable de qualité sur le plasma devant servir à la préparation des dérivés stables du sang.

Le Centre national de transfusion sanguine et d'hématologie assure l'approvisionnement en plasma des laboratoires qui produisent les médicaments dérivés du sang.

Le ministre de la santé fixe par arrêté les règles de contrôle de qualité des médicaments dérivés du sang prévu au 4e alinéa de l'article 12 de la loi n° 0394 précitée.

**Article 26 :** Modifié par décret n° 2-06-303 du 14/11/2006 B.O n° 5488 du 4/1/2007 La liste des dérivés stables issus du fractionnement physico-chimique du sang est fixée par arrêté du ministre de la santé.

Sont également fixées par arrêté du ministre de la santé les règles d'hémovigilance.

#### Chapitre IV : Dispositions Diverses

**Article 27 :** L'autorisation prévue à l'article 13 de la loi précitée n° 03-94 est délivrée par le ministre de la santé publique.

**ART 27-1 , 27-2 , et 27-3 A ajoutés par décret n° 2-06-303 du 14/11/2006 B.O n° 5488 du 4/1/2007**

**Article 27\_1.** – Le comité de sécurité transfusionnelle, institué par l'article 13-1 de la loi n° 03-94 susvisée, est placé sous la présidence du ministre de la santé. Il siège au ministère de la santé.

Le comité est composé des membres ci-après:

- ✓ les directeurs des centres hospitaliers, créés en vertu de la loi n° 3780 relative aux centres hospitaliers;
- ✓ le directeur des hôpitaux et des soins ambulatoires;
- ✓ le directeur de l'épidémiologie et de la lutte contre les maladies;
- ✓ le directeur du médicament et de la pharmacie;
- ✓ le directeur du Centre national de transfusion sanguine et d'hématologie;
- ✓ les directeurs des centres régionaux de transfusion sanguine ;
- ✓ l'inspecteur du service de santé des Forces Armées Royales ou son représentant.
- ✓ le président du conseil national de l'Ordre national des médecins ou son représentant.

Le comité comprend également:

- ✓ six (06) membres, désignés par le ministre de la santé et choisis pour leur compétence médicale et scientifique notamment en hématologie, en immunologie, en maladies infectieuses ou en santé publique.

Ces membres siègent pour une durée de 3 ans renouvelable une seule fois.

Le comité de sécurité transfusionnelle se réunit à l'initiative de son président au moins trois fois par an et chaque fois que la nécessité l'exige.

**Article 27\_2.** – Le comité de sécurité transfusionnelle est chargé de :

- ✓ évaluer les conditions dans lesquelles est assurée la sécurité transfusionnelle
- ✓ proposer toute mesure utile destinée à améliorer cette sécurité sur l'ensemble de l'activité transfusionnelle ;
- ✓ organiser et coordonner les actions d'hémovigilance entreprises à l'échelle nationale et régionale au sein des établissements de soins et des centres de transfusion sanguine;
- ✓ alerter le ministre de la santé sur toute question d'ordre médical ou scientifique qui peut avoir une incidence sur l'activité transfusionnelle ;
- ✓ concevoir toute mesure destinée à remédier aux incidents transfusionnels ;
- ✓ présenter au ministre de la santé un programme annuel de formation en sécurité transfusionnelle.

Le comité peut être consulté par le ministre de la santé pour toute autre question relative à la sécurité transfusionnelle.

Pour l'accomplissement de ses missions, le comité est tenu informé des conditions de fonctionnement des centres de transfusion sanguine et des dépôts de sang. IL doit être avisé de tout incident transfusionnel inattendu ou indésirable.

**Article 27\_3.** – Le comité de sécurité transfusionnelle peut se saisir de toute question relative à la sécurité transfusionnelle et adresser des recommandations au ministre de la santé à qui il remet chaque année un rapport sur la sécurité transfusionnelle.

**Article 28 :** Le ministre de la santé publique est chargé de l'exécution du présent décret qui sera publié au Bulletin officiel.

Fait à Rabat, le 22 jourmada II 1416

(16 novembre 1995).

ABDELLATIF FILALI.

Pour contreseing

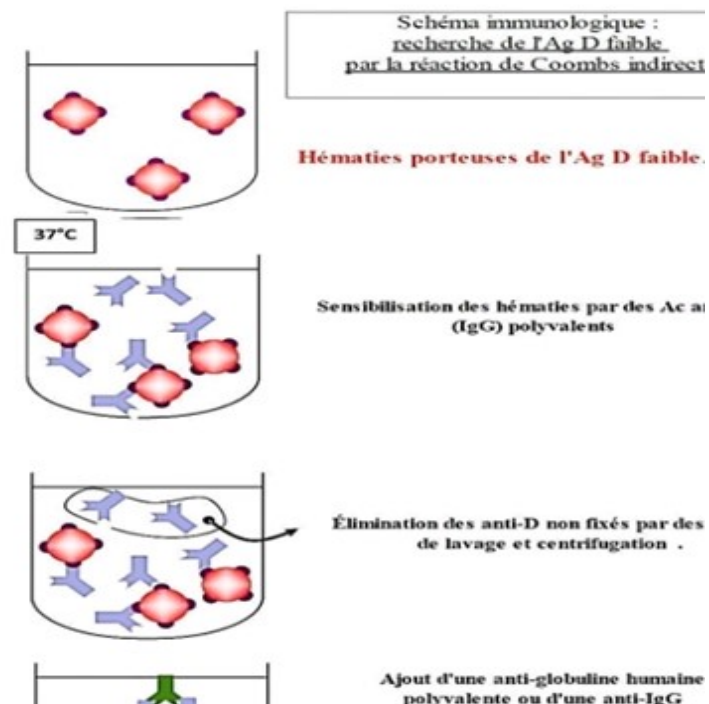
Le ministre de la santé publique,

Dr AHMED ALAMI.

## Annexe 2: Recherche de l'antigène D faible: Du

### ❖ Principe :

La recherche de l'Ag D faible se fait chez les donneurs ayant un phénotype Rh1 négatif, par une technique sensible: Le test du Coombs indirect ou test indirect à l'antiglobuline (TIA).



**Figure 80 :** Schéma illustrant le test du Coombs indirect à la recherche de l'Ag D Faible

❖ **Mode opératoire : recherche de l'antigène D faible sur tube (145) :**

-Faire 3 lavages du culot globulaire avec de l'eau physiologique (centrifugation : 3000 tours pendant 1 min).

- Préparer une suspension d'hématies à 5% en eau physiologique.

- Prélever 50µl de la dilution d'hématies, et mélanger avec 50 µl l'anti-D (type IgG).

- Procéder de la même manière pour le témoin positif (Rh+).

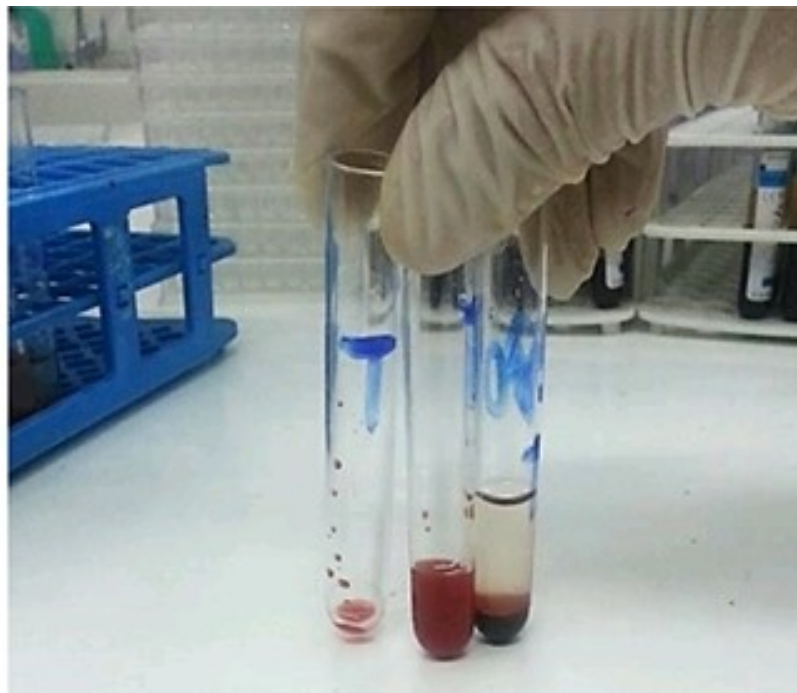
- Agiter doucement puis incuber à 37°C d'une durée dépendante du réactif.

- Laver les hématies 3 fois en eau physiologique et jeter l'eau du dernier lavage

- Ajouter au culot d'hématies, 1 ou 2 volumes d'anti-globulines humaines (AgH) polyvalente.

- Homogénéiser puis centrifuger 1 min à 1000 tours/min

➤ Effectuer la lecture en remettant doucement en suspension le culot d'hématie



**Figure 81** : Le test du Coombs indirect à la recherche de l'Ag D faible sur tube

- La présence d'agglutination indique la présence de l'AgD faible et le donneur de sang est dit RH1 négatif avec Du positif. Il est inclus dans les RH1 positifs
- L'absence d'agglutination confirme le phénotype RH1 négatif du donneur.
- ✓ Remarque : La présence d'une agglutination douteuse avec l'anti-D, doit être confirmée par la technique sur plaque chauffante (40°C) : (Rhésuscope)



Figure 82: image montrant la technique sur plaque chauffante (Rhésuscope)

## Annexe 3 : Test enzymatique à la papaïne

### 1. Principe :

La présence d'Ac irréguliers est recherchée dans le sérum d'un patient :

- par agglutination active indirecte (artificielle) utilisant un artifice enzymatique (traitement des hématies par une enzyme protéolytique)
- à l'aide d'un panel d'hématies phénotypées (et traitées).

- 1<sup>ère</sup> étape : les GR sont traités par une enzyme protéolytique (papaïne, broméline ...) à 37°C.
- 2<sup>ème</sup> étape : lavages : élimination des fragments éliminés par le traitement ainsi que les enzymes
- 3<sup>ème</sup> étape : les GR traités sont sensibilisés par les AI éventuels présents dans le sérum du patient

👉 Importance des lavages :

Le traitement par une enzyme élimine des petits fragments à la surface des hématies. Ces fragments et les enzymes doivent être éliminés pour éviter toute interférence (éventuelle dénaturation des Ac présents dans le sérum testé).

Les AI éventuellement présents dans le sérum du patient pourront atteindre beaucoup plus facilement les Ag portés par les hématies (augmentation de l'accessibilité de certains sites antigéniques, diminution du potentiel zeta, diminution de l'encombrement stérique.)

**REMARQUES :**

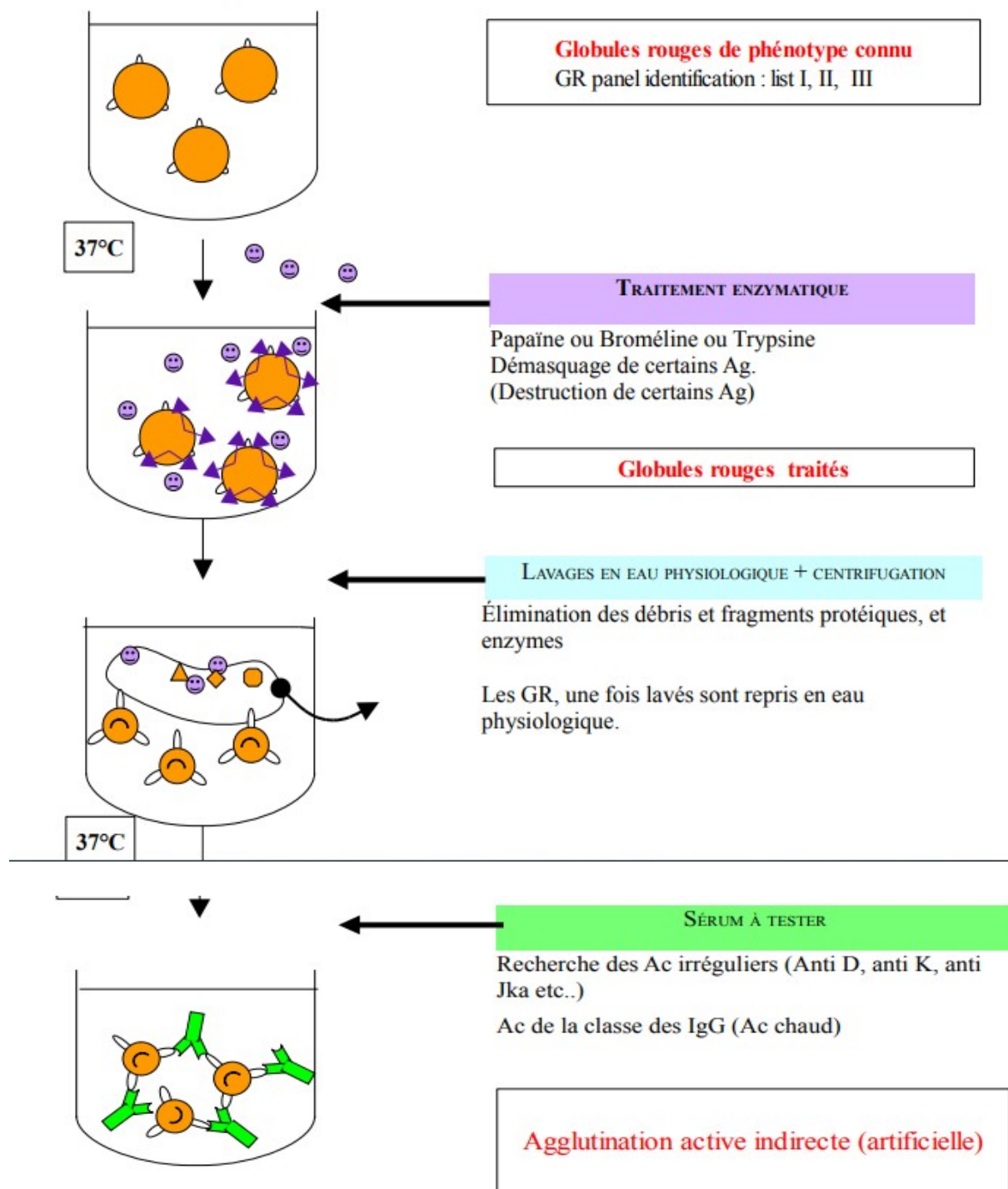
➤ **Avantages:**

- Augmentation de la puissance antigénique des Ag du système Rhésus.
- Augmentation de la puissance antigénique des Ag du système Kidd par la papaïne.
- Augmentation de la puissance antigénique des Ag du système Lewis par la ficine.

➤ **Inconvénient** – altération de la puissance antigénique:

- Ag M N S s Fya Fyb détruits par tout traitement enzymatique.
- Ag Fya Fyb détruits (S s affaiblis) par la papaïne.
- Ag M N affaiblis par tout traitement enzymatique.

**Schéma immunologique**



**Figure 83:** Schéma immunologique des étapes de réalisation du test enzymatique à la papaïne

## 2. Réactifs et mode opératoire :

### 2.1- Réactifs :

- **Enzyme protéolytique** : trypsine ou papaïne ou broméline ou ficine .....

Les hématies des panels sont traitées par les enzymes (en respectant la procédure indiquée par le fabricant), lavées en eau physiologique puis remise en suspension à 40% (test sur rhéuscope) ou à 10 % (test en tube).

### 2.2- Mode opératoire :

- **Technique en plaque ou en tubes :**

| Agglutination des GR traités par la papaïne  | Technique en plaque   |                 |                 |                 |                 |                 |
|--|---|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
|  | Dans les tubes, remettre chaque culot en suspension dans 3 gouttes d'eau physiologique (suspension à 40 %), puis dans les alvéoles d'une plaque jetable déposée sur le rhéuscope, mélanger. |                 |                 |                 |                 |                 |
|  | Suspension de GR traités et lavés   | 1 goutte        | 1 goutte        | 1 goutte        | 1 goutte        | 1 goutte        |
|  | Sérum à tester  | 1 goutte (50µL) | 1 goutte (50µL) | 1 goutte (50µL) | -               | -               |
|  | Sérum anti-D (IgG)  | -               | -               | -               | 1 goutte (50µL) | 1 goutte (50µL) |
|  | Mélanger et observer la présence éventuelle d'une agglutination   |                 |                 |                 |                 |                 |
|  | Technique en tubes  |                 |                 |                 |                 |                 |
|  | Dans les tubes: remettre chaque culot en suspension (à 10 %) dans 18-20 gouttes d'eau physiologique, puis dans les alvéoles d'une plaque jetable posée sur le rhéuscope, mélanger.          |                 |                 |                 |                 |                 |
|  | Sérum à tester  | 1 goutte (50µL) | 1 goutte (50µL) | 1 goutte (50µL) | -               | -               |
|  | Sérum anti-D (IgG)  | -               | -               | -               | 1 goutte (50µL) | 1 goutte (50µL) |
| Homogénéiser, incuber 1h à 37°C puis centrifuger 1 min à 1500-2000 tours/min<br>Remettre en suspension et observer la présence éventuelle d'agglutination. |   |                 |                 |                 |                 |                 |

Figure 84 : Techniques de réalisation d'un test enzymatique à la papaïne (146)

## 3. Interprétation des résultats :

Une agglutination révèle la présence de l'Ac correspondant à l'un des Ag présents sur les hématies testées.

- ❖ **Avec le panel de dépistage :**

-l'absence de toute agglutination signifie l'absence d'AI.

-Dans le cas contraire, la présence d'une ou plusieurs agglutination permet d'affirmer la présence d'AI qu'il faut identifier avec le panel d'hématies d'identification.

-En cas de AI présents, la comparaison obtenus avec les hématies de dépistage permet déjà de donner une orientation de diagnostic.

❖ **La lecture du panel de d'identification** : permet d'identifier le ou les AI probable(s).

Attention : l'interprétation doit aussi tenir compte du phénotype du patient. (Ex : un sujet D-, C+, c-,E+, e- ne peut pas posséder des anti-C)

L'AI identifiée est ensuite être titrée Le sérum est alors conservé par congélation en vue de titrage ultérieurs.

## Annexe 4 : Titrage des anticorps irréguliers

### A. Titration des anticorps irréguliers type IgM :

Les anticorps irréguliers peuvent être de type IgM (immun ou naturels) ou IgG.

Les Ac de type IgM sont généralement des Ac complets.

Leur mise en évidence repose alors sur une réaction d'agglutination active directe.

Ce titrage est mis en œuvre en particulier pour vérifier le titre en Ac d'un sérum test.

#### 1. Principe :

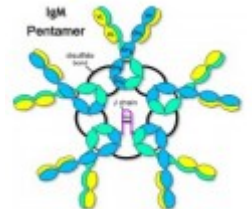
Les Ac naturels (IgM) irréguliers du système ABO sont titrés par une technique de dilution en série d'un sérum et à l'aide d'une agglutination directe active.

Le titre en Ac anti-A1 est exprimé en UI/mL. Dans ce cas, le titrage des anticorps du sérum à titrer nécessite une comparaison avec un sérum étalon de titre connu.

#### 2. Réactifs et mode opératoire (147):

##### 2.1- Réactifs et matériel :

- Suspension de globules rouges A1 à 2% en eau physiologique.



- Sérum à titrer (Sx) : 120 µL en tube à hémolyse
- Sérum étalon anti-A1 (anti-A1 étalon) : 120 µL en tube à hémolyse.  
(Le titre de ce sérum est connu et donné par l'OMS).
- Microplaque à fond conique
- Tubes à hémolyse
- Pissette d'eau physiologique
- Distributeur de particules calibrées 25µL.
- Pipette automatique.

**2.2- Mode opératoire :**

Deux titrages seront entrepris : sérum Sx et sérum étalon de titre .....UI/mL

Réaliser 2 séries de dilution : 1 série de dilution par sérum

- Dilution de base de 1 et de raison 1 / 2
- Diluant : eau physiologique.
- Volume final après dilution du sérum : 50 µL
- Volume de suspension érythrocytaire : 25 µL
- Compléter le tableau suivant

| Cupule n°                     | 1   | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8  |
|-------------------------------|-----|---|---|---|---|---|---|----|
| Diluant (µL)                  |     |   |   |   |   |   |   | 50 |
| Sérum étalon ou sérum x (µL)  |     |   |   |   |   |   |   | -  |
| Volume à redistribuer (µL)    |     |   |   |   |   |   |   | -  |
| Dilution                      | 1/1 |   |   |   |   |   |   | -  |
| Hématies A1 (µL)              | 25  |   |   |   |   |   |   | 25 |
| Lecture de la plaque S étalon | ○   | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○  |
| Résultats S étalon            |     |   |   |   |   |   |   |    |
| Lecture de la plaque Sx       | ○   | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○  |
| Résultats Sx                  |     |   |   |   |   |   |   |    |

**Figure 85 : tableau résumant les résultats retrouvés**

Recouvrir d'un parafilm et mélanger. Centrifuger 3 minutes à 1 500 rpm.

Observer les voiles d'agglutination ou les boutons de sédimentation.

Remettre en suspension par agitation. Noter la présence de voile d'agglutination ou de bouton de sédimentation.

### 3. Interprétation des résultats :

➤ Le titre d'Ac anti-IgM d'un sérum correspond à la plus grande dilution du sérum donnant encore un voile d'agglutination.

➤ Le titre en Ac anti-IgM d'un sérum peut aussi s'exprimer en UI/mL

Titre d'Ac anti-IgM en UI/mL du sérum inconnu :

$$\frac{[\text{titre étalon}]}{\text{Fd étalon}} = \frac{[\text{titre X}]}{\text{Fd X}}$$

-Ce calcule à l'aide de la formule suivante :

- sachant que le sérum étalon a un titre d'Ac anti-IgM de ..... UI/mL.

## B. Titrage des anticorps irréguliers de type IgG :

Les Ac irréguliers sont en majorité incomplets (IgG), leur mise en évidence par une réaction d'agglutination nécessite un artifice : agglutination indirecte (artificielle).



Le GBEA et les normes ISO 15189 préconisent d'utiliser le test indirect à l'antiglobuline (TIA) ou test de Coombs indirect.

### 1. Principe :

Les Ac immuns irréguliers anti-D (IgG) sont titrés par une technique de dilution en série d'un sérum et à l'aide d'une agglutination indirecte active (antiglobuline humaine).

Le titre en Ac anti-D est exprimé en UI/mL. Dans ce cas, le titrage des anticorps du sérum à titrer nécessite une comparaison avec un sérum étalon de titre connu

## 2. Réactifs et mode opératoire (148):

### 2.1- Réactifs et matériels :

- Suspension de globules rouges O Rh+ à 2% en eau physiologique.
- Sérum du patient à titrer (Sx) : 120 µL en tube à hémolyse
- Sérum étalon anti-D (anti-D étalon) : 120 µL en tube à hémolyse.

(Le titre de ce sérum est connu et donné par l'OMS).

- Anti-globuline humaine (AGH)
- Microplaque à fond conique
- Tubes à hémolyse
- Pissette d'eau physiologique
- Distributeur de particules calibrées 25µL.
- Pipette automatique.

### 2.2- Mode opératoire :

Réaliser une série de dilution du sérum à tester de base de 1 et de raison  $\frac{1}{2}$

- Diluant : eau physiologique.

- Volume final après dilution du sérum : 50 µL

→ Compléter le tableau suivant

|  |     |   |   |   |   |   |   |    |    |    |
|--|-----|---|---|---|---|---|---|----|----|----|
| Cupule n°  | 1   | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8  | 9  | 10 |
| Diluant (µL)   |     |   |   |   |   |   |   | 75 | 50 | 50 |
| Sérum sérum x (µL)   |     |   |   |   |   |   |   | -  | 50 | -  |
| Volume à redistribuer (µL)   |     |   |   |   |   |   |   | -  | -  | -  |
| Dilution   | 1/1 |   |   |   |   |   |   |    |    | -  |
| Hématies Rh+ (µL)  | 25  |   |   |   |   |   |   | 25 | 25 | 25 |
| Recouvrir d'un parafilm. Agiter 1 min et incuber à 37°C pendant 20 min.  |     |   |   |   |   |   |   |    |    |    |
| AGH (µL)   | 50  |   |   |   |   |   |   | -  | -  | 50 |
| Recouvrir d'un parafilm et mélanger. Centrifuger 3 minutes à 1 500 rpm. Observer les voiles d'agglutination ou les boutons de sédimentation. |     |   |   |   |   |   |   |    |    |    |

Figure 86 : tableau résumant les résultats retrouvés

### 3. Intérprétation des résultats :

➤ Le titre d'Ac anti-IgG d'un sérum correspond à la plus grande dilution du sérum donnant encore un voile d'agglutination.

➤ Le titre en Ac anti-IgG d'un sérum peut aussi s'exprimer en UI/mL

Titre d'Ac anti-IgG en UI/mL du sérum inconnu :

$$\frac{[\text{titre étalon}]}{\text{Fd étalon}} = \frac{[\text{titre X}]}{\text{Fd X}}$$

-Ce calcule à l'aide de la formule suivante :

- sachant que le sérum étalon a un titre d'Ac anti-IgG de ..... UI/mL

## Annexe 5 : Bases génétiques et immunologiques du système kell

### ❖ Bases génétiques :

Les antigènes Kell sont codés par un locus localisé sur le bras long du chromosome 7 (149) et sont transmis selon un mode autosomal dominant. Le polymorphisme des antigènes KELL résulte le plus souvent de la substitution d'un nucléotide qui aboutit à la substitution d'un acide aminé. Le polymorphisme entre KEL1 et KEL2 est dû à une substitution de C-T au niveau de l'exon 6.

### ❖ Bases immunologiques :

#### - Les antigènes Kell :

Le système Kell ne se limite pas à ces deux antigènes. C'est un système complexe de pseudo-allèles.

Il est constitué de 36 antigènes :(Faible fréquence, Haute fréquence)

|      |      |                 |                 |      |                 |                 |                 |      |      |      |      |
|------|------|-----------------|-----------------|------|-----------------|-----------------|-----------------|------|------|------|------|
| 001  | 002  | 003             | 004             | 005  | 006             | 007             | 010             | 011  | 012  | 013  | 014  |
| K    | k    | Kp <sup>a</sup> | Kp <sup>b</sup> | Ku   | Js <sup>a</sup> | Js <sup>b</sup> | Uj <sup>a</sup> | K11  | K12  | K13  | K14  |
| 016  | 017  | 018             | 019             | 020  | 021             | 022             | 023             | 024  | 025  | 026  | 027  |
| K16  | K17  | K18             | K19             | Km   | Kp <sup>c</sup> | K22             | K23             | K24  | VLAN | TOU  | RAZ  |
| 028  | 029  | 030             | 031             | 032  | 033             | 034             | 035             | 036  | 037  | 038  | 039  |
| VONG | KALT | KTIM            | KYO             | KUCI | KANT            | KASH            | KELP            | KETI | KHUL | KYOR | KEAL |

**Figure 87:** Les différents antigènes du système Kell

Les antigènes Kell dont l'expression se trouve restreinte à la lignée érythrocytaire, sont bien développés à la naissance.

Ils ne sont pas exclusivement présents sur les globules rouges, ils sont également présents dans la moelle osseuse, le foie fœtal, les testicules, le cerveau, le cœur... Ils se développent sur les globules rouges dès la 10<sup>ème</sup> semaine chez le fœtus pour le Kell et dès la 7<sup>ème</sup> semaine pour le cellano. Ils sont donc très bien développés à la naissance.

Ces antigènes sont résistants aux traitements à la papaine ou la trypsine; par contre, ils sont détruits par le DTT.

- K (KEL1) et k (KEL2) : ces deux antigènes sont antithétiques. L'antigène Kell est peu présent sur les globules rouges : 2 à 6000 sites, ce qui conduit à des réactions qui peuvent être faibles avec les anticorps monoclonaux.
- Kpa (KEL3) et Kpb (KEL4) : ces deux antigènes sont antithétiques.
- Ku (KEL5) : antigène public absent seulement chez les K0.
- Jsa (KEL6) et Jsb (KEL7) : ces deux antigènes sont antithétiques.
- K11 (KEL11) et K17 (KEL17) : ces deux antigènes sont antithétiques.
- K14 et K24 : ces deux antigènes sont antithétiques.

– **Les anticorps Kell :**

Les anticorps anti-Kell résultent généralement d'une allo-immunisation par transfusion sanguine. Ce sont des IgG, L'anti-K est le plus fréquent et aussi le plus dangereux.

**Anti-KEL1 et anti-KEL2**

Ces anticorps proviennent d'une immunisation à la suite d'une transfusion sanguine ou d'une grossesse. L'anti-KEL1 est le deuxième anticorps le plus observé après l'anti-RH1, ce qui traduit une forte immunogénicité; alors que l'anti-k est très peu immunogène. L'anti-KEL1 et l'anti-KEL2 sont plus fréquemment de classe IgG qu'IgM. Ces anticorps peuvent activer la fixation du complément jusqu'à la fraction C3.

L'anti-KEL1 apparait quelques fois de façon naturelle, à la suite d'une infection bactérienne (*Mycobacterium tuberculosis*, *Enterococcus faecalis*, *Morganella morganii*, *Escherichia coli*).

#### Anti-KEL3 et anti-KEL4

Ces anticorps apparaissent à la suite d'une transfusion sanguine. L'anti-KEL3 est exclusivement de classe IgG et l'apparition de cet anticorps est peu fréquente. L'anti-KEL4 est tout aussi rare, mais du fait de la faible prévalence du phénotype KEL:-4. Cet anticorps est de classe IgG et rarement de classe IgM.

L'anti-KEL3 apparaît quelques fois de façon naturelle, à la suite d'une infection bactérienne (*Mycobacterium tuberculosis*, *Enterococcus faecalis*, *Morganella morganii*, *Escherichia coli*).

#### Anti-KEL6 et anti-KEL7

Ces anticorps sont essentiellement observés chez les patients d'origine afro-antillaise. L'anti-KEL6 est le plus souvent de classe IgG (quelques cas de classe IgM ont été décrits), alors que l'anti-KEL7 est exclusivement de type IgG. Un cas d'auto anti-KEL6 a été décrit chez une femme japonaise.

Les anticorps anti-K sont immuns et dangereux, En cas de transfusion de globules rouges incompatibles, ces anticorps conduisent à des réactions transfusionnelles modérées (anti-Kpa, anti-Jsa, anti-Jsb) à sévères avec hémolyse (anti-K, anti-k, anti-Kpb). Ces anticorps sont aussi à l'origine de Maladie Hémolytique du Nouveau-Né (MHNN) souvent modérée, mais qui peut être plus sévère et même conduire à la mort in utero. Ceci justifie de respecter aussi souvent que possible le phénotype Kell, comme le phénotype Rhésus, en particulier chez les femmes avant la ménopause et chez les sujets polytransfusés.



## Résumé

La transfusion sanguine est un acte thérapeutique qui consiste à administrer le sang, ou l'un de ses composants cellulaires ou plasmatiques, d'un ou plusieurs sujets sains appelés "donneurs" vers un sujet malade appelé "receveur".

La sécurité transfusionnelle est assurée par une maîtrise de toutes les étapes de la chaîne transfusionnelle depuis la collecte de sang, sa préparation et sa qualification biologique jusqu'à la réalisation de l'acte transfusionnel et même le suivi des receveurs.

La base de la sécurité immuno-hématologique est la compatibilité entre les caractéristiques érythrocytaires du donneur et celles du receveur.

Sur le plan immuno-hématologique, l'ensemble des antigènes présents à la surface des hématies d'un individu déterminent le phénotype érythrocytaire. Seul un nombre limité d'antigènes érythrocytaires composant ce phénotype érythrocytaire est recherché en pratique courante.

Seule une parfaite connaissance des données immuno-hématologiques phénotypiques et moléculaires des donneurs et des receveurs permettra de déterminer le périmètre véritable de la sécurité transfusionnelle.

Sur ce, notre travail à porter sur la praticabilité des examens immuno hématologiques en transfusion sanguine ainsi qu'en dehors de la TS, au sein du CTS de l'HMA de Marrakech, et proposer des recommandations pour une meilleure pratique.

Les champs d'application concernent les analyses d'immuno-hématologie érythrocytaire suivantes :

- Des examens immuno-hématologiques réalisés systématiquement :
  - Le groupage ABO-RH1 (RhD) ;
  - Le phénotypage étendu RH-KEL 1 (Rh-K) ;

- La recherche d'anticorps anti-érythrocytaires (RAI) ;
- L'épreuve directe de compatibilité au laboratoire ;
- Des examens immuno-hématologiques non systématiques :
  - Le phénotypage élargi à d'autres systèmes (KEL 2 ; MNS ; Lutheran ; Lewis ; Kidd ; Duffy ...) ;
  - Le test direct à l'antiglobuline (TDA) : Test de coombs direct ;
  - Le test indirect à l'antiglobuline (TIA) : Test de coombs indirect ;

Cependant, le système transfusionnel de l'hôpital militaire Avicenne de Marrakech (HMA) connaît encore un manque en matière de nouvelles techniques ayant fait leurs preuves dans le développement de ce domaine ; à citer :

- Elution ;
- Adsorption ;
- Typage d'histocompatibilité HLA ;
- Recherche des anticorps antiplaquettaire : HPA ;
- Biologie moléculaire : par amplification génique (PCR) à partir d'ADN génomique, en particulier lorsque l'hémagglutination montre ses limites dans le cadre de la médecine transfusionnelle.

A la lumière de ce travail, une liste de recommandation a été proposée sous forme d'un guide pour tout praticien afin d'assurer une meilleure sécurité immuno-hématologique, devant les différentes situations envisagées lors de la pratique quotidienne, en se basant sur les données de littérature.

## Abstract

Blood transfusion is a therapeutic act by administering blood or one of its cellular and plasma components, one or more healthy subjects called "donors" to an ill person called "recipient.

Blood safety is ensured by controlling all stages of the transfusion chain from collection of blood, its preparation and biological qualification to the completion of the transfusion act and even the monitoring of recipients.

The base of the immuno-hematology security compatibility between erythrocyte characteristics of the donor and those of the recipient.

The immuno-haematological, all antigens present on the surface of red blood cells of an individual erythrocyte determine the phenotype. Only a limited number of cell antigens comprising this erythrocyte phenotype is wanted in common.

Only a thorough knowledge of phenotypic immuno-hematology and molecular data of donors and recipients will determine the true scope of blood safety.

On this, our work to bear on the practicability of immuno hematological examinations in blood as well as outside of the blood transfusion in the BTC HMA Marrakech, and propose recommendations for best practice.

The fields of application relate to analyzes immunoematology erythrocyte following:

- Immuno-hematological examinations systematically:
  - The ABO-RH1 (Rh);
  - Phenotyping extended KEL RH-1 (Rh-K);
  - The search for red cell antibodies (RAI);
  - The cross-matching to the laboratory;

- Immuno-hematological non-systematic reviews:
  - The extended phenotype to other systems (KEL 2, MNS, Lutheran, Lewis, Kidd, Duffy ...);
  - The direct antiglobulin test (DAT): Direct Coombs Test;
  - Indirect antiglobulin test (IAT): Indirect Coombs test;

However, the transfusion system to the Marrakesh Avicenna military hospital (HMA) is still experiencing a shortage in new techniques proven in the development of this field; to quote:

- Elution;
- Adsorption;
- Typing HLA histocompatibility;
- Search for antiplatelet antibody HPA;
- Molecular biology by gene amplification (PCR) from genomic DNA, especially when hemagglutination shows its limits in the context of transfusion medicine.

In the light of this work, a recommendation list has been proposed as a guide for any practitioner to ensure better security immuno-hematology, before the various situations envisaged in the daily practice, based on literature.

## ملخص

تحاقن الدم هو علاج يحت على نقل الدم أو أحد المكونات الخلوية والبلازما من شخص واحد أو عدة اشخاص اصحاء يلقبون ب" المانحين " لشخص مريض يدعى " المتلقي".

تكفل سلامة الدم عن طريق التحكم في جميع مراحل سلسلة نقل من جمع الدم، وإعداد وتأهيل البيولوجي إلى الانتهاء من عمل نقل الدم وحتى رصد المستفيدين.

قاعدة السلامة المنعائية تكمن في مدى التوافق الدموي المنعائي بين خصائص كرات الدم الحمراء من الجهات المانحة وتلك للمتلقي.

فقط المعرفة الوافية للمعطيات الدموية المناعية المظهرية والبيانات الجزيئية من المانحين والمتلقين سيحدد المدى الحقيقي للسلامة الدم.

على هذا، عملنا على تاطير طريقة تنفيذ التحاليل الدموية المنعائية في اطار تحاقن الدم وكذلك خارج اطاره على مستوى مركز تحاقن الدم للمستشفى العسكري بمراكش، واقتراح توصيات لممارسات افضل.

مجالات التطبيق تتعلق بالتحاليل الدموية المنعائية التالية:

➤ تحاليل مطلوبة بشكل منهجي :

- جهاز ABO-RH1
- النمط الظهري 1-KEL RH
- البحث عن الأجسام المضادة الخلايا الحمراء (RAI)
- وعبر مطابقة للمختبر.

➤ تحاليل مطلوبة بشكل غير منهجي:

- النمط الظاهري الممتد إلى أنظمة أخرى 2، MNS، Lutheran ...
- اختبار أضداد الغلوبولين المباشر: (DAT) اختبار كومبس المباشر
- اختبار أضداد الغلوبولين غير مباشر: (IAT) اختبار كومبس الغير مباشر

ومع ذلك، فإن النظام الذي يعمل به مركز تحاقن الدم نقل بالمستشفى العسكري ابن سينا بمراكش لا يزال يعاني من نقص في التقنيات الجديدة التي اثبتت جدارتها في تطوير هذا الميدان؛ على حد التعبير:

- تقنية الشطف
- تقنية الامتزاز.
- كتابة التوافق النسيجي HLA .
- البحث عن صفيحات الأجسام المضادة HPA .
- البيولوجيا الجزيئية عن طريق التضخيم الجينات (PCR) عبر الحمض النووي الجيني، وخصوصا عندما يظهر التراص حدوده في سياق الطب تحاقن الدم.

في ضوء هذا العمل، وقد تم اقتراح قائمة توصية كدليل لأي ممارس لضمان أمن و سلامة دموية منعاية أفضل، امام مختلف الحالات التي يمكن مجابتهها في الممارسة اليومية، استنادا إلى المعطيات العلمية.



**BIBLIOGRAPHIE**



1. **ABDELLAOUI K.**  
Evaluation des connaissances sur la pratique de la transfusion sanguine à l'hôpital militaire My Ismail de Meknès.  
Faculté de Médecine et de Pharmacie de Fès, 2018.Thèse:N°110.P:30
2. **SKALLI S.**  
Le bilan immuno-hématologique pré-transfusionnel.  
Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat, 2018.Thèse:N°:347. P:19.
3. **Wikipédia.**  
Immuno-hématologie, 2018.  
Disponible sur: <https://fr.wikipedia.org/w/>
4. **Labosud Biologie.**  
Immuno-hématologie. Expertise Biologique et Proximité Médicale, 2020.  
Disponible sur: <https://labosud.fr/nos-expertises/immuno-hematologie/>
5. **Danic B.**  
La sélection des donneurs de sang et la sécurité transfusionnelle.  
Revue française des laboratoires, 2003;355:8-74. P:29-32.  
Disponible sur: <https://www.em-consulte.com/en/article/191931>
6. **CHAKOURI A.**  
Plasma thérapeutique : Préparation et indications.  
Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat, 2019.Thèse:N°:324. P: 2.
7. **Lefrère J-J, Rouger P.**  
Transfusion sanguine.5<sup>ème</sup> édition. Elsevier-Masson, 2015.428p.
8. **Arrêté du 26 avril 2002 modifiant l'arrêté du 26 novembre 1999 relatif à la bonne exécution des analyses de biologie médicale.**  
Journal officiel 2002, 26 avril.
9. **Le petit juriste.**  
Le don du sang pour les homosexuels, une ouverture sous conditions, 2016.  
Disponible sur: <https://www.lepetitjuriste.fr/don-sang-homosexuels-ouverture-conditions/>

**10. Dinh A, Eliason K, Dzik W.**

Time interval between antibody investigations among patients who demonstrate serial red cell antibody formation.

Transfusion, 2019.vol :59 (2) p. 738-743.

**11. singhal et al.**

Red Cell Alloimmunization Is Associated With Development of Autoantibodies and Increased Red Cell Transfusion Requirements in Myelodysplastic Syndrome.

Haematologica, 2017 Dec; 102(12):2021–2029.

**12. MONCHARMONT P.**

Faut-il poursuivre la recherche de l'antigène HBs en qualification biologique du don ?

Société Française de Transfusion Sanguine. Revue de presse N°26, 2019. P:2.

Disponible sur: <https://www.sfts.asso.fr/association/revue-de-presse-26>

**13. M.Benkirane, R. Hedef, H. Zahid, M. Naji.**

Transfusion sanguine au Maroc : expérience du CTS de l'hôpital militaire de Rabat.

Transfusion clinique et biologique 12 (2005) 11–17.

**14. J. Chiaroni, V. Ferrera, I. Dettori, F. Roubinet.**

Groupes sanguins érythrocytaires.

EMC–Hématologie, 2005;2:1–41 [article 13–000–R–50].

**15. EL KHABOUS S.**

La prévalence des phénotypes des systèmes ABO, RH et KELL chez 10000 donneurs au CTS HMIM–5 Rabat (Maroc).

Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat, 2018.Thèse:N°:06. P: 8.

**16. Litwin SD.**

Human Immunogenetics: Basic Principles and Clinical Relevance.

CRC Press; 1989. 856 p.

**17. SKALLI Sara**

Le bilan immuno–hématologique pré–transfusionnel.

Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat, 2018.Thèse:N°:347. P:24.

**18. Peyrard T, Pham B.–N, Le Pennec P.–Y, Rouger P.**

Les phénotypes érythrocytaires rares : un enjeu de santé publique.

Transfusion Clinique et Biologique, 2008;15:109-119.

**19. Aymard J. -P.**

Karl Landsteiner (1868-1943) et la découverte des groupes sanguins.  
Transfusion Clinique et Biologique, 2012;19:244-248.

**20. EL KHABOUS Saida**

La prévalence des phénotypes des systèmes ABO, RH et KELL chez 10000 donneurs au CTS HMIM-5 Rabat (Maroc).  
Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat, 2018. Thèse: N°:06. P:20.

**21. Koffi N, Sidoine K, Rodrigue KD.**

Recherche des difficultés de groupage sanguin ABO dans la leucémie aiguë à Abidjan  
ABO Blood Typing Difficulties in Acute Leukemia at Abidjan,  
Rev Int sc méd Abj, 2019; 21, 1:28-31.

**22. V. Ferrera, D. Legrand, J. Chiaroni.**

L'immuno-hématologie des receveurs de sang : quels tests utiles? Hematol, 2008;14(2) :143-50.

**23. Chiaroni J.**

Les bonnes pratiques d'immunohématologie clinique.  
Transfusion Clinique et Biologique, 2003;10:244-251.

**24. Jacques C, Francis R, Pascal B.**

Groupage sanguin ABO-RH1.  
Les analyses immunohématologiques et leurs applications cliniques.  
John Libbey Eurotext, 2012. 324 p. P: 37.

**25. Mannesier L.**

La surveillance immunohématologique de la femme enceinte et la nouvelle politique de prévention de l'allo-immunisation anti-RH1.  
Transfusion Clinique et Biologique, 2007;14:112-119.

**26. Issitt P, Crookston M.**

Blood group terminology: current conventions.  
Transfusion, janv 1984; 24(1):2-7.

**27. DANAOU K.**

Prévalence des phénotypes RhD sur les dons de sang. La qualification biologique du don du sang : Expérience de l'Hôpital Militaire Avicenne de Marrakech.

Faculté de Médecine et de Pharmacie de Marrakech, 2019;Thèse:N°:64.P: 20.

**28. DANAOUI K.**

Prévalence des phénotypes Rh étendu sur les dons de sang effectués au CTS de l'HMA de Marrakech. La qualification biologique du don du sang : Expérience de l'Hôpital Militaire Avicenne de Marrakech.

Faculté de Médecine et de Pharmacie de Marrakech, 2019.Thèse:N°:64.P: 20.

**29. Peyrard T.**

Les variants des gènes RHD et RHCE : aspects moléculaires et intérêt clinique.  
Transfusion Clinique et Biologique, 2019;26:12.

**30. Caine ME, Mueller-Heubach E.**

Kell sensitization in pregnancy.  
Am J Obstet Gynecol, 1986.154 :85-90.

**31. Marsch WL, Redman CM.**

The Kell blood group system: A review.  
Transfusion, 1990.30 :158-67.

**32. Wiener AS.**

Hemolytic reactions following transfusions of blood of the homologous groupe. II. Further observations on the role of rh, particularity in cases without desmonstrale iso-antibodies.  
Arch path, 1941.32 : 227.

**33. Wiener AS.**

Blood groups and transfusions, 3rd ed. Springfield, Illinois : CC Thomas, 1943.

**34. Levine P, Burnham L, Katzin EM, Vogel O.**

The role of iso-immunization in the pathogenesis of erythroblastosis fetalis.  
Am J Obstet Gynec, 1941.42 : 925-37.

**35. Mourant AE.**

A new human blood group antigen of frequent occurrence. Nature, 1946.158 : 237.

**36. Coombs RRA, Mourant AE, Race RR.**

In vivo sensitization of red cells in babies with haemolytic disease. Lancet, 1946 .1: 264.

**37. Jacques C, Francis R, Pascal B.**

Phénotypage RH-KEL1. Les analyses immunohématologiques et leurs applications cliniques.

John Libbey Eurotext, 2011. 343 p. P:51.

**38. Jacques C, Francis R, Pascal B.**

Exigences réglementaires. Les analyses immunohématologiques et leurs applications cliniques. John Libbey Eurotext; 2011. 343 p. P: 52.

**39. Haute Autorité de Santé.**

Transfusions de globules rouges homologues : produits, indications, alternatives, 2020.  
Disponible sur: [https://www.has-sante.fr/jcms/c\\_1349939/fr/transfusions-de-globules-rouges-homologues-produits-indications-alternatives](https://www.has-sante.fr/jcms/c_1349939/fr/transfusions-de-globules-rouges-homologues-produits-indications-alternatives)

**40. A. Lal et al.**

« Transfusion practices and complications in thalassemia: Transfusion practices and complications in thalassemia »,  
Transfusion, 2018;58(12):2826–2835.

**41. Muller Chantall.**

Recherche des anticorps irréguliers, généralités. Livret 4 d'activités technologiques. Immuno-hématologie, 2012. P: 44.

**42. Bioforma.**

Conditions de réalisation d'une RAI.  
Cahier de formation Bioforma. Immuno-hématologie et groupes sanguins, 2002.N° 26. P: 112.

**43. Muller Chantall.**

La recherche des agglutinines irrégulières. Livret 4 d'activités technologiques. Immuno-hématologie, 2012. P: 66.

**44. Muller Chantall.**

Ag érythrocytaires. Livret 4 d'activités technologiques. Immuno-hématologie, 2012. P: 67.

**45. Leblanc R-M.**

Les examens d'immuno-hématologie de la femme enceinte. Option/Bio, 2016; 27:553–554.  
P:21–26

**46. MIQUEL E., CAVALIER B., BONNEAU J.C., ROUGER P.**

Incompatibilité foeto-maternelles érythrocytaires : de la surveillance immuno-hématologique des femmes enceintes à la maladie hémolytique du nouveau-né.  
Transfus. Clin. Biol., 2005;12:45–55.

47. **MANNESSIER L.**  
Suivi de l'allo-immunisation foeto-maternelle.  
Transfus. Clin. Biol., 2003;10:258-262.
48. **Courbil R, Quaranta J-F.**  
Prescrire en toute sécurité les produits sanguins labiles: guide pratique et textes de référence.  
Heures de France; 1999. 268 p.
49. **Mannessier L, Roubinet F, Chiaroni J.**  
Aide à la décision en immunohématologie-Epreuve directe de compatibilité au laboratoire.  
Transfus Clin Biol ,2001.8 : 481-4.
50. **Jacques C, Francis R, Pascal B.**  
Les grandes étapes de l'ECDL. Les analyses immunohématologiques et leurs applications cliniques.  
John Libbey Eurotext; 2011. 343 p. P: 102.
51. **Giri D.**  
Cross Matching : Types, Principe, Procedure and Interpretation. Hématologie-immunologie.  
Laboratorytests, 2019.  
Disponible sur: <http://laboratorytests.org/cross-matching/>
52. **Jacques C, Francis R, Pascal B.**  
Interprétation des résultats de l'ECDL. Les analyses immunohématologiques et leurs applications cliniques. John Libbey Eurotext; 2011. 343 p. P: 110
53. **Jacques C, Francis R, Pascal B.**  
Epreuve de compatibilité directe au laboratoire.  
Les analyses immunohématologiques et leurs applications cliniques.  
John Libbey Eurotext; 2011. 343 p. P: 111.
54. **Muller Chantall.**  
Phénotype étendu. Livret 4 d'activités technologiques. Immuno-hématologie, 2012. P: 41.
55. **Chaventré A.**  
Les Kel-Kummer et leurs apparentés. Evolution Anthropo-Biologique d'une Population Touaregue Institut National D'études Démographiques, 1983.103:365. P:192.

- 56. Bioforma.**  
Système FY. Cahier de formation Bioforma.  
Immuno-hématologie et groupes sanguins, 2002.N°26.P: 98.
- 57. Arrêté du 15 mai 2018 fixant les conditions de réalisation des examens de biologie médicale d'immuno-hématologie érythrocytaire.**  
Journal officiel, 2018 15 Mai.
- 58. Bio-Rad**  
Products for Life Science Research & Clinical Diagnostics, 2020.  
Disponible sur: <https://www.bio-rad.com/>
- 59. Jacques C, Francis R, Pascal B.**  
Phénotype étendu. Les analyses immunohématologiques et leurs applications cliniques.  
John Libbey Eurotext; 2011. 343 p. P: 60.
- 60. Muller Chantall.**  
Test directe à l'antiglobuline. Livret 4 d'activités technologiques.  
Immuno-hématologie, 2012. P: 61.
- 61. Muller Chantall.**  
Etapas du déroulement du TDA. Livret 4 d'activités technologiques.  
Immuno-hématologie, 2012. P: 62.
- 62. AYAD N.**  
Prévalence des groupes sanguins au centre de transfusion sanguine à l'HMA Marrakech (à propos de 10 000 cas). Faculté de Médecine et de Pharmacie de Marrakech, 2019.Thèse:N°:87. P:13.
- 63. Muller Chantall.**  
Mode opératoire du TDA. Livret 4 d'activités technologiques.  
Immuno-hématologie, 2012. P: 64.
- 64. Bioforma.**  
Indications d'un TDA. Cahier de formation Bioforma.  
Immuno-hématologie et groupes sanguins, 2002. N° 26.P: 16.
- 65. Le monde en images.**  
Test indirect à l'antiglobuline humaine. Immunohématologie.Le monde en images, 2020. P:74.  
Disponible sur: <http://monde.ccdmd.qc.ca/ressource/?id=55920>

66. **Muller Chantall.**  
Test indirect à l'antiglobuline. Livret 4 d'activités technologiques.  
Immuno-hématologie, 2012. P: 51.
67. **Muller Chantall.**  
Etapas du déroulement du TIA. Chapitre2 .Livret 4 d'activités technologiques.  
Immuno-hématologie, 2012. P: 52.
68. **Muller Chantall.**  
Mode opératoire du TIA. Livret 4 d'activités technologiques.  
Immuno-hématologie, 2012. P: 54.
69. **Toutsurlatransfusion.**  
Les techniques de RAI. Laboratoire d'immuno-hématologie possède, 2020.  
Disponible sur: <https://www.toutsurlatransfusion.com/immuno-hematologie/recherche-anticorps/techniques.php>
70. **Bio-Rad**  
IH-500 System. Clinical Diagnostics, 2020.  
Disponible sur: <https://www.bio-rad.com/en-ma/product/ih-500-system?ID=NPUFID15>
71. **Bio-Rad.**  
Automate IH-500, 2020.  
Disponible sur: <https://www.diagnostics-bio-rad.com/>
72. **Amira Sarraj.**  
TDA et elution : 2 partenaires indissociables.  
Service Régional Neuchâtelois et Jurassien de Transfusion Sanguine CRS, 2018. P: 13.
73. **Burin des Roziers N. , Squalli S.**  
Removing IgG antibodies from intact red cells: comparison of acid and EDTA, heat, and chloroquine elution methods.  
Transfusion, 1997; 37 (5):497-501.
74. **Jacques C, Francis R, Pascal B.**  
Elution.Les analyses immunohématologiques et leurs applications cliniques.  
John Libbey Eurotext, 2011. 343 p. P: 87.
75. **Johnson S, Wilson S, Rudmann S.**  
Serologic problem-solving strategies : a systematic approach.

Arlington : AABB Pres, 1996.

**76. Jacques C, Francis R, Pascal B.**

Milieu acide, liaison Ag-AC et élution. Les analyses immunohématologiques et leurs applications cliniques. John Libbey Eurotext, 2011. 343 p. P: 88.

**77. Jacques C, Francis R, Pascal B.**

Méthode de réalisation de l'élution à la chaleur. Les analyses immunohématologiques et leurs applications cliniques. John Libbey Eurotext, 2011. 343 p. P: 269.

**78. Jacques C, Francis R, Pascal B.**

Digitonine acide et élution. Les analyses immunohématologiques et leurs applications cliniques. John Libbey Eurotext, 2011. 343 p. P: 287.

**79. Jacques C, Francis R, Pascal B.**

Indications de l'élution. Les analyses immunohématologiques et leurs applications cliniques. John Libbey Eurotext, 2011. 343 p. P: 89.

**80. Roback JD, Combs M , Grossman B , Hilyer C.**

AABB Technical manual, 16 th ed. Bethesda : AABB, 2008.

**81. Petz L, Garratty G.**

Immune hemolytic anemias, 2 nd ed. Oxford : Churchill Livingstone, 2004.

**82. Jacques C, Francis R, Pascal B.**

Critères de sélection des hématies adsorbantes. Les analyses immunohématologiques et leurs applications cliniques. John Libbey Eurotext, 2011. 343 p. P: 96.

**83. Leger RM, Garratty G.**

Evaluation of methods for detecting alloantibodies underlying warm autoantibodies. Transfusion, 1999 ; 39 : 11-6.

**84. Barron CL, Brown MB.**

The use of polyethylene glycol (PEG) to enhance the adsorption of autoantibodies. Immunohematology, 1997; 13 : 119-22.

**85. Judd WJ, Dake L.**

PEG adsorption of autoantibodies causes loss of concomitant alloantibody. Immunohematology, 2001 ; 17 : 82-5.

**86. Cheng CK, Wong ML, Lee AW.**

PEG adsorption of autoantibodies and detection of alloantibodies in warù autoimmune hemolytic anemia.

Transfusion, 2001 ; 41 : 13-7.

**87. Cid J, Ortin X, Pinacho A, Parra R, Contreras E, Elies E.**

Use of polyethylene glycol for performing autologous adsorptions.

Transfusion, 2005 ; 45 : 694-7.

**88. Branch DR, Petz LD.**

A new reagent (ZZAP) having multiple applications in immunohematology.

Am J Clin Pathol, 1982 ; 78 : 161-7.

**89. Jacques C, Francis R, Pascal B.**

Etapes de réalisation d'adsorption. Les analyses immunohématologiques et leurs applications cliniques. John Libbey Eurotext, 2011. 343 p. P: 284.

**90. Chiaroni J, Gouvitsos J, Dettori I, Ferrera V.**

How do we...Evaluate panagglutinating sera.

Transfusion, 2009 ; 49 : 1540-5.

**91. Jacques C, Francis R, Pascal B.**

Adsorption. Les analyses immunohématologiques et leurs applications cliniques. John Libbey Eurotext, 2011. 343 p. P: 94.

**92. Moalic V.**

Comment est réalisé un typage HLA ? Réanimation, juin 2008 ; 17(4):407-11.

**93. Société canadienne d**

Typage des antigènes d'histocompatibilité (HLA), 2020.

Disponible sur: <https://www.cancer.ca:443/fr-ca/cancer-information/diagnosis-and-treatment/tests-and-procedures/human-leukocyte-antigen-hla-testing/?region=mb>

**94. Eurofins Biomnis**

HLA de classe I – Génotypage HLA-A et HLA-B – sang total | Référentiel des examens, 2020.

Disponible sur: <https://www.eurofins-biomnis.com/en/english-news/>

**95. Christophe Baudouin, Patrick Atta, Alexandre Denoyer, Laurence Desjardins, Vassiliki Iordanidou, Christophe Orssaud et al.**

Un cas d'association de chorioretinopathie de type Birdshot et de toxicité rétinienne du tamoxifène. Journal français d'ophtalmologie, 2000; 23, 5: 494-497.

96. **Gueudry J, Muraine M.**  
Uvéites antérieures.  
Journal français d'ophtalmologie. EMC-Ophtalmologie 2017:1-13.
97. **Khairallah M, Yahia SB, Kahloun R, Khairallah-Ksiaa I, Messaoud R.**  
Œil et maladie de Behçet.  
Journal français d'ophtalmologie, 2018; 42,6:626-641.
98. **Cesbron-Gautier A, Gagne K, Retière C, Devys A, Bignon JD.**  
Système HLA. EMC, Hematologie, 2007. 13-000-M-53.
99. **Terasaki Pi, Mac Clelland JD.**  
Microdroplet assay of human serum cytotoxins.  
Nature, 1964. 204:998-1000.
100. **Vartdal F, Gaudernack G, Funderud S, Bratlie A, Lea T, Ugelstad J, et al.**  
HLA class I and II typing using cells positively selected from blood by immunomagnetic isolation – a fast and reliable technique.  
Tissue Antigens, 1986. 28:301-12.
101. **Vosberg HP.**  
The polymerase chain reaction: an improved method for the analysis of nucleic acids.  
Hum Genet, 1989.83:1-15.
102. **Olerup O, Zetterquist H.**  
HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 h: an alternative to serological DR typing in clinical practice including donorrecipient matching in cadaveric transplantation.  
Tissue Antigens, 1992.39:225-35.
103. **Scharf SJ, Griffith RL, Erlich HA.**  
Rapid typing of DNA sequence polymorphism at the HLA-DRB1 locus using the polymerase chain reaction and nonradioactive oligonucleotide probes.  
Hum Immunol, 1991.30:190-201.
104. **Erlich HA, Opeltz G, Hansen J.**  
HLA DNA typing and transplantation. Immunity, 2001.14:347-56.
105. **ETABLISSEMENT FRANCAIS DU SANG ALSACE LORRAINE CHAMPAGNE ARDENNE.**  
Histocompatibilité LBM Alsace EFS ALCA. Liste des analyses d'Histocompatibilité du LBM multisite Alsace de l'EFS ALCA – Version 12. (Chapitre 5-03, 7-03 et 14 NABM).

**106. ETABLISSEMENT FRANCAIS DU SANG ALSACE LORRAINE CHAMPAGNE ARDENNE.**

Conditions de prélèvement et indications médicales.

Liste des analyses d'Histocompatibilité du LBM multisite Alsace de l'EFS ALCA – version 12.

**107. EFS santé**

Zoom sur... l'immunologie plaquettaire, 11 juin 2020.

Disponible sur: <http://www.efs.sante.fr/zoom-sur-limmunologie-plaquettaire>

**108. Eurofins Biomnis.**

Anticorps anti-plaquettes fixés ou libres – dépistage et identification.

Référentiel des examens, 2020.

Disponible sur: <https://www.eurofins-biomnis.com/en/english-news/>

**109. Laboratoire d'hémostase spéciale. Hôpitaux universitaires de Genève.**

hemospé-antiplq, 2020. Disponible sur: [https://www.hug-](https://www.hug-ge.ch/sites/interhug/files/structures/gr-demande-analyse/hemospe-antiplq.pdf)

[ge.ch/sites/interhug/files/structures/gr-demande-analyse/hemospe-antiplq.pdf](https://www.hug-ge.ch/sites/interhug/files/structures/gr-demande-analyse/hemospe-antiplq.pdf)

**110. Moncharmont P, Vignal M, et al.**

La recherche des anticorps anti-plaquettes: étude de 701 dépistages positifs aspects pratiques.

Revue Française des Laboratoires, 2002;Vol 2002 N° 347 P. 67-70.

**111. Moncharmont P, Canillas S, Vignal M, Mérieux Y, Rigal D.**

La recherche des anticorps anti-plaquettes spécifiques : deux tests de dépistage sont-ils

nécessaires ? Revue Francophone des Laboratoires, 2009(412):49-51.

**112. Institut national de la transfusion sanguine.**

Laboratoire d'Immunologie Plaquettaire, 2020.

Disponible sur: <https://www.ints.fr/ImmunologiePlaquetLabo.aspx>

**113. Gilot N.**

Anticorps anti-plaquettaires. Institut de Biologie Clinique. Université Libre de Bruxelles, 2019.

Disponible sur: <https://www.ulb-ibc.be/anticorps-anti-plaquettaires/>

**114. Reid ME.**

Overview of molecular methods in immunohematology. Transfusion, 2007 ;47 :10S-6S.

**115. Storry JR, Olsson ML.**

Genetic basis of blood group diversity.

Br J Haematol, 2004 ; 126 : 759-71.

**116. Daniels G.**

The molecular genetics of blood group polymorphism.  
Transpl Immunol, 2005 ; 14 : 143-53.

**117. Reid ME, Lomas-Francis C.**

Blood group antigen factsbook, 2nd ed. San Diego : Academic Press, 2004.

**118. Strauss D, Reid ME.**

Value of DNA-based assays for donor screening and regulatory issue.  
Immunohematology, 2008 ; 24 : 175-9.

**119. Lomas-Francis C, DePalma H.**

DNA-based assays for patient testing: their application, interpretation, and correlation of results.  
Immunohematology, 2008 ; 24 : 180-90.

**120. Mannessier L.**

Follow-up of the feto-maternal allo-immunization.  
Transfus Clin Biol, 2003 ; 10 : 258-62.

**121. Daniels G.**

Blood group antibodies in haemolytic disease of the fetus and newborn.  
In : Hadley A, Soothill P, eds. Allo-immune disorders of pregnancy?  
Cambridge: Cambridge University Press, 2002 : 21-40.

**122. Lee S.**

The value of DNA analysis for antigens of the Kell and Kx blood group systems.  
Transfusion, 2007 ; 47 : 32S-9S.

**123. Colin Y, Cherif-Zahar B, Le Van Kim C, Raynal V, Van Huffel V, Cartron JP.**

Genetics basis of the RhD-positive and RhD-negative blood group polymorphism as determined by Southern analysis.  
Blood, 1991 ; 78 : 2727-52.

**124. Bennett PR, Le Van Kim C, Colin Y et al.**

Prenatal determination of fetal RhD type by DNA amplification.  
N Engl J Med, 1993; 329 : 607-10.

**125. Adinolfi M, Sherlock J, Kemp T et al.**

Prenatal detection of fetal RhD DNA sequences in transcervical samples. Lancet, 1995;345:318-9.

- 126. Kingdom J, Sherlock J, Rodeck C, Adinolfi M.**  
Detection of trophoblast cells in transcervical samples collected by lavage or cytobrush.  
Obstet Gynecol, 1995 ; 86 : 283–8.
- 127. Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF, et al.**  
Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum.  
Lancet, 1997 ; 350 : 485–7.
- 128. Nelson M, Eagle C, Langshaw M, Popp H, Kronenberg H.**  
Genotyping fetal DNA by non-invasive means: extraction from maternal plasma.  
Vox Sang, 2001 ; 80 : 112–6.
- 129. Lo Ym, Tein MS, Lau TK, et al.**  
Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum : implications for noninvasive prenatal diagnosis.  
Am J Hum Genet, 1998 ; 62 : 768–75.
- 130. Avent ND, Finning KM, Martin PG, Soothill PW.**  
Prenatal determination of fetal blood group status.  
Vox Sang, 2000 ; 78 : 155–62.
- 131. Rouillac-Le Sciellour C, Serazin V, Brossard Y et al.**  
Noninvasive fetal RhD genotyping from maternal plasma. Use of a new developed Free DNA Fetal Kit RhD.  
Transfus Clin Biol, 2007 ; 14 : 572–7.
- 132. Lo YM, Hjlem NM, Fidler C, et al.**  
Prenatal diagnosis of fetal RhD status by molecular analysis of maternal plasma.  
N Engl J Med, 1998 ; 339 : 1734–8.
- 133. Lo YM.**  
Fetal DNA in maternal plasma.  
An NY Acad Sci, 2000 ; 906 : 141–7.
- 134. Hahn S, Zhong XY, Burk MR, Troeger C, Holzgreve W.**  
Multiplex and real-time quantitative PCR on fetal DNA in maternal plasma.  
A comparison with fetal cells isolated from maternal blood. Ann NY Acad Sci, 2000 ; 906 : 148–52.
- 135. Fass BH, Beuling EA, Christiaens GC, Von Dem Borne AE, Van Der Scoot CE.**  
Detection of fetal RHD-specific sequences in maternal plasma.

Lancet, 1998 ; 352 : 1196.

- 136. Bischoff FZ, Nguyen DD, Marquez-Do D, Moise KJ Jr, Simpson JL, Elias S.**  
Noninvasive determination of fetal RhD status using fetal DNA in maternal serum and PCR.  
J Soc Gynecol Invest, 1999 ; 6 : 64-9.
- 137. Bianchi DW, Zickwolf GK, Weil GJ, Sylvester S, DeMaria MA.**  
Male fetal progenitor cells persist in maternal blood for as long as 27 years postpartum.  
Proc Natl Acad Sci USA 1996 ; 93 : 705-8.
- 138. Artlett CM, Smith JB, Jimenez SA.**  
Identification of fetal DNA and cells in skin lesions from women with systemic sclerosis.  
N Engl J Med 1998 ; 338 : 1186-91.
- 139. Westhoff CM.**  
Rh complexities: serology and DNA genotyping.  
Transfusion, 2007 ; 47: 175-225.
- 140. Minon JM, Schaaps JP, Retz MC, Dricot JF, Foidart JM, Senterre JM.**  
Prenatal determination of fetal RHD in maternal plasma : two-years experience of routine clinical use. J Gynecol obstet Biol Preprod (Paris), 2005 ; 34 : 448-53.
- 141. Minon JM, Gerard C, Senterre JM, Schaaps JP, Foidart JM.**  
Routine fetal RHD genotyping with maternal plasma: a four-years experience in Belgium.  
Transfusion, 2008 ; 48 : 373-81.
- 142. Finning K, Martin P, Summers J, Daniels G.**  
Fetal genotyping for the K (Kell) and Rh C, c and E blood groups on cell-free fetal DNA in maternal plasma.  
Transfusion, 2007 ; 47 : 2126-33.
- 143. LBM GIP INTS**  
Guide de prélèvement pour les échantillons biologiques destinés au département d'immunologie plaquettaire (LBM GIP INTS). Immunologie Plaquettaire, 2020.  
Disponible sur: [https://www.ints.fr/pdf/Immunologie/FI\\_IPLAQ\\_400\\_L.pdf](https://www.ints.fr/pdf/Immunologie/FI_IPLAQ_400_L.pdf)
- 144. Ministère de santé**  
Reglementation des pratiques médicales, 2020.  
Disponible sur: <https://www.sante.gov.ma/Reglementation/Pages/REGLEMENTATION-DES-PRATIQUES-MEDICALES.aspx>

**145. Muller Chantall.**

Recherche de l'Ag D faible et de l'Ag D partiel. Livret 4 d'activités technologiques.  
Immuno-hématologie, 2012. P: 29.

**146. Muller Chantall.**

Test enzymatique (papaine). Livret 4 d'activités technologiques.  
Immuno-hématologie, 2012. P: 58.

**147. Muller Chantall.**

Les anticorps irréguliers type IgM. Immuno-hématologie., 2012. P: 75.

**148. Muller Chantall.**

Titration des IgG. Livret 4 d'activités technologiques.  
Immuno-hématologie., 2012. P: 77.

**149. Redman C.M, Lee S.**

The Kell blood group system. Transfusion Clinique et Biologique.  
Journal de la Société Française de Transfusion Sanguine, 1995;2(4):243-249



## أُقْسِمُ بِاللَّهِ الْعَظِيمِ

أَنْ أُرَاقِبَ اللَّهَ فِي مِهْنَتِي.

وَأَنْ أَصُونَ حَيَاةَ الْإِنْسَانِ فِي كَافَّةِ أَطْوَارِهَا فِي كُلِّ الظُّرُوفِ  
وَالْأَحْوَالِ بِإِذْنِ اللَّهِ وَسَعْيِي فِي اسْتِنْقَاذِهَا مِنَ الْهَلَاكِ وَالْمَرَضِ

وَالْأَلَمِ وَالْقَلْقِ.

وَأَنْ أَحْفَظَ لِلنَّاسِ كِرَامَتَهُمْ، وَأَسْتُرَ عَوْرَتَهُمْ، وَأَكْتُمَ سِرَّهُمْ.

وَأَنْ أَكُونَ عَلَى الدَّوَامِ مِنْ وَسَائِلِ رَحْمَةِ اللَّهِ، بِإِذْنِ رِعَايَتِي الطَّبِيبَةَ لِلْقَرِيبِ وَالْبَعِيدِ،  
لِلصَّالِحِ وَالطَّالِحِ، وَالصَّدِيقِ وَالْعَدُوِّ.

وَأَنْ أَثَابِرَ عَلَى طَلْبِ الْعِلْمِ، أَسْخَرَهُ لِنَفْعِ الْإِنْسَانِ .. لَا لِأَذَاهِ.

وَأَنْ أُوقِرَ مَنْ عَلَّمَنِي، وَأُعَلِّمَ مَنْ يَصْغُرَنِي، وَأَكُونَ أَخًا لِكُلِّ زَمِيلٍ فِي الْمِهْنَةِ الطَّبِيبَةِ

مُتَعَاوِنِينَ عَلَى الْبِرِّ وَالتَّقْوَى.

وَأَنْ تَكُونَ حَيَاتِي مِصْدَاقَ إِيمَانِي فِي سِرِّي وَعَلَانِيَتِي، نَقِيَّةً مِمَّا يُشِينُهَا تَجَاهَ

اللَّهِ وَرَسُولِهِ وَالْمُؤْمِنِينَ.

وَاللَّهُ عَلَى مَا أَقُولُ شَهِيدٌ

أطروحة رقم 078

سنة 2020

## التحليل الدموي المنعائية بمركز تحاقن الدم : تجربة المستشفى العسكري ابن سينا بمراكش

### الأطروحة

قدمت ونوقشت علانية يوم 2020/ 07 /09

من طرف

الأنسة **خلود مزاط**

المزداة في 24 دجنبر 1994 ب اسفي

**لنيل شهادة الدكتوراه في الطب**

الكلمات الأساسية:

تحاقن الدم - التحليل الدموي المنعائية - توصيات.

### اللجنة

الرئيس

**م. شكور**

السيد

أستاذ في طب أمراض الدم

المشرف

**م. آيت عامر**

السيد

أستاذ مبرز في أمراض الدم الحيوية

الحكم

**ح. قضيف**

السيد

أستاذ في الطب الباطني